

TRITICUM AESTIVUM L. VE *TRITICUM DURUM* DESF.'UN BAZI
ÇEŞİTLERİNDE FOTOSENTETİK PİGMENT BİRİKİMİ, HÜCRE
CANLILIĞI VE YÜKSEK SICAKLIK ŞOKU PROTEİNLERİNİN
SENTEZİ ÜZERİNE YÜKSEK SICAKLIĞIN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan TERZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos 2006

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRITICUM AESTIVUM L. VE *TRITICUM DURUM* DESF.'UN BAZI
ÇEŞİTLERİNDE FOTOSENTETİK PİGMENT BİRİKİMİ,
HÜCRE CANLILIĞI VE YÜKSEK SICAKLIK ŞOKU PROTEİNLERİNİN
SENTEZİ ÜZERİNE YÜKSEK SICAKLIĞIN ETKİSİ

Hakan TERZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman

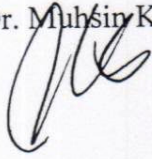
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

AFYONKARAHİSAR
2006

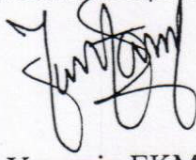
Hakan TERZİ'nin yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "*Triticum aestivum* L. ve *Triticum durum* Desf.'un Bazı Çeşitlerinde Fotosentetik Pigment Birikimi, Hücre Canlılığı ve Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinlerinin Sentezi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi" başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

24/08/2006

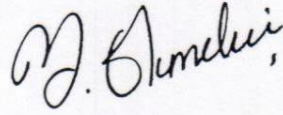
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhsin Konuk (Afyon Kocatepe Üniversitesi)
(Başkan)



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ (Afyon Kocatepe Üniversitesi)
(Danışman)



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ (Hacettepe Üniversitesi)



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRITICUM AESTIVUM L. VE *TRITICUM DURUM* DESF.'UN BAZI ÇEŞİTLERİNDE
FOTOSENTETİK PİGMENT BİRİKİMİ, HÜCRE CANLILIĞI
VE YÜKSEK SICAKLIK ŞOKU PROTEİNLERİNİN SENTEZİ ÜZERİNE
YÜKSEK SICAKLIĞIN ETKİSİ

Hakan TERZİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu araştırmada, erken fide evresindeki 16 ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) ve 14 makarnalık (*Triticum durum* Desf.) buğday çeşidinin hücre canlılığı ve fotosentetik pigment birikimi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi incelenmiştir. Buna ilaveten, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan bazı termal toleranslı ve duyarlı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularından ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profillerindeki çeşitlilik belirlenmiştir.

Hücre canlılık [2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) indirgenme testi] testinde, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin 25°C'de büyütülmüş 5 günlük fideleri uyum (37°C, 24 sa) ve uyumu takiben 50°C'de 1 sa uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Uyum sıcaklığına göre uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulamasında TTC indirgenmesi önemli düzeyde azalmıştır (P<0.05). Bu test kullanılarak çeşitlerin termal tolerans seviyeleri arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Zarar görmüş ilk yaprak dokularında gerçekleştirilen TTC testinde, ekmeklik buğday çeşidi Basribey-95 (%76.33) en yüksek termal toleransa sahipken, ekmeklik buğday çeşidi Sönmez-2001'in (%7.91) en düşük termal toleransa sahip olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, tüm çeşitlerin termal tolerans değerlerinin ortalamasına (%30.86) göre ekmeklik buğday çeşitlerinden Basribey-95, Gerek-79, İkizce-96, Bezostaya-1, Ceyhan-99, Gönen-98, Gün-91 ve makarnalık buğday

çeşitlerinden Amanos-97, Ankara-98, Ege-88, Fuatbey-2000, Çakmak-79'un termal tolerans değerleri ortalamanın üzerinde bulunmuştur.

Fotosentetik pigment birikimi testinde, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin 5 günlük etiyole fideleri kontrol (25°C, 24 sa), uyum (37°C, 24 sa) ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku (37°C, 24 sa→50°C, 1 sa) uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Karanlıktaki sıcaklık uygulamalarını takiben 25°C'de 24 sa sürekli ışığa maruz bırakılan fidelerde toplam klorofil (Klo $a+b$) ve karotenoidlerin pigmentasyonu belirlenmiştir. Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde Klo $a+b$ birikimi sıcaklığın artmasına bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). 37°C/25°C oranında (%), Klo $a+b$ birikimindeki azalma ekmeklik buğday çeşitlerinde %15.37'den (Ceyhan-99) %50.73'e (İkizce-96) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde %22.23'ten (Gediz-75) %61.97'ye (Kızıltan-91) aralanmıştır. 37→50°C/25°C oranında (%) Klo $a+b$ birikimindeki azalma ekmeklik buğday çeşitlerinde %32.13'den (Gönen-98) %60.06'ya (Cumhuriyet-75) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde %45.19'dan (Ege-88) %67.14'e (Ankara-98) aralanmıştır. İlginç olarak, Klo $a+b$ birikimindeki azalma bakımından makarnalık ve ekmeklik buğday çeşitleri 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranlarında tüm çeşitlerin ortalamalarının (sırasıyla %32.44 ve %48.40) altında ve üzerinde benzer dağılım göstermiştir. Karotenoidlerin pigmentasyonu bazı çeşitlerde kontrole göre yalnızca tek bir sıcaklık uygulamasında azalırken, bazı çeşitlerde kontrole göre her iki sıcaklık uygulamasında önemli düzeyde azalmıştır. Buna karşın, bazı çeşitlerde karotenoidlerin birikimi yüksek sıcaklıktan etkilenmemiştir. Klorofil/karotenoid oranı genellikle sıcaklığın artışıyla kademeli olarak azalmıştır. 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranlarında, klorofil/karotenoid oranındaki azalma (%) makarnalık buğday çeşitlerine göre ekmeklik buğday çeşitlerinde genellikle daha düşük bulunmuştur.

Protein analizlerinde, 37→50°C/25°C oranında toplam klorofil birikimindeki azalma (%) temelinde termal toleranslı ekmeklik (Gönen-98) ve makarnalık (Ege-88) ile termal duyarlı ekmeklik (Cumhuriyet-75) ve makarnalık (Ankara-98) buğday çeşitleri seçilmiştir. Buğday çeşitlerinin 5 günlük fideleri farklı sıcaklık uygulamalarına [25°C (24 sa), 37°C (24 sa) ve 37 (24 sa)→50°C (1 sa)] maruz bırakılmış ve sonra ilk yaprak dokularından ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin profilleri iki-yönlü (2-D) elektroforezi (İEF/SDS-PAJE) takiben gümüş boyama kullanılarak analiz edilmiştir. İlginç olarak, sentezi kaybolan, yeni sentezlenen ve/veya sentezi belirgin olarak artan ya

da azalan proteinlerin tamamı düşük moleküler ağırlıkta (16.1-24.0 kDa) ve genellikle asidik karakterdedir (pI 4.8-6.9). Buğday çeşitlerinden Gönen-98'de 22.9 kDa (pI 6.4), Ege-88'de 16.2 kDa (pI 6.0) ve Ankara-98'de 20.1 ve 20.7 kDa (pI 4.8) molekül ağırlıklı 4 normal hücresel protein kontrole göre her iki yüksek sıcaklık uygulamasında kaybolmuştur. Buna ilaveten, Ankara-98 çeşidinin kontrol uygulamasında belirlenen iki protein (23.0 kDa, pI 6.4 ve 23.8 kDa, pI 6.4) yalnızca 37→50°C uygulamasında kaybolmuştur. Diğer taraftan, cv. Gönen-98'de 16 yüksek sıcaklık şoku proteini (YSSP) (18.0-23.6 kDa, pI 5.4-7.8), cv. Cumhuriyet-75'de 11 YSSP (17.7-22.9 kDa, pI 6.0-7.1), cv. Ege-88'de 14 YSSP (18.3-22.9 kDa, pI 6.0-7.8) ve cv. Ankara-98'de 8 YSSP (18.0-22.9 kDa, pI 6.0-6.4) kontrole göre 37°C ve/veya 37→50°C uygulamasında yeni sentezlenmiştir. Kontrol uygulamasında belirlenen 3 normal hücresel proteinin (16.1, 16.1 ve 23.0 kDa, pI 6.3, 6.4 ve 6.6) miktarı yüksek sıcaklık uygulamalarında belirgin şekilde azalırken, bu proteinlerden 23.0 kDa (pI 6.4) protein Ankara-98'de yalnızca 37→50°C uygulamasında kaybolmuştur. Bununla birlikte, cv. Gönen-98'de 23.6 kDa (pI 6.7) proteinin miktarı yüksek sıcaklık uygulamalarında belirgin şekilde artmıştır. Farklı sentez durumlarındaki bu proteinlerin termal toleransın kazanılmasında önemli rol oynadığı ileri sürülebilir.

2006, 102

Anahtar kelimeler: *Triticum* L. çeşitleri, yüksek sıcaklık stresi, hücre canlılığı, fotosentetik pigmentasyon, yüksek sıcaklık şoku proteinleri, termal tolerans

ABSTRACT

Ms.Sc

EFFECT OF HIGH TEMPERATURE ON PHOTOSYNTHETIC PIGMENT
ACCUMULATION, CELL VIABILITY, AND SYNTHESIS OF HEAT SHOCK
PROTEINS IN SOME CULTIVARS OF *TRITICUM AESTIVUM* L.
AND *TRITICUM DURUM* DESF.

Hakan TERZİ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

In this research, the effects of different temperature treatments on cell viability and photosynthetic pigment accumulation of 16 bread (*Triticum aestivum* L.) and 14 durum (*Triticum durum* Desf.) wheat cultivars at early seedling stage were investigated. In addition, the diversity in two-dimensional (2-D) electrophoretic profiles of soluble proteins extracted from some thermotolerant and thermosensitive wheat cultivars subjected to different temperature treatments was detected.

In cell viability [2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction test] test, six-day-old seedlings of bread and durum wheat cultivars grown at 25°C were subjected to acclimation (37°C, 24 h) and acclimation followed by 50°C for 1 h treatments. TTC reduction was significantly decreased at acclimation followed by 50°C for 1 h compared to acclimation treatment ($P<0.05$). The significant differences among thermal tolerance levels of cultivars were determined using this test. It was determined that bread wheat cultivar Basribey-95 (76.33%) has highest thermal tolerance, while bread wheat cultivar Sönmez-2001 (7.91%) has lowest thermal tolerance in TTC test conducted in injured primary leaf tissues. In addition, the thermal tolerance values (%) of some bread (Basribey-95, Gerek-79, İkizce-96, Bezostaya-1, Ceyhan-99, Gönen-98 and Gün-91) and durum (Amanos-97, Ankara-98, Ege-88, Fuatbey-2000 and Çakmak-79) wheat cultivars were found higher than average (30.86%) of thermal tolerances of all cultivars.

In photosynthetic pigment accumulation test, five-day-old etiolated seedlings of bread and durum wheat cultivars were subjected to control (25°C, 24 h), acclimation (37°C, 24 h), and acclimation followed by heat shock (37°C, 24 h→50°C, 1 h) treatments. Following temperature treatments at dark, the pigmentation of total chlorophylls (Chl *a+b*) and carotenoids was determined in seedlings exposed to continuous light at 25°C for 24 h. The Chl *a+b* accumulation in bread and durum wheat cultivars was significantly decreased with increasing temperature ($P<0.05$). At 37°C/25°C ratio (%), the decrement in Chl *a+b* accumulation was ranged from 15.37% (Ceyhan-99) to 50.73% (İkizce-96) in bread wheat cultivars, while this decrement was ranged from 22.23% (Gediz-75) to 61.79% (Kızıltan-91) in durum wheat cultivars. At 37→50°C/25°C, the decrement in Chl *a+b* accumulation was ranged from 32.13% (Gönen-98) to 60.06% (Cumhuriyet-75) in bread wheat cultivars, while this decrement was ranged from 45.19% (Ege-88) to 67.14% (Ankara-98) in durum wheat cultivars. Interestingly, bread and durum wheat cultivars showed similar distribution at below and above of means of all cultivars at 37°C/25°C (32.44%) and at 37→50°C/25°C (48.40%) ratios with respect to decrements in Chl *a+b* accumulation. The pigmentation of carotenoids in some cultivars was decreased at only a temperature compared to control, while it was significantly decreased at temperature treatments compared to control in some cultivars. In contrast, the accumulation of carotenoids was not affected by high temperature in some cultivars. In general, the chlorophyll/carotenoid ratio was progressively decreased with increasing temperature. In general, the decrement (%) in chlorophyll/carotenoid ratio was found lower in bread wheat cultivars than durum wheat cultivars at 37°C/25°C and 37→50°C/25°C ratios.

In protein analysis, thermotolerant bread (Gönen-98) and durum (Ege-88) wheat cultivars and thermosensitive bread (Cumhuriyet-75) and durum (Ankara-98) wheat cultivars were selected based on decrement in accumulation of total chlorophylls at 37→50°C/25°C ratio. Five-day-old seedlings of wheat cultivars were subjected to different temperature treatments [25°C (24 h), 37°C (24 h) and 37°C (24 h)→50°C (1 h)] and then, the total soluble proteins extracted from primary leaf tissues were analyzed by two-dimensional (2-D) electrophoresis (SDS-PAGE) followed by silver staining. Interestingly, all of the disappeared, newly synthesized and/or markedly increased or decreased proteins were in low molecular weights (16.1-24.0 kDa) and generally acidic character (pI 4.8-6.9). Four normal cellular proteins with molecular weight of 22.9 kDa (pI 6.4) in cv. Gönen-98, 16.2 kDa (pI 6.0) in cv. Ege-88, and 20.1 and 20.7 kDa (pI 4.8) in cv. Ankara-98 were disappeared at both high temperature treatments compared to control. In addition, two

proteins (23.0 kDa, pI 6.4 and 23.8 kDa, pI 6.4) in Ankara-98 cultivar were disappeared at only 37→50°C compared to control treatment. On the other hand, 16 heat shock proteins (HSPs) (18.0-23.6 kDa, pI 5.4-7.8) in cv. Gönen-98, 11 HSPs (17.7-22.9 kDa, pI 6.0-7.1) in cv. Cumhuriyet-75, 14 HSPs in cv. Ege-88 (18.3-22.9 kDa, pI 6.0-7.8) and 8 HSPs (18.0-22.9 kDa, pI 6.0-6.4) in cv. Ankara-98 were newly synthesized at 37°C and/or 37→50°C treatments compared to control. The amounts of three normal cellular proteins (16.1, 16.1, and 23.0 kDa; pI 6.3, 6.4, and 6.6) determined in control treatment were markedly decreased at high temperature treatments, while 23.0 kDa (pI 6.4) protein among these proteins was disappeared at only 37→50°C treatment in cv. Ankara-98. However, the amount of 23.6 kDa (pI 6.7) protein was markedly increased at high temperature treatments in cv. Gönen-98. It may suggest that these proteins at different synthesis states play an important role in acquiring of thermal tolerance.

2006, 102

Keywords: *Triticum* L. cultivars, heat stress, cell viability, photosynthetic pigmentation, heat shock proteins, thermal tolerance

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Kültür Buğdaylarının Sistematiği ve Yayılışı.....	4
2.2 Stres Terminolojisi ve Strese Tepki	5
2.3 Bitkilerde Yüksek Sıcaklık Stresi ve Termal Tolerans	7
2.3.1 Membranlar ve Yüksek Sıcaklık Stresi	9
2.3.1.1 Hücre Membranları ve Membran-Temelli Testler	10
2.3.2 Fotosentez ve Yüksek Sıcaklık Stresi.....	14
2.3.2.1 Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi ve Termal Tolerans	17
2.3.3 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri	21
2.3.3.1 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinlerinin Grupları.....	23
2.3.3.2 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri ve Moleküler Şaperon Ağı.....	29
2.4 Bitkilerde Primer ve Sekonder Streslere Karşı Tolerans Cevabı.....	30
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1 Kimyasallar.....	34
3.2 Tohumların Temini	34
3.3 Tohum Yüzey Sterilizasyonu	35
3.4 Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları.....	35
3.5 Hücre Canlılık Testi (TTC İndirgenme Testi).....	36
3.6 Fotosentetik Pigmentlerin Analizi	38
3.7 Protein Analizleri	39
3.7.1 Protein Ekstraksiyonu.....	40
3.7.2 Yaprak Örneklerinin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.7.3 Elektroforez Analizi	42
3.7.3.1 İzoelektrik Fokuslama (İEF)	42

3.7.3.2 İzoelektrik Noktasının (pI) Belirlenmesi	43
3.7.3.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophrez (SDS-PAJE).....	44
3.7.4 Slab Jellere Uygulanan İşlemler.....	45
3.7.4.1 Proteinlerin Boyanması.....	45
3.7.4.2 Jellerin Fotoğraflanması.....	46
3.7.4.3 Jellerin Kurutulması.....	46
3.7.4.4 Jellerin Okunması	46
3.8 İstatistiki Analizler	47
4. BULGULAR	48
4.1 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin İlk Yaprak Dokusunda TTC İndirgenmesi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi	48
4.2 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi	50
4.3 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Protein Sentezi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	66
5.1 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Hücre Canlılığı ve Termal Tolerans.....	66
5.2 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi ve Termal Tolerans	69
5.3 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri ve Termal Tolerans	74
KAYNAKLAR.....	80
TEŞEKKÜR	99
EKLER.....	101
Ek-1: SDS-poliakrilamid jel elektrophrez çözeltileri ve hazırlanması.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Abiyotik stres cevabında yüksek sıcaklık şoku proteini (YSSP) ve şaperon ağı	30
Şekil 2.2 Abiyotik streslere bitki cevapları	32
Şekil 4.1 Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda toplam klorofil birikimi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi	51
Şekil 4.2 Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda karotenoidlerin birikimi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi	54
Şekil 4.3 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal toleranslı ekmeklik buğday Gönen-98 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri.	59
Şekil 4.4 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal duyarlı ekmeklik buğday Cumhuriyet-75 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri	60
Şekil 4.5 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal toleranslı makarnalık buğday Ege-88 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri	61
Şekil 4.6 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal duyarlı makarnalık buğday Ankara-98 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kültür buğdaylarının çeşit grupları	4
Çizelge 2.2 Bitki YSSP/moleküler şaperonları ve subfamilyaları	24
Çizelge 3.1 Hekzaploid ekmeklik buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.) çeşitlerine ait tohumların tescil tarihleri ve temin edildiği araştırma enstitüleri	34
Çizelge 3.2 Tetraploid makarnalık buğday (<i>Triticum durum</i> Desf.) çeşitlerine ait tohumların tescil tarihleri ve temin edildiği araştırma enstitüleri	35
Çizelge 3.3 İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) için gerekli kimyasallar ve miktarları	42
Çizelge 3.4 SDS-poliakrilamid jel elektroforez için moleküler ağırlık standartları	44
Çizelge 4.1 Fide evresindeki 16 ekmeklik ve 14 makarnalık buğday çeşidinin ilk yaprak dokularında TTC indirgenme testi ile belirlenmiş termal tolerans (%)	49
Çizelge 4.2 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında Klo $a+b$ birikimi üzerine yüksek sıcaklık uygulamalarının etkisi (%).....	52
Çizelge 4.3 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında klorofil/karotenoid oranı üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi	56
Çizelge 4.4 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında klorofil/karotenoid (Klo $a+b$ /Karot) oranı üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi (%)	57
Çizelge 4.5 Termal toleranslı ve duyarlı bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin fide evresinde ilk yaprak dokularında durumlarında farklılık belirlenen proteinler	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum persulfat
BSA	Bovin serum albumin
dH ₂ O	Distile su
DMA	Düşük moleküler ağırlık
HCOH	Formaldehit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
FSI	Fotosistem I
FSII	Fotosistem II
AgNO ₃	Gümüş nitrat
HCl	Hidroklorik asit
HMK	Hücrel membran termal kararlılık
2-D	İki-yönlü
İEF	İzoelektrik fokuslama
İEFJÇ	İzoelektrik fokuslama jel çözeltilisi
pI	İzoelektrik nokta
kDa	Kilodalton
kYŞŞP	Küçük yüksek sıcaklık şoku proteini
Klo <i>a</i>	Klorofil <i>a</i>
Klo <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
βME	β-merkaptoetanol
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
M	Molarite
MA	Moleküler ağırlık
ng	Nanogram
N	Normalite
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
KCl	Potasyum klorür
rpm	Revolutions per minute (r/min)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
TT	Termal tolerans
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolium klorür
TCA	Trikloro asetik asit
YŞŞP	Yüksek sıcaklık şoku proteini

1. GİRİŞ

Buğday, dünyada geniş ekiliş alanı ve üretimi açısından diğer kültür bitkileri arasında ilk sırayı almaktadır (FAO 2003). Türkiye’de ise yetiştirilen kültür çeşitleri arasında ekiliş alanı en geniş olan ürün buğdaydır (Kün 1988). Buğday, tek yıllık bir bitki olup, her türlü iklim ve toprak koşullarında yetişebilecek çok sayıda çeşitlere sahip olması, besleyici niteliği ve hammadde olarak kullanımının genişliği nedeniyle dünyanın hemen hemen her tarafında yetiştirilmektedir. Geniş adaptasyon yeteneğine sahip buğday, ılıman ve serin iklimde ve sulamanın yeterli olduğu sıcak iklimlerde yetişebilmektedir (Akkaya 1994). Tüm dünyada besinlerden alınan kalorinin %20’sini oluşturan buğday, dünya nüfusunun yaklaşık %35’inin temel besin kaynağıdır (Vasil et al. 1991).

Bitkisel üretimde ilk sırayı alan buğdayın dünyadaki ekim alanı 204.6 milyon hektar ve üretimi 549.4 milyon ton iken, Türkiye’deki ekim alanı 9.4 milyon hektar ve üretimi ise 19 milyon tondur (FAO 2003). Bu bağlamda, buğday dünyada toplam tahıl ekim alanının %32’sini ve üretimin %35’ini oluşturmaktadır. Ayrıca, Türkiye’de toplam tahıl ekim alanının %32’sinde ekmeklik buğday ve %19’unda makarnalık buğday yetiştirilmektedir (Anonim 2004).

Yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve kimyasal toksisite gibi abiyotik stres koşulları ve oksidatif stres, dünyanın birçok alanında tarımı ve tarım alanlarını tehdit etmektedir (Wang et al. 2003). Bitkilerin ortalama veriminin %50’den fazla azalmasına neden olan abiyotik stres, dünyadaki tarımsal ürün kaybının birincil nedenidir (Bray et al. 2000). Abiyotik stres morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak bitki büyüme ve verimliliğini olumsuz etkilemektedir (Wang et al. 2001).

Yüksek sıcaklık birçok önemli tarımsal bitkinin verimliliğini sınırlamaktadır (Paulsen 1994, Ishag and Mohamed 1996). Buğday gelişimi ve verimi için optimum sıcaklık 18-24°C aralığında olup, 28-32°C sıcaklıklara kısa süreli (5-6 gün) maruz kalma verimde %20 veya daha fazla azalmaya neden olmaktadır

(Stone and Nicolas 1994). Uyumlanmamış buğday çeşitleri için maksimum letal sıcaklık 47°C iken uyumlanan çeşitlerde bu sıcaklık 1°C daha yüksektir (Drozdov et al. 1984). Artan sıcaklık buğday gelişiminin farklı evrelerini inhibe etmekte (Ishag and Mohamed 1996) ve verimliliği olumsuz etkilemektedir (Paulsen 1994). Toprak yüzey sıcaklıklarının 50°C'yi aştığı kurak ve yarı kurak bölgelerde, yüksek toprak sıcaklığı bitki populasyonlarını önemli düzeyde azaltmaktadır (Setimela et al. 2005). Bir genotipin yüksek sıcaklıkta hayatta kalma yeteneği bitkinin tür ya da çeşidine, bitki gelişim evresine, hücre tiplerinin hassasiyetine, yüksek sıcaklığın derecesi ve süresine bağlıdır (Bray et al. 2000).

Bitkilerin yüksek sıcaklığa cevap mekanizmaları ve kazanılan yüksek sıcaklık toleransında bu mekanizmaların rollerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, buğday genotiplerinde stres toleransının geliştirilmesini kısıtlayan önemli nedenler bulunmaktadır. Bunlar:

- a) Genotipler arasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri içeren kompleks olaylar ve tüm agronomik parametreler kullanılarak yapılan seleksiyonun etkinliğinin artırılmasındaki bazı eksiklikler (Reynolds et al. 1998),
- b) İslah programlarında genotiplerin taranması için etkili değerlendirme metodlarının azlığıdır (Setimela et al. 2005).

Buğday çeşitleri artan sıcaklıklara farklı tepki göstermeleri ile birbirinden ayrılırlar (Batts et al. 1998). Bu genotipik farklılıklar, çevresel stresler için ıslah çalışmalarında oldukça önemlidir (Akkaya 1994). Uygun ve hızlı test sistemlerinin geliştirilmesi, buğday genotiplerinin yüksek sıcaklığa toleranslarının değerlendirilmesi için gereklidir. Tür veya çeşitler arasında yüksek sıcaklık toleransı açısından genotipik çeşitliliğin belirlenmesinde, TTC indirgenme (Fokar et al. 1998, Ibrahim and Quick 2001a) ve membran kararlılığı-iyon sızıntısı (Saadalla et al. 1990, Ibrahim and Quick 2001b) gibi hücre canlılığı testlerinin yanı sıra klorofil birikimi (Burke 1998), fotosentez (Karim et al. 1999) ve klorofil *a* flüoresansı (Dash and Mohanty 2001) gibi test sistemleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek sıcaklık stresine cevap olarak yüksek sıcaklık şoku

faktörlerinin (YSSF) transkripsiyon ve translasyonu ile yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin (YSSP) ifadesindeki genotipik farklılıkların (Skylas et al. 2002, Simões-Araújo et al. 2003, Yıldız and Terzioğlu 2006a, b) yanı sıra proteomik çalışmaların yapılması da önemlidir (Rizhsky et al. 2004, Busch et al. 2005).

Bu araştırmada, Türkiye’de ekimi yapılan 16 ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) ve 14 makarnalık (*Triticum durum* Desf.) buğday çeşidinin erken fide evresinde farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan fidelerin ilk yaprak dokularında hücre canlılığı [2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) indirgenme testi] ve fotosentetik pigmentlerin (klorofil *a*, *b* ve karotenoidler) birikimi değerlendirilmiştir. Diğer taraftan, 37→50°C/25°C oranında (%) klorofil *a+b* birikimindeki azalma bakımından tüm çeşitlerin ortalamasına (%48.40) göre en az klorofil kaybeden ve termal toleranslı olarak kabul edilen ekmeklik Gönen-98 (%32.13) ve makarnalık Ege-88 (%45.19) buğday çeşitleri ile en fazla klorofil kaybeden ve termal duyarlı olarak kabul edilen ekmeklik Cumhuriyet-75 (%60.06) ve makarnalık Ankara-98 (%67.14) buğday çeşitleri farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılmış ve ilk yaprak dokularından izole edilen toplam çözünebilir proteinlerindeki genotipik çeşitlilik iki-yönlü (2-D) SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (İEF/SDS-PAJE) tekniği ile analiz edilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kültür Buğdaylarının Sistematığı ve Yayılışı

Kültür buğdayı olan *Triticum* L. cinsi, *Cyperales* ordosu, *Gramineae* (*Poaceae*=Buğdaygiller) familyasının *Triticeae* oymağında yer almaktadır. Temel kromozom sayısı 7 olan buğdayın diploid ($2n=14$), tetraploid ($2n=28$) ve hekzaploid ($2n=42$) grupları vardır. Kültür buğdayı, kaplıca grubu (tek daneliler = *monococca* = *diploidea*), gernik grubu (iki daneliler = *dicoccoidea* = *tetraploidea*) ve spelta grubu (ekmeklik buğdaylar = *hexaploidea*) olarak üçe ve her grup kendi içinde “yabani”, “kavuzlu kültür formu” ve “çıplak daneli kültür formu” olarak tekrar üçe ayrılmıştır. Tetraploid buğday çeşitleri genellikle yazlık, hekzaploid buğday çeşitleri ise yazlık, kışlık ve alternatif çeşitleri bulundurmaktadır. Kültür buğdaylarının çeşit grupları, önceki tür adı ve Türkçe adları Çizelge 2.1’de verilmiştir (Kün 1988).

Çizelge 2.1 Kültür buğdaylarının çeşit grupları (Kimber and Sears 1987 ve Kün 1988’den düzenlenerek)

Tür adı ve ploidi seviyesi	Çeşit grubu	Önceki tür adı	Türkçe adı
<i>T. monococcum</i> L. Diploid grup (AA)	--	<i>T. monococcum</i> L.	Kaplıca
	dicoccon	<i>T. dicoccon</i> Schrank	Gernik
	durum	<i>T. durum</i> Desf.	Makarnalık buğday
<i>T. turgidum</i> L. Tetraploid grup (AABB)	turgidum	<i>T. turgidum</i> L.	Kabatahl
	polonicum	<i>T. polonicum</i> L.	Turnagagası buğday
	carthlicum	<i>T. carthlicum</i> Nevski (<i>T. persicum</i> Vav.)	Doğu buğdayı
<i>T. timopheevi</i> Zhuk. var. <i>timopheevi</i> Tetraploid grup (AAGG)	--	<i>T. timopheevi</i> Zhuk	
<i>T. timopheevi</i> Zhuk. var. <i>zhukovskyi</i> (Men. et Er.) Hekzaploid grup (AAAAGG)	--	<i>T. zhukovskyi</i> Men. et Er.	
	spelta	<i>T. spelta</i> + <i>T. macha</i> Men.	Kavuzlu buğday
	vavilovii	<i>T. vavilovii</i> Jakubz	Dallı buğday
<i>T. aestivum</i> L. em Thell Hekzaploid grup (AABBDD)	aestivum	<i>T. aestivum</i> L. (<i>T. vulgare</i> Host.)	Ekmeklik buğday
	compactum	<i>T. compactum</i> Host.	Topbaş buğday
	sphaerococcum	<i>T. sphaerococcum</i> Perc.	Cüce buğday

T. aestivum, birçok çevresel koşula adapte olmuş 20000'den fazla çeşidiyle dünyada en geniş kültürü yapılan buğday türüdür. Benzer olarak, tetraploid *T. durum* Akdeniz havzası, Hindistan, Rusya, Kuzey Amerika Ovalarının az yağmur alan alanları gibi dünyanın nispeten kurak alanlarında yaygın olarak yetiştirilmektedir. Zıt olarak, *T. timopheevii* ve *T. monococcum* türlerinin ekim alanları çok sınırlıdır. *T. timopheevii* bugün sadece Rusya'nın Kafkas geçiş bölgesinde birkaç alanda yetiştirilmektedir. Hayvan yemi olarak kullanılan *T. monococcum* ise Yugoslavya ve Türkiye'nin birkaç dağlık bölgesinde yetiştirilmektedir (Feldman and Sears 1981).

2.2 Stres Terminolojisi ve Strese Tepki

Stres, biyotik ve abiyotik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli değişimleri meydana getirmesi veya organizmada hasar oluşturma kapasitesi olarak tanımlanabilir (Levitt 1980). Başka bir deyişle, büyüme, gelişme ve üretim için genetik potansiyelin ifadesini olumsuz şekilde etkileyen herhangi bir çevresel faktörü veya bunların etkileşimlerini içermektedir (Jones and Qualset 1984).

Levitt (1980), stres faktörlerini fizikokimyasal (sıcaklık, tuz, ışık, su, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alan) ve biyotik (mikroorganizmaların enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları) faktörler olmak üzere iki gruba ayırmıştır.

Stres, olumsuz çevresel faktörlerin üstesinden gelebilmek için bitkinin mücadelesini kapsayan stres toleransı ile yakından ilişkilidir (Taiz and Zeiger 2002). Ancak, bitkilerin strese verdikleri cevaplar farklı şekillerde tanımlanmaktadır (<http://7.tamu-commerce.edu/agscience/clasnote/pls381/8>, 26.03.2005, Taiz and Zeiger 2002):

- 1) **Kaçış (escape):** Sadece koşulların uygun olduğu dönemde büyümedir. Örneğin, kuraklıktan önce yağışlı mevsimde yaşam döngülerini tamamlayan bitkilerin davranışlarıdır.

- 2) **Sakınım (avoidance):** Bitkilerin stres faktörlerinin olumsuz etkilerini azaltması veya engellemesidir. Dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen bitki hücrelerinin stresten uzak bir iç ortam oluşturmasıdır. Örneğin, transpirasyonla yaprak sıcaklığının yüksek sıcaklıklarda bile düşük seviyede tutulması.
- 3) **Tolerans (tolerance) veya direnç (resistance):** Literatürde “stres toleransı” terimi sıklıkla “stres direnci” ile birlikte kullanılmasına rağmen, “tolerans” terimi tercih edilmektedir. Tolerans, karmaşık bir fizyolojik olay olup, organizmaya ilk olarak öldürücü olmayan yüksek derecede stresin (subletal) uygulanmasını takiben uygulanan öldürücü strese (letal) organizmanın dayanma yeteneğidir. Diğer taraftan, stres faktörlerinin etkisinin elimine edilmesi, azaltılması veya onarılmasıdır. Bitkilerin çevresel streslere karşı reaksiyonları oldukça karmaşık olup, basit kimyasal ya da biyokimyasal direkt cevaplar, karışık hormonal veya gelişim cevapları ile genetiksel olarak ortaya çıkan kalıtsal etkilere kadar birçok fizyolojik cevapla ilgilidir. Bununla birlikte, bir tür için stres oluşturan koşul veya koşullar başka bir bitki türü için stres oluşturmayabilir. Örneğin, bezelye (*Pisum sativum*) ve soya fasulyesi (*Glycine max*) bitkileri sırasıyla 20°C ve 30°C’de optimum büyüme göstermektedir. Sıcaklık artışı ile birlikte bezelye bitkisinde yüksek sıcaklık zararı daha erken görülmektedir. Bu durum, soya fasulyesinin daha fazla yüksek sıcaklık stresi toleransına sahip olduğunu göstermektedir.
- 4) **Uyum (acclimation) ve adaptasyon (adaptation):** Sırasıyla kalıtılamayan ve kalıtılabilir stres cevaplarını ifade etmektedir. Öncül bir strese maruz kalmanın sonucu olarak tolerans artmışsa, bitki **uyumlanmış** (veya hardened) olarak kabul edilir. Uyum genellikle nesiller boyunca seleksiyon işlevleriyle kazanılan direncin genetik olarak belirlenmiş seviyesi olarak ifade edilen adaptasyondan ayrılmaktadır. Bununla birlikte, adaptasyon terimi bazen uyum kavramı yerine kullanılmıştır. Diğer taraftan, gen ifadesi uyumda önemli bir rol oynamaktadır. Çevresel streslere adaptasyon ve uyum,

anatomik ve morfolojik seviyeden hücresel, biyokimyasal ve moleküler seviyeye kadar aralanan organizasyonun tüm seviyelerinde meydana gelen birbirleriyle ilişkili olaylarla sağlanmaktadır. Örneğin, su eksikliğine cevap olarak solan yapraklar, hem yapraklardan su kaybını hem de ışığa maruz kalmayı azaltarak yüksek sıcaklık stresinin yapraklar üzerindeki etkisini azaltmaktadır.

Hücrelerin stres toleransının artmasına neden olan hücresel cevaplar; hücre siklusu, hücre bölünmesi, hücrelerin endomembran sistemi ve vakuolleşmesi ile hücre duvarının yapısındaki değişiklikleri kapsamaktadır. Biyokimyasal seviyede, bitkiler prolin ve glisin betain gibi ozmodüzenleyici bileşiklerin üretimini içeren metabolizmada bazı değişiklikler yaparak çevresel streslerin üstesinden gelmektedir. Bir stres sinyalinin algılanması ile ilgili moleküler olaylar ise toleransa neden olan genomik tepkilerdir (Taiz and Zeiger 2002).

2.3 Bitkilerde Yüksek Sıcaklık Stresi ve Termal Tolerans

Yüksek sıcaklık stresi, özellikle optimum büyüme sıcaklığındaki 1.5-6°C'lik artış (Houghton et al. 2001) ile fotosentezin inhibisyonuna (Karim et al. 1999), hücre membranlarının zararına (Marcum 1998) ve senesense bağlı hücre ölümüne (Abernethy et al. 1989) neden olarak büyüme ve gelişmeyi sınırlayan abiyotik stres koşullarından biridir (Huang et al. 1998, Larkindale and Huang 2004). Bununla birlikte, hayat döngülerinin bazı evrelerinde birçok tarımsal ürün yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadır (Stone 2001). Bu noktada, bir genotipin yüksek sıcaklıkta canlılığını sürdürmesi ya da göreceği zarar, yüksek sıcaklık stresinin şiddeti ve süresi, bitkinin çeşit ve gelişim evresi ile yakından ilişkilidir (Gusta and Chen 1987, Bray et al. 2000). Yüksek sıcaklık stresi, bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal işlevlere zarar vererek büyüme, ürün ve kalitede azalmaya neden olmaktadır. Her bitki türünün optimum fonksiyon gösterdiği optimum sıcaklık aralığı vardır ve bu aralığın dışında hücresel metabolizma ve dolayısıyla bitki büyümesi olumsuz etkilenmektedir (Burke 1990). Türe özgü olan bu sıcaklık aralığı "termal kinetik pencere" olarak tanımlanmaktadır (Burke et al. 1988). Optimum sıcaklık aralığının üzerindeki sıcaklıklar fotosentez, membran

bütünlüğü ve enzim kararlılığını içeren birçok fizyolojik işlevde değişikliklere neden olmaktadır (Nguyen and Joshi 1992).

Termal tolerans (termotolerans) karmaşık bir fizyolojik olay olup; organizmaya ilk olarak öldürücü olmayan yüksek bir sıcaklık (subletal sıcaklık) uygulanırsa, ardından uygulanan öldürücü sıcaklığa (letal sıcaklık) organizmanın dayanma yeteneğidir (Burke et al. 2000). Birçok organizmanın yüksek sıcaklık koşullarında hayatta kalma ve iyileşme yeteneği “kalıtsal termal tolerans” ve “kazanılan termal tolerans” tarafından belirlenmektedir. Yüksek sıcaklık cevabı, hücre ve organizmanın artan sıcaklıklara (yüksek sıcaklık stresi veya şoku) karşı korunma reaksiyonudur. Aşırı yüksek sıcaklık stresi hücresel zarara ve hücre ölümüne neden olmasına rağmen, yüksek sıcaklık stresinin subletal dozları, hücre veya organizmayı zarardan koruyan, normal hücresel ve fizyolojik aktivitelerin devamını sağlayan ve termotoleransın daha yüksek seviyesine neden olan hücresel cevabı (yüksek sıcaklık cevabı) teşvik etmektedir (Vierling 1991, Hatice and Atilla 2003). Yüksek sıcaklığa uyumu kapsayan işlevler, sıcaklık sinyallerinin iletimi ve yüksek sıcaklık toleransının gelişimini sağlayan biyokimyasal işlevlere bu sinyallerin dönüştürülmesi ile başlamaktadır (Sangwan et al. 2002).

Tahıllarda yüksek sıcaklık toleransı tek bir “termotolerant” genle kontrol edilmemektedir (Maestri et al. 2002). Genlerin farklı setleri tarafından belirlenmiş toleransın farklı bileşenleri, çeşitli dokularda ve hayat döngüsünün farklı evrelerinde yüksek sıcaklık toleransı için önemlidir (Maestri et al. 2002). Bitkiler membran bütünlüğünün devam ettirilmesi ve yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin sentezi gibi birkaç fizyolojik ve biyokimyasal mekanizma ile yüksek sıcaklık stresinin üstesinden gelmektedir. Yüksek sıcaklığa cevap olarak gen ifadesindeki değişimler yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkilidir. Tipik olarak, birçok genin ifadesi yüksek sıcaklık stresi ile azalırken, yüksek sıcaklık şoku genleri olarak adlandırılan genlerin spesifik bir grubu hızlı bir şekilde teşvik edilmektedir (Schlesinger et al. 1982). Bununla birlikte, strese tolerans veya hassasiyet bitki türüne, genotipe ve gelişim evresine bağlıdır (Bray et al. 2000).

2.3.1 Membranlar ve Yüksek Sıcaklık Stresi

Hücrel membranlar, bitkilerde yüksek sıcaklık tarafından oluşan fizyolojik zararın meydana geldiği ilk bölgeler olarak düşünülmektedir (Blum 1988). Membranlar, kompartımanlaşma ve konsantrasyon gradiyentinin devamı için yarı geçirgen bariyerler olup, fotosentez ve solunum gibi membran ilişkili reaksiyonlar için bir alan sağlamaktadır (Blum 1988). Bitkilerin normal büyüme sıcaklıklarının üzerindeki sıcaklıklara maruz kalması membran yapısında geri dönüşümsüz değişikliklere ve membran kararsızlığına neden olmaktadır (Nguyen and Joshi 1992). Yüksek sıcaklık stresi sırasında membran akışkanlığındaki değişiklikler, membran bileşenlerinin yeniden düzenlenmesi veya lipid içeriğindeki değişimlerden kaynaklanmaktadır (Suss and Yordanov 1986). Yüksek sıcaklık stresinin neden olduğu hücrel membran bozulması fotosentetik veya mitokondriyal aktiviteyi etkileyebilmekte ve hatta plazma zarının çözünenleri tutma yeteneğini azaltmaktadır (Lin et al. 1985). Yüksek sıcaklık stresi, lipidler arasındaki hidrojen bağlarını ve membranların akıcı fazı içerisindeki proteinlerin polar grupları arasındaki elektrostatik etkileşimi zayıflatarak hücre membranlarının bileşenlerini ve yapısını modifiye etmektedir. Diğer taraftan, yüksek sıcaklık stresi sırasında hücre membran sistemlerinin fonksiyonunu korumasının, bitkilerin yüksek sıcaklığa adaptasyonu ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Raison et al. 1980). Ayrıca, yüksek sıcaklık stresinde zarar gören kısımlar sadece hücrelerin membranları değil, aynı zamanda vakuol etrafını saran tonoplast yüksek sıcaklıktan etkilenmektedir. Fotosentetik membranlar ile mukayese edildiğinde tonoplastın yüksek sıcaklıkta kısmen daha kararlı olduğu (Weigel 1983), ancak yüksek sıcaklık şokunun tonoplast bütünlüğünü olumsuz etkilediği ve geçirgenliğini arttırdığı bildirilmiştir (Santarius et al. 1991).

Membran lipid doygunluğu, yüksek sıcaklık toleransında önemli bir element olarak düşünülmektedir. Yüksek sıcaklık stresi hem tilakoid hem de plazma membranlarının doymuş yağ asidi seviyesinde artışa neden olmaktadır (Vigh et al. 1993). Yüksek sıcaklık toleransının kazanılmasında bu membranların önemli olduğu ileri sürülmüştür (Horvath et al. 1998). Yüksek sıcaklık uyumu sırasında lipid değişimleri birçok türde bildirilirken (Whitaker et al. 1997, Horvath et al.

1998, Grover et al. 2000), termotoleransın kazanılmasında bu tür membran değişimlerinin etkisi açıklama gerektirmektedir (Klueva et al. 2001). Birkaç çalışmada, lipid doygunluğundaki değişimlerin yüksek sıcaklık stresi sırasında fotosentetik oranı etkilemediği bildirilmiştir (Santarius and Muller 1979, McCourt et al. 1987, Kunst et al. 1989a, b). Yüksek sıcaklık uygulamasında, yabancı tip buğdaya göre yüksek sıcaklığa dirençli mutant buğday hattında galaktolipitlerden linolenik asidin ve fosfolipitlerden *trans*- Δ -3 heksaldekanoyik asidin miktarının arttığı saptanmıştır (Behl et al. 1996). Yüksek sıcaklığa toleranslı buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitleri hassas çeşitlere göre önemli derecede daha fazla doymuş yağ asitli membranlara sahiptir (Yang et al. 1984). Tütün (*Nicotiana tobaccum* L.) bitkisinde genetik modifikasyonların sonucu olarak doymamış yağ asitlerinin seviyesinde artış, yüksek sıcaklıklarda daha uzun süre hayatta kalmayı sağlamıştır (Grover et al. 2000). Bununla birlikte, patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisinin yüksek sıcaklığa toleranslı çeşitlerinin linoleik and linolenik içerikleri (doymamış yağ asitleri) kontrole göre çok az artış gösterirken, oleik asit seviyesi toleranslı çeşitlerde daha düşüktür (Diepenbrock et al. 1989). Sonuç olarak, yüksek veya düşük derecede membran lipid doygunluğunun yüksek sıcaklık toleransı için yararlı olup olmadığı açık değildir (Klueva et al. 2001).

Yüksek sıcaklığa bitki cevabı olarak oluşan aktif oksijen türleri (singlet oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) membranlar ile tepkimeye girebilmekte ve bu yapıların fonksiyonunda değişikliklere neden olabilmektedir (Francisco et al. 2002, Diego et al. 2003). Aktif oksijen türleri, normal hücrel koşullarda membran ilişkili oksidaz (Desikan et al. 1996) ve elektron taşıma zinciri tarafından üretilmektedir (Shewfelt and Purvis 1995). Aktif oksijen türleri ile membran lipidlerinin otokatalitik peroksidasyonu membranların yarı geçirgen özelliğinde azalmaya neden olmaktadır (Foyer et al. 1997).

2.3.1.1 Hücre Membranları ve Membran-Temelli Testler

Bitkilerde yüksek sıcaklık toleransının taranmasında membran-temelli işlevler ile ilişkili genellikle iki test yaygın olarak kullanılmaktadır (Blum 1988): Plazmalemma (HMK, hücrel membran kararlılığı) ve mitokondriyal

membranlar (TTC, tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanan hücre canlılık testi).

Yüksek sıcaklıklarda zarar gören yaprak segmentlerinden difüze olan elektrolitlerin iletkenliğinin bir ölçümü olan hücresel membran kararlılığı, bitkilerde yüksek sıcaklık toleransının taranmasında uygun bir test olarak bildirilmiştir (Sullivan 1972). Elektriksel iletkenlik birçok tarım bitkisinin yüksek sıcaklığa toleranslı genotiplerinin belirlenmesinde membran kararlılık indeksi olarak kullanılmaktadır (Saadalla et al. 1990, Shanahan et al. 1990, Ismail and Hall 1999, Blum et al. 2001, Ibrahim and Quick 2001a, b, Yeh and Hsu 2004, Rahman et al. 2004, Azhar et al. 2005).

TTC hücre canlılık testi ise mitokondriyal elektron transport zincirini değerlendirmekte ve böylece solunum aktivitesini göstermektedir. TTC ile canlı hücrelerin boyanması, her bir hücrenin fizyolojik olarak aktif olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. TTC indirgenmesi, mitokondrilerde tetrazolium tuzunun elektron taşıma zincirinden elektronları alması ile meydana gelmektedir (Nachlas et al. 1960). Çevresel streslere toleranslı bitkiler yüksek süksinik asit aktivitesi gösterir ve çok miktarda TTC'yi formazana indirgeme yeteneğine sahiptir. Formazan spektrofotometrik olarak görüntülenebilen kırmızı renge sahiptir. Canlı hücrelerin tetrazolium tuzunu formazana indirgeme yeteneği, yüksek sıcaklığa toleranslı genotiplerin seleksiyonunda kullanılabilir (Chen et al. 1982). TTC indirgenmesinin miktarı, nispi hücre canlılığını gösteren mitokondriyal solunum aktivitesinin bir göstergesidir.

TTC testi, bitki hücrelerinin veya dokularının yüksek sıcaklıklarda canlılığını değerlendirmek için uzun süredir kullanılmaktadır (Towill and Mazur 1975). Chen vd. (1982), kazanılan yüksek sıcaklık toleransının teşvik edilmesinde genotipik farklılıkların bulunduğunu ve bu farklılıkların yüksek sıcaklık koşulları altında verim ile ilişkili olduğunu TTC testi ile belirlemişlerdir. Birçok çalışmada, termal tolerans açısından genotipik farklılıklar TTC hücre canlılık testi kullanılarak belirlenmiştir (Towill and Mazur 1975, Chen et al. 1982, Krishnan et

al. 1989, Porter et al. 1994, Fokar et al. 1995, Mullarkey and Jones 2000, Ibrahim and Quick 2001a, Yildiz and Terzioglu 2006a).

Porter vd. (1994), sert kırmızı kışlık buğdayda kazanılan termal toleranstaki çeşitler arası farklılıkları karakterize etmek için mitokondriyal aktivitenin bir göstergesi olan TTC indirgenme testi kullanmıştır. Altı buğday çeşidine (Arkan, Payne, Siouxland, Sturdy, TAM W-101 ve TAM 108) ait 25°C'de büyütülmüş 7 günlük fideler, 37°C'de 24 sa uyum periyodunu takiben 50°C'ye 2 sa maruz bırakılmıştır. Sıcaklık uygulamalarını takiben TTC indirgenme testine göre kazanılan termal toleranstaki farklılıklar, Siouxland çeşidinde %6 ile en düşük ve TAM 108 çeşidinde %72 ile en yüksek olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları, kışlık buğdayda kazanılan termal toleranstaki farklılıkların ölçümünde TTC indirgenme testinin kullanılabilceğini göstermiştir.

Fokar vd. (1998), 56 yazlık buğday çeşidinin hüresel termotoleranstaki genetik çeşitliliğini, hüresel membran termal kararlılık (HMK) ve trifenil tetrazolium klorür (TTC) testleri ile fide evresinde değerlendirmiştir. Ayrıca, bu çeşitlerden sekiz tanesi aynı testler kullanılarak çiçeklenme evresinde değerlendirilmiştir. Çeşitlere ait 20-25°C'de büyütülmüş 10 günlük fideler 34°C'de 24 saat uyumlandıktan sonra 50°C'de 1 sa yüksek sıcaklık şokuna maruz bırakılmış ve TTC ve HMK testleri için değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, fide ve çiçeklenme evresinde her iki test için çeşitler arasında önemli farklılıkların bulunduğunu bildirmiştir. Fide ve çiçeklenme evreleri arasında tüm çeşitlerin termal tolerans ortalamaları arasında önemli fark bulunmazken, HMK testi için her iki büyüme evresi arasındaki fark önemli bulunmuştur. Ayrıca, fide ve çiçeklenme evresinde değerlendirilen 8 çeşit için TTC ve HMK sonuçları arasında korelasyon önemli bulunurken, fide evresindeki 56 çeşit için bu korelasyon düşük bulunmuştur. TTC ile termal tolerans değerleri oldukça kalıtılabilir ve HMK değerleri ile bazı boyutlarda ilişkili olmasına rağmen, TTC'nin yüksek sıcaklık stresi altında bitki performansının belirlenmesinde HMK kadar etkili olamayacağı sonucuna varılmıştır (Fokar et al. 1998).

Mullarkey ve Jones (2000), Guardian buğday çeşidinin termal toleranslı mutantlarını belirlemek için hücre canlılık (TTC indirgenme) testini kullanmıştır. Guardian ve seçilmiş mutantlara ait tohumlar, 10 gün süreyle 18°C'de büyütüldükten sonra 2 saat için 25°C ve 50°C sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamasını takiben Guardian buğday çeşidinin TTC indirgenmesi kontrole göre %67 azalmıştır. TTC indirgenmesinde azalma, seçilmiş mutantlardan tht 13 mutantında Guardian çeşidine göre daha yüksek bulunmuştur. Yüksek sıcaklık uygulamasında TTC indirgenmesi, termal toleranslı olarak belirlenen tht 3, tht 5, tht 8 ve tht 9 mutantlarında Guardian çeşidine göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur.

Ibrahim ve Quick (2001a), HMK ve TTC hücre canlılık testleri kullanarak buğdayda yüksek sıcaklık toleransının genetik çeşitliliğini değerlendirmiş ve F₃ ve F₄ bitkileri kullanılarak kalıtılabilirlik belirlenmiştir. Buğday çeşitlerine (Kauz, Yuma, Arlin, Seri 82, Siete Cerros, TAM 107-R3, TAM 107, TAM 107-R2, TAM 108, CO910239, MTRWA 116, NE 92458 ve V5) ait 8-10 günlük fideler (20-22°C'de 4 gün ve 17°C'de 4-6 gün büyütülmüş) 39°C'de 48 sa uyumladıktan sonra 30 dakika için 49°C'ye maruz bırakılmıştır. Varyans analizi, HMK ve TTC redüksiyonu için 14 hat arasında oldukça önemli farklılığı göstermiştir. HMK değerlerinin ortalaması Arlin'de %28.4'den Kauz'da %76.4'e aralanırken, TTC değerleri MTRWA 116'da %20.4'den Kauz'da %82.2'ye aralanmıştır. Her iki test için Kauz, TAM 107-R3 ve TAM 107 çeşitlerinin yüksek termal tolerans değerlerine (çok toleranslı) sahip olduğu bildirilmiştir (Ibrahim and Quick 2001a).

Yildiz ve Terzioglu (2006a), erken fide evresinde ekmeklik (Bezostaya-1 ve Çukurova-86), makarnalık (Diyarbakır-81) buğday çeşitleri ve yabani buğday türlerinin (*Aegilops biuncialis*, *Ae. triuncialis* ve *Ae. umbellulata*) termal toleransındaki genotipik farklılıkları belirlemiştir. Araştırmacılar, 23°C'de 3 gün süreyle büyütülen etiyole fideleri, 24 sa için 23, 35 ve 37°C'ye ve 35 ile 37°C'de 24 sa uyumlamaları takiben 50°C'ye 1 sa maruz bırakmışlardır. Koleoptil dokularında % kazanılan termal tolerans seviyelerini belirlemişlerdir. İki farklı uyum sıcaklığı (35 ve 37°C) ile uyumlanmış koleoptil dokularında kazanılan

termal tolerans açısından çeşitler ve türler arasındaki genotipik farklılıklar önemli düzeyde artmıştır. Buna ilaveten, iki uyum sıcaklığında da benzer durum gözlenmesine rağmen, 37°C’de kazanılan termal toleransın 35°C’ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, ekmeçlik Bezostaya-1 buğday çeşidi oldukça termal toleranslı olarak belirlenirken, yabancı buğday türü *Aegilops triuncialis* oldukça duyarlı bir genotip olarak belirlenmiştir (Yildiz and Terzioğlu 2006).

2.3.2 Fotosentez ve Yüksek Sıcaklık Stresi

Bitkilerde fotosentetik aparatlar sıcaklığa hassas olup; genellikle yüksek sıcaklık semptomlarının görünür hale gelmesinden önce oldukça fazla zarar görmektedir (Crafts-Brandner and Salvucci 2000, Camejo et al. 2005). Yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde fotosentez oranındaki azalmalar, kloroplastların yapısal ve fonksiyonel olarak zarar görmeleri ve klorofil birikimindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Xu et al. 1995, Dekov et al. 2000).

Kloroplastı kuşatan iç ve dış membranlar (Bauer and Senser 1979, McCain et al. 1989) ile tilakoid membranları (Armond et al. 1980) yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenmektedir. Tilakoid membranların geçirgenliğindeki artış, membran lipid matriksinin aşırı akışkanlığı ve lipid-protein etkileşimindeki değişimlerin fotosistem II (FSII) termal kararlılığındaki değişimler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Berry and Björkman 1980, Gounaris et al. 1984, Mishra and Singhal 1992, Mamedov et al. 1993). Fotosentezin ışık (FSII aktivitesi ve fotofosforilasyon kapasitesi) ve karanlık (karbondioksit fiksasyonu) reaksiyonları yüksek sıcaklık tarafından inhibe edilmektedir (Berry and Björkman 1980). FSII, suyun moleküler oksijene oksidasyonu ve ışık enerjisinin elektronların transportu için kullanıldığı pigment-protein kompleksidir. FSII kompleksinin yüksek sıcaklık ile inaktivasyonu, suyun moleküler oksijene oksidasyonunu katalizleyen manganöz kümelerinin yıkımı ile başlamaktadır (Nash et al. 1985, Thompson et al. 1989, Mamedov et al. 1993, Enami et al. 1994). FSII’de yüksek sıcaklığa bağlı olarak tilakoid lümenin hacmindeki artış, grana tilakoidlerinin kademeli olarak

ayrılması ve yeniden düzenlenmesi (Xu et al. 1995), fonksiyonel proteinlerin denatürasyonu (Thompson et al. 1989), ışık toplayan klorofil *a/b*-bağlama proteinlerinin FSII kompleksi merkezinden ayrılması (Armond et al. 1980, Gounaris et al. 1984, Sundby et al. 1986, Xu et al. 1995) ve akseptör bölgesindeki plastokinon molekülleri (Q_A ve Q_B) arasında elektron transferindeki inhibisyon da meydana gelmektedir (Cao and Govindjee 1990). Bunun yanı sıra, tilakoid membranların zarar görmesi ile öncelikle FSII’de suyun fotolizi inaktive olmakta, tilakoid kanala H⁺ alınımında değişiklikler ve fotofosforilasyon ile ATP oluşumunda aksamalar meydana gelmektedir (Al-Khatib and Paulsen 1989). ATP üretimi 35°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda kademeli olarak inhibe olmaktadır (Stidham et al. 1982). ılımlı yüksek sıcaklık, karanlıkta plastokinonun azalmasını ve ışıkta siklik elektron akışını stimüle etmektedir (Sharkey 2005). Diğer taraftan, kloroplastların fotosistem I (FSI) aktivitesi yüksek sıcaklıkta FSII’ye göre daha kararlıdır (Percy et al. 1977).

Kloroplast membranlarına uygulanan kısa süreli yüksek sıcaklık, su ve stroma enzimlerini içeren kloroplast içeriğinin kaybına neden olmaktadır (Bauer and Sener 1979, McCain et al. 1989). Yüksek sıcaklık stresi, CO₂ fiksasyonunun ilk basamağını katalizleyen ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) enziminin inhibisyonunun bir sonucu olarak CO₂ fiksasyonunu azaltmaktadır (Feller et al. 1998, Law and Crafts-Brandner 1999, Bernacchi et al. 2002). Işıқта Rubisco aktivasyonunu sağlayan stroma enzimi Rubisco aktivaz (Portis 2003), yüksek sıcaklıklarda inaktive olmakta ve CO₂ fiksasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Feller et al. 1999). Sıcaklığa bağlı olarak Rubisco aktivasyonu ve dolayısıyla fotosentezdeki azalma, Rubisco aktivaz aktivitesinin yetersiz kalmasıyla Rubisco’nun daha hızlı inaktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Crafts-Brandner and Salvucci 2000, Salvucci and Crafts-Brandner 2004). Pamuk (*Gossypium hirsutum*), buğday (*Triticum aestivum*), tütün (*Nicotiana tabacum*) ve mısır (*Zea mays*) bitkilerinde ılımlı yüksek sıcaklık koşulları altında Rubisco aktivasyonundaki azalışın net fotosentez oranındaki azalış ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Law and Crafts-Brandner 1999, Crafts-Brandner and Law 2000, Sharkey et al. 2001, Crafts-Brandner and Salvucci 2002).

Yüksek sıcaklık stresi altında FSII inaktivasyon mekanizması genç bitkilere göre olgun bitkilerde oldukça karışıktır, çünkü yaşlı yapraklarda yüksek sıcaklık zararı yaşlanma işlevine eklenmektedir. Harding vd. (1990), olgunlaşan buğday yapraklarında sıcaklığın tilakoid bileşenlerinin bozulmasını hızlandırdığını ve bileşenlerin reaksiyon oranları arasındaki dengesizliği teşvik ettiğini bulmuştur. Bununla birlikte, artan sıcaklıklar ışık toplayan aparatların organizasyonunda bozulmalara, grana kümelerinde değişikliklere, membran partiküllerinin boyutunda ve yayılışında değişimlere ve tilakoid membranların geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (Gounaris et al. 1984, Murakami et al. 2000). Artan sıcaklıklar senesensi hızlandırmakta, yaprak alanının canlı kalma süresini ve fotosentetik aktiviteyi azaltmaktadır (Harding et al. 1990). Yüksek sıcaklığın tilakoid membran üzerine olan etkileri hücre başına düşen kloroplast sayısının azalmasına neden olmaktadır (Hurkman and Tanaka 1987). Al-Khatib ve Paulsen (1990), buğday çeşitlerinde ekimden 14 gün sonra 2 hafta için veya çiçeklenmeden olgunlaşmaya kadar geçen sürelerde 32/27°C'lik yüksek sıcaklık uygulamasının fotosentetik oranı azalttığını bildirmiştir. Yüksek sıcaklık stresinin bir sonucu olarak C₃ bitkilerinde fotosentezdeki azalmanın, tilakoid membranlarında FSII kompleksinin inaktivasyonuna bağlı olarak elektron transfer aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir (Mishra and Singhal 1993, Havaux and Tardy 1996).

Fotosentetik aparatlar yüksek sıcaklık stresine hassas olmasına rağmen, termal tolerans subletal sıcaklıklara maruz kalma ile kazanılabilmektedir (Havaux 1993). Araştırmacı, patates bitkisinin 20 dakika için 35°C'lik sıcaklık uygulamasına maruz kalmasının fotosistem II kararlılığında önemli artışa neden olduğunu bildirmiştir. Bu hızlı uyum, tilakoid membranlarının lipit fazını stabilize eden (Havaux 1998) ksantofil zeaksantin yapraklarda birikimine bağlanmaktadır (Havaux and Tardy 1996).

2.3.2.1 Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi ve Termal Tolerans

Bitkiler yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında klorofil biyosentezi etkilenmektedir (van Hasselt and Strikwerda 1976, Feierabend 1977). Yüksek sıcaklıklar, klorofil biyosentezinde klorofilin iki öncü molekülü olan 5-aminolevulinik asit ve protoklorofillitin sentezinden sorumlu enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Feierabend 1977). Bu enzimler, yüksek sıcaklık stresinin sonucu olarak zarar gören veya translasyon sonrası modifiye edilen 5-aminolevulinik asit dehidrataz ve porfobilinojen deaminaz enzimleridir (Tewari and Tripathy 1998). Yüksek sıcaklıkta klorofil biyosentezinin inhibe olması nedeniyle fotosentetik aktivite azalmaktadır (Hodgins and van Huystee 1986). Diğer taraftan, buğdayın klorofil biriktirme yeteneğinin 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda zarar gördüğü bildirilmiştir (O'Mahony et al. 2000).

Sıcaklık stresine toleranslı varyetelerin geliştirilmesinde klorofil biyosentezi ve birikimindeki farklılıklar büyük öneme sahiptir. Bu bağlamda, letal sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra ışığa alınan etiyole dokularda klorofil birikimindeki inhibisyona ve letal olmayan yüksek sıcaklıklarda ön-uygulama ile bu inhibisyonun önlenmesi temeline dayanan basit, türe özgü olmayan, güvenilir ve doğru bir protokol geliştirilmiştir (Burke 1994).

Yüksek sıcaklık teşvikli zararın belirlenmesi için klorofil biyoassayı, birçok tarımsal üründe ve *Arabidopsis thaliana* bitkisinde kazanılan termotoleransın değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Burke 1994, 1998, Burke et al. 2000, O'Mohany et al. 2000, Dash and Mohanty 2001). Klorofil inhibisyon testi kullanılarak kazanılan termotoleransın doğru teşhisi için uygun sıcaklık parametrelerinin belirlenmesinin gerektiği bildirilmiştir (Burke 2001). Bu parametreler, klorofil birikimi, klorofil birikiminde maksimum azalmaya neden olan minimum letal sıcaklığı ve letal sıcaklığından önce maksimum klorofil birikimini sağlayan ön-uygulama sıcaklığı için "optimum sıcaklıkları" kapsamaktadır (Burke 2001).

Hekzaploid buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi Chinese Spring'in ditelosomik (bir koldan yoksun telosentrik kromozoma sahip bitki) serilerinde kazanılan termal toleransı için klorofil birikimindeki inhibisyon değerlendirilmiştir (O'Mohany et al. 2000). Maksimum klorofil birikimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi için etiyole yaprak segmentleri 10-45°C'ye maruz bırakılmış ve optimum sıcaklık olarak 30°C belirlenmiştir. Letal sıcaklığın belirlenmesi için etiyole yaprak segmentleri 30 dakika için 44-56°C arasındaki sıcaklıklara maruz bırakılmış; 48°C ve üzerinde klorofil birikimi %95'den fazla azalmıştır. Termal toleransın kazanılması, 48°C'de 30 dakika muameleden önce yaprak segmentlerinin 4 sa 34-46°C'de ön muamelesi ile değerlendirilmiş ve 40°C'lik ön muamele sıcaklığı klorofil birikiminde maksimum koruma sağlamıştır. Her bir ditelosomik hat 40°C'de 4 sa için uyumlanmış, 30 dakika için 48°C'ye maruz bırakılmış ve 20 saat için 30°C ve ışık uygulamasını takiben klorofil birikimi için değerlendirilmiştir. İlk taramadan sonra 32 hattın 9'u yüksek sıcaklık analizleri için seçilmiştir. Chinese Spring kontrol (WT, yabancı tip), letal sıcaklığa maruz kalmamış Chinese Spring fidelerinde gözlenen klorofil birikiminden yaklaşık %50 daha az birikim göstermiştir. 9 hattın 7'si yabancı tip kontrolle benzer klorofil birikimi göstermiştir. Diğer iki hat ise yabancı tip kontrole göre farklı klorofil birikimine sahiptir. Bu hatlardan biri, ön-uyum ve letal sıcaklığı takiben klorofil birikiminde sadece %10-20 azalma göstererek yabancı tipe göre daha yüksek klorofil seviyesine sahiptir. Bununla birlikte, diğer hattın yabancı tipte gözlenen klorofil birikiminin sadece %7'si kadar klorofil biriktirdiği bildirilmiştir (O'Mahony et al. 2000).

Kazanılan yüksek sıcaklık toleransının belirlenmesinde klorofil birikimi inhibisyon testinin kullanılabilirliği, soya fasulyesinde (*Glycine max* cv. Mitchell 450) değerlendirilmiştir (Burke 1998). Araştırmacı, 32°C'de 7 ila 14 gün süresince yetiştirilen etiyole soya fasulyesi fidelerini 32, 42, 44, 46, 48, 50, 52 veya 56°C sıcaklıklara 30 dakika süreyle maruz bırakmıştır. Karanlıkta yüksek sıcaklık uygulamalarını takiben optimum sıcaklığa (32°C) alınan fideler klorofil birikimi için 24 saat sürekli ışığa maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kotiledonlardaki klorofil birikiminin önemli derecede

engellendiğini göstermektedir. Diğer bir uygulamada, etiyole fideler farklı sıcaklık (32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 veya 46°C) ve sürelerde (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 ve 240 dakika) ön-uygulamayı takiben yüksek sıcaklık şokuna (50°C, 30 dakika) maruz bırakılmıştır. Etiyole soya fasulyesi kotiledonlarının 50°C'lik sıcaklık uygulamasından önce 38 veya 40°C'de 240 dakika için ön-uygulamanın yüksek sıcaklık şokunda klorofil birikiminin inhibisyonuna karşı maksimum koruma sağladığını göstermiştir. Sonuç olarak, yüksek sıcaklık toleransının belirlenmesinde klorofil birikimindeki inhibisyona dayanan bu testin etkili olduğu bildirilmiştir (Burke 1998).

Burke vd. (2000), mutantların kazanılan termal tolerans açısından seleksiyonunu ve *Arabidopsis*'in sıcaklık hassasiyetini klorofil birikimi testi ile karakterize etmiştir. *Arabidopsis*'in C24, Columbia ve RLD ekotiplerine ait fideler 4°C'de 6 ila 7 gün tutulduktan sonra 23 ila 25°C'de 48 saat için karanlıkta büyütülmüştür. Etiyole *Arabidopsis* fideleri, 25 (kontrol), 42, 44, 46, 48, 50, 52 veya 54°C sıcaklıklara farklı süreler (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 ve 1200 dakika) için maruz bırakılmıştır. Daha sonra etiyole *Arabidopsis* fideleri 25°C'de 24, 48 ve 72 saat için sürekli ışığa maruz bırakılmıştır. Etiyole *Arabidopsis* fidelerinin 48 veya 50°C'ye 30 dakika için maruz kalması klorofil birikimini tamamen inhibe etmiştir. Daha sonraki denemelerde, 72 saatlik ışık periyodu süresince klorofil birikimini engelleyen 50°C'de 30 dakika uygulaması letal sıcaklık olarak kullanılmıştır. Etiyole fideler, 28, 34, 36, 38, 40, 42 veya 44°C sıcaklıklarda 0, 15, 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika ön-uygulamaları takiben letal sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmış ve sonra etiyole fideler 16 saat sürekli ışığa maruz bırakılmıştır. Maksimum klorofil birikimini sağlayan 38°C'de 240 dakika uygulaması "optimum ön-uygulama sıcaklığı" olarak belirlenmiştir. Koruyucu bir ön-uygulama olan 44°C'de 30 dakika uygulaması kullanılarak kazanılan termotolerans bileşenlerinden yoksun mutantlar izole edilmiştir. İzole edilen ve termotoleransa sahip olmadığı varsayılan mutantların klorofil seviyeleri, 38°C'de 240 dakika uyumlama ve 50°C'de letal sıcaklık uygulamalarını takiben %10'dan %98'e aralanmıştır. Yüksek sıcaklık şoku uygulamasından önce maksimum kazanılan termotolerans için optimum ön-uygulama sıcaklığı AtTS02 ve RLD

fideleri için aynı olmasına rağmen AtTS02 mutantının mutlak klorofil birikimi seviyesi azalmıştır (Burke et al. 2000).

Dash ve Mohanty (2001), bazı buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin (HD-2307, HD-2327, HD-2402, HD-2643, HD-1553, C306 ve PBN51) termotolerans ve iyileşme (recovery) potansiyelini klorofil birikimi testi kullanarak değerlendirmiştir. 25°C’de büyütülmüş 4 günlük etiyolet fideler, 60 saatlik ışık periyodu süresince 25°C (kontrol) veya 40°C (yüksek sıcaklık stresi) sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklık stresini takiben fideler, 25°C’de 24 saat daha büyütülmüştür. Yaprak pigmentasyon analizleri, maksimum klorofil inhibisyonunun HD-2643 çeşidinde (%76) ve minimum inhibisyonun ise HD-2327 ve HD-2307 çeşitlerinde (%50-57) olduğunu göstermiştir. Çeşitlerin yüksek sıcaklığa maruz kalmış fidelerinde karotenoid birikiminin inhibisyonu %30-50 arasında olduğu belirlenmiştir. Klorofillere göre karotenoid pigmentasyonunun yüksek sıcaklığa daha az hassas olduğu bulunmuştur. Yüksek sıcaklığa maruz kalan fidelerin stres sonrası iyileşme periyodundaki pigmentasyonu çeşitler arasında önemli farklılıklar göstermiştir. İyileşme periyodundaki klorofil seviyesi incelendiğinde, HD-2327 çeşidinde klorofil seviyesinin maksimuma (%63) çıktığı gözlenmiştir. Buna ilaveten, karotenoidler çeşitler arasında farklı düzeylerde artış göstermiştir. Pigmentasyondaki inhibisyon ve çeşitli fizyolojik parametreler ile sekiz buğday çeşidi, yüksek sıcaklığa toleranslı (HD-2307 ve HD-2327), orta derecede termal toleranslı (HD-2329, HD-2402 ve C306), termal toleransı eksik (HD-1553 ve HD-2643) ve termal duyarlı (PBN51) olarak dört gruba ayrılmıştır (Dash and Mohanty 2001).

Camejo vd. (2005), domatesin (*Lycopersicon esculentum* L.) yüksek sıcaklığa duyarlı (Campbell-28) ve toleranslı (yabani Nagcarlang) birer genotipinde sıcaklık stresinin fotosentetik aktivite üzerine etkisini belirlemiştir. Bitkiler, 16:8 fotoperiyotta ($350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 25/20°C sıcaklık rejiminde yetiştirilmiş ve dördüncü yaprak evresinde iken 45°C’ye 2 saat için maruz bırakılmıştır. Yüksek sıcaklık stresi termal toleranslı genotipte klorofil ve karotenoid içeriğini

değiştirmiştir. Yüksek sıcaklık Nagcarland genotipinde klorofil *a* miktarını arttırırken klorofil *b* miktarını azaltmıştır. Yüksek sıcaklık stresi sırasında Nagcarland genotipinde karotenoid içeriğinin arttığı ve klorofil/karotenoid oranının kontrole göre önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Camejo et al. 2005).

Tewari ve Tripathy (1998), 25°C'de büyütülmüş 4 günlük etiyole kabak (*Cucumis sativus* L. cv. Poinsette) fidelerini 25°C (kontrol) ve 42°C (yüksek sıcaklık stresi) sıcaklık uygulamalarına transfer etmiş ve 6, 12, 24 ve 48 saat için flüoresan ışığına (30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) maruz bırakmıştır. Maksimum klorofil birikimi 48 saatlik ışık uygulamasındaki kontrol fidelerinde elde edilmiştir. Yüksek sıcaklık stresi altında klorofil sentezi azalma %90 seviyesinde bulunmuştur (Tewari and Tripathy 1998).

Yüksek sıcaklık stresine maruz kalan buğday çeşitleri arasında net fotosentez oranındaki farklılıkların düşük klorofil konsantrasyonu ve hızlı yaprak senesensinden dolayı klorofil *a/b* oranındaki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Harding et al. 1990). Bu bağlamda, yüksek sıcaklıktaki performansın fotosentez oranındaki değişikliklerle ilişkili olduğu soya fasulyesi (Wells et al. 1982), pamuk (Cornish et al. 1991) ve pirinç (Sasaki and Ishii 1992) gibi bazı tarımsal ürünlerde bildirilmiştir.

2.3.3 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri

Yüksek sıcaklık stresi bitkilerin metabolizmasını olumsuz etkilemekte ve proteinlerin sentezi ile hidrolizini etkileyerek hücrel dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Birçok tarla bitkisinde 40°C üzerindeki sıcaklıklardan önemli düzeyde olumsuz etkilenen olay protein metabolizmasıdır (Dubey 1999). Yüksek sıcaklık stresi, proteinlerin intra- ve intermoleküler bağlarında değişikliklere neden olarak enzimatik fonksiyonlarını ve çözünebilirliklerini azaltabilmektedir. Artan sıcaklıklarda non-kovalent bağlar kırılabilen ve proteinlerin katlanma evrelerini içeren kompleks bir işlev olan denatürasyona neden olmaktadır (Buchner et al. 1998). Yüksek sıcaklık ile denatüre olan proteinler geri

dönüşümsüz olarak çökelmekte ve diğer denatüre proteinlerle hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Bu nedenle, proteinlerin fonksiyonel yapılarının korunması, doğal proteinlerin çökmesinin engellenmesi, denatüre olmuş proteinlerin yeniden fonksiyonel yapılarının kazanması ve fonksiyonel olmayan, fakat potansiyel olarak zararlı polipeptitlerin (denatürasyon veya çökme ile meydana gelen) uzaklaştırılması stres koşulları sırasında hücrelerin hayatta kalması için oldukça önemlidir (Wang et al. 2004).

Yüksek sıcaklık stresine maruz kalan birçok organizmada, yüksek sıcaklık şoku proteinleri (YSSP'ler) olarak adlandırılan bir grup proteinin sentezlendiği bildirilmiştir (Vierling 1991, Simões-Araújo et al. 2003). Yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin bazıları optimum sıcaklıklarda hücrede eksprese edilirken, birçok YSSP'nin sentezi yüksek sıcaklık şoku ile teşvik edilmektedir. Ayrıca, YSSP'lerin biyosentezi sadece yüksek sıcaklık stresi ile teşvik edilmemekte aynı zamanda tuzluluk, ağır metal, üşütme ve oksidatif stres gibi faktörler de bu proteinlerin teşvikini arttırmaktadır (Schöffl et al. 1998, Wang et al. 2003).

Bütün organizmalar çevresel streslerin üstesinden gelebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Aşırı yüksek sıcaklık, bitkilerde geri dönüşümsüz zarara veya ölüme neden olmasına rağmen, daha yüksek seviyede termal tolerans kazanılmasına neden olan subletal sıcaklık, yüksek sıcaklık şoku cevabını teşvik etmektedir (Burke et al. 2000, Neill et al. 2002, Sung et al. 2003, Kacperska 2004). Bitkiler bir kez yüksek sıcaklık toleransının yüksek bir seviyesini kazanırsa, belli bir seviyeye kadar letal yüksek sıcaklığın üstesinden gelebilmekte ve stres koşulları sona erdiğinde normal hücresel aktivitelerini devam ettirebilmektedir (Boston et al. 1996). Yüksek sıcaklık toleransının kazanılması sırasında yüksek sıcaklık şoku faktörleri (YSSF) ve yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin (YSSP) transkripsiyonu ve translasyonu önemli olaylardır (Vierling 1991, Shinozaki et al. 2003, Rizhsky et al. 2004, Busch et al. 2005). İlgili gen ve proteinlerin ekspresyonunun artan termal tolerans için önemli olduğu belirtilmiştir (Prandl et al. 1998, Keeler et al. 2000, Queitsch et al. 2000, Mishra et al. 2002, Hong et al. 2003).

Moleküler ve genetik çalışmalar, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin stres teşvikli genlerin regülasyonunda rol oynadığını göstermiştir (Uno et al. 2000, Sakuma et al. 2002, Doubuzet et al. 2003). Bray vd. (2000), gen ifadesindeki değişikliklerin optimum büyüme sıcaklığından en az 5°C daha yüksek sıcaklıklarda gözlemlendiğini bildirmiştir.

2.3.3.1 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinlerinin Grupları

Bitkilerde ve diğer ökaryotlarda sentez edilen YSSP'ler moleküler ağırlıklarına (MA) göre beş büyük gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.2):

1) YSSP100 (MA, 100-114 kDa)

2) YSSP90 (MA, 80-94 kDa)

3) YSSP70 (MA, 63-78 kDa)

4) YSSP60 (MA, 53-62 kDa)

5) Küçük veya düşük moleküler ağırlıklı YSSP'ler (MA, 15-30 kDa) (Vierling 1991, Waters et al. 1996, Sun et al. 2002).

Termal toleransın kazanılması sadece yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin sentezine bağlı değil, aynı zamanda bu proteinlerin hücresel lokalizasyonuna da bağlı olduğu rapor edilmiştir (Chou et al. 1989, Heckathorn et al. 1999). Yüksek sıcaklık şoku proteinleri (moleküler şaperonlar) hem sitoplazmada hem de nükleus, kloroplast, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerde lokalize olmaktadır (Waters et al. 1996).

YSSP100/Clp ailesi: Protein agregasyonunu ve hatalı katlanmasını önleyen normal şaperon fonksiyonunun aksine YSSP100 ailesi protein disagregasyonu ve/veya parçalanmasında (degradasyon) fonksiyona sahiptir (Wang et al. 2004). Hatalı katlanma, denatürasyon veya agregasyon sonucu oluşan ve fonksiyona sahip olmayan, fakat potansiyel olarak zararlı polipeptitlerin uzaklaştırılması, hücresel dengenin sürdürülmesi için oldukça önemlidir. YSSP100/Clp proteinleri *Arabidopsis*, soya fasulyesi, tütün, pirinç, mısır, buğday ve Lima fasulyesi

(*Phaseolus lunatus*) gibi birçok bitki türünde rapor edilmiştir (Keeler et al. 2000, Agarwal et al. 2001).

Çizelge 2.2 Bitki YSSP/moleküler şaperonları ve subfamilyaları (Wang et al. 2004'den değiştirilerek)

Sınıf	Üyeleri	Hücre içi lokalizasyon	Fonksiyonu	Kaynak
YSSP100/Clp	YSSP100			
Subfamilya:				
Sınıf I	ClpB, ClpA/C, ClpD	Sitozol Mitokondri	- Disagregasyon - Katlanmama	Glover and Lindquist 1998 Goloubinoff et al. 1999
Sınıf II	ClpM, ClpN, ClpX, ClpY	Kloroplast		
YSSP90	YSSP90			
	AtYSSP90-1	Sitozol	- Sinyal moleküllerinin hazır hale gelmesini kolaylaştırmak	Boston et al. 1996 Young et al. 2001
	AtYSSP90-5	Kloroplast		
	AtYSSP90-6	Mitokondri	- Genetik tamponlama	Krishna and Gover 2001
	AtYSSP90-7	ER		
YSSP70			- Protein çökmesinin engellenmesi - Proteinin yeniden katlanması ve translokasyonunun sağlanması	
Subfamilya:				
DnaK	YSSP/YSSK70	Sitozol		Waters et al. 1996
	YSSP70	Kloroplast Mitokondri		Frydman 2001
	Bip	ER		
HSP110/SSE	YSSP91	Sitozol	- Sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonel aktivasyon	
YSSP60/Şaperonin				
Subfamilya:				
Grup I	Cpn60	Kloroplast Mitokondri	Katlanma ve yeniden katlanmanın sağlanması	Waters et al. 1996 Ranson et al. 1998
Grup II	CCT	Sitozol		
kYSSP				
Subfamilya:				
I	YSSP17.6	Sitozol		
II	YSSP17.9	Sitozol	Protein çökmesinin engellenmesi ve doğal	Waters et al. 1996
III	YSSP21 YSSP26.2	Kloroplast	proteinlerin stabilize edilmesi	Lee and Vierling 2000
IV	YSSP22	ER		
V	YSSP23	Mitokondri		
VI	YSSP22.3	Membran		

Diğer birçok YSSP gibi YSSP100 grubu proteinler, bitkilerde sıklıkla eksprese edilir, fakat bu proteinlerin ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenmekte ve yüksek sıcaklık, üşüme, dehidrasyon, yüksek tuzluluk veya karanlık teşvikli etiyolasyon gibi farklı çevresel etkiler tarafından teşvik edilmektedir (Queitsch et al. 2000, Agarwal et al. 2001, Adam and Clarke 2002). Keeler vd. (2000), Lima fasulyesinde sitozolik ve kloroplastik YSSP100 proteinin ekspresyonu ve yüksek

sıcaklık cevabı arasında ilişki olduğunu bildirmiştir. YSSP100 grubunun, proteinlerin termal korunmasında rol oynadığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Schirmer et al. 1994, Lee et al. 1994).

YSSP90 ailesi: Bu ailenin üyeleri yaklaşık olarak 80-90 kDa arasındaki proteinleri kapsamaktadır (Vierling 1991). YSSP90, fonksiyon gösterebilmesi için ATP'ye gereksinim duyan moleküler şaperon türlerinden biridir. Ayrıca, toplam hüresel proteinin %1-2'sini oluşturarak hücrede en fazla bulunan protein grubu olup, protein katlanmasının yönlendirilmesinin (Frydman 2001) yanı sıra sinyal iletim ağlarında, hücre döngüsünün kontrolünde, protein parçalanmasında ve protein etkileşimlerinde de (Young et al. 2001) önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, YSSP70 ile birlikte multişaperon makinesi olarak görev yapmaktadır (Zhang et al. 2003). Sitozol, endoplazmik retikulum ve plastidlerde lokalize olan YSSP90 genleri birkaç bitki türünden izole edilmiş ve amino asit sekansının diğer ökaryotlarla %63-71 özdeşlik gösterdiği bildirilmiştir (Krishna and Gloor 2001). YSSP90 grubu proteinler birçok organizmada normal olarak eksprese olmasına rağmen, bu proteinlerin ekspresyonu hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda strese tepki olarak artmaktadır. *Arabidopsis*'de YSSP90'ın ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenmekte ve yüksek sıcaklık, üşüme, tuz stresi, ağır metaller ve bitki hormonları gibi etmenlere tepki göstermektedir (Krishna and Gloor 2001).

YSSP70 ailesi: Normal ve stres koşulları altında agregasyonun önlenmesi ve doğal yapısı bozulmuş (non-native) proteinlerin tekrar katlanmasında zorunlu fonksiyona sahiptir (Frydman 2001). Protein transportu ve translokasyon işlevlerinde ve kararsız proteinleri lizozom veya proteazomlara hedef göstererek bu proteinlerin proteolitik parçalanmasını kolaylaştırmada fonksiyon göstermektedir (Hartl 1996). Bu grubun üyeleri, *de novo* sentezlenen polipeptitlerin katlanmasına yardımcı olmakta ve öncü proteinlerin taşınımı/translokasyonunu sağlamaktadır. Grubun bazı üyeleri ise sadece çevresel etkiler sonucu eksprese edilmektedir. Bu nedenle, doğal yapısı bozulmuş proteinlerin yeniden katlanması ve proteolitik parçalanmasının kolaylaştırılmasını sağlamaktadır (Miernyk 1997, Frydman 2001). Ek olarak, YSSP70 proteinlerinin

bazı üyeleri, katlanmış düzenleyici proteinlerin biyolojik aktivitesinin kontrol edilmesini sağlamakta ve transkripsiyon ile ilişkili yüksek sıcaklık şoku faktörünün (YSSF) negatif baskılayıcısı olarak fonksiyon gösterebilmektedir (Hartl 1996, Morimoto 1998). Kim ve Schöffl (2002), YSSP70 ve YSSF arasındaki etkileşimin YSSF'nin yüksek sıcaklık şoku elementine (YSSE) trimerizasyonunu ve bağlanmasını engellediğini ve böylelikle yüksek sıcaklık genlerinin YSSF'leri tarafından aktivasyonunun bloke olduğunu bildirmiştir.

Birçok YSSP70, farklı bitki türlerinde teşhis edilmiştir (Vierling 1991). *Arabidopsis* genomu, YSSP70 üyelerini kodlayan en az 18 gene sahiptir ve en az 12 YSSP üyesi ıspanak genomunda bulunmuştur (Guy and Li 1998). *Arabidopsis* ve ıspanak YSSP70 genlerinin ekspresyon profil analizleri, YSSP70 üyelerinin yüksek sıcaklık, üşütme, kuraklık ve kimyasal kirlenme gibi çevresel koşullara cevap olarak eksprese edildiğini göstermiştir (Lin et al. 2001). YSSP70 genlerinin ekspresyonu termal toleransın kazanılması ile pozitif olarak ilişkilidir (Lee and Sshöffl 1996) ve tuz, su ve yüksek sıcaklık stresine karşı artan tolerans ile sonuçlanmaktadır (Sung et al. 2003). Bununla birlikte, stres koşulları altında YSSP70 fonksiyonunun hücrel mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır (Wang et al. 2004).

YSSP60/Şaperonin ailesi: Bu grubun üyeleri “moleküler şaperonlar” olarak ifade edilen ilk YSSP'lerdir (Ellis 1987). Şaperonin, prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondri ve plastidlerinde bulunmaktadır (Boston et al. 1996). Şaperoninler ileri bir sınıflandırma ile iki alt gruba ayrılmaktadır: GroE (Grup I) şaperoninler bakteri, mitokondri ve kloroplastlarda bulunurken, Grup II şaperoninler Archea'da ve ökaryotların sitozolünde bulunmaktadır (Ranson et al. 1998). Şaperoninler, yeni sentez edilen ve yeni transloke olmuş proteinlerin doğal formlarının kazanılmasına yardımcı olarak önemli bir rol oynamaktadır (Boston et al. 1996). Özellikle grup I şaperoninlerin yapısı ve fonksiyonu kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Hartl 1996, Frydman 2001). Prokaryotlarda grup I şaperoninler, şaperonin 60 (Cpn60) ve şaperonin 10 (Cpn10) olmak üzere iki farklı üyeden oluşmaktadır. Bununla birlikte, mevcut çalışmalar plastid şaperoninlerinin tek bir

yapısal ve fonksiyonel özelliğe sahip olduğunu ve bu özellikleri ile bakteriyal homologlarından ayrıldığını göstermiştir (Levy-Rimler et al. 2002). Bitki kloroplast şaperoninleri yaklaşık %50 amino asit özdeşliği gösteren Cnp60 α ve Cnp60 β polipeptitlerinden oluşmaktadır (Boston et al. 1996).

Küçük YSSP (kYSSP) ailesi: Küçük veya düşük moleküler ağırlıklı YSSP'ler 15-30 kDa molekül ağırlığındaki proteinleri kapsamaktadır. Bitkilerde kYSSP'ler sekans benzerliği, hücresel lokalizasyon ve fonksiyonları açısından diğer şaperon ailelerinden ayrılmaktadır (Vierling 1991, Waters et al. 1996). Küçük YSSP'leri, sekans sıralamasına, immünolojik çapraz-reaktivitesine ve hücresel lokalizasyonuna göre altı farklı sınıfa gruplanmaktadır. Bu proteinlerin üç grubu (CI, CII ve CIII) sitoplazma veya nükleusta ve diğer gruplar endoplazmik retikulum, mitokondri ve kloroplastlarda lokalize olmaktadır (Sun et al. 2002). kYSSP'ler yüksek sıcaklık ve diğer streslere tepki olarak prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde sentezlenmekte ve bazı kYSSP'ler embriyogenez, çimlenme ve meyve oluşumu gibi çeşitli gelişim evrelerinde teşvik edilebilmektedir (Waters et al. 1996, Sun et al. 2001).

Küçük YSSP'lerin doğal yapısı bozulmuş (non-native) proteinleri tekrar katlayamadığı bildirilmiştir (Lee and Vierling 2000). Ancak, kısmen katlanmış veya denatüre olmuş proteinlere bağlanarak agregasyonunu engellediği ve diğer şaperonlar ile doğru katlanmaya yardımcı olduğu ileri sürülmektedir (Sun et al. 2002). *In vitro* koşullar altında sırasıyla *Pisum sativum*'dan ve *Synechocystis* sp. PCC6803'den izole edilen kYSSP18.1 ve 16.6'nın denatüre proteinlere bağlandığı ve YSSP70/YSSP100 kompleksleri tarafından bu proteinlerin yeniden katlanmasını sağladığı bildirilmiştir (Mogk et al. 2003).

Bitkilerde kYSSP'lerin bol miktarda bulunuşu ve denatüre proteinlere bağlanma ve stabilize etme gibi fonksiyonel özellikleri, bu proteinlerin bitkilerde stres toleransının kazanılmasında önemli role sahip olduğu fikrini ileri sürmektedir (Sun et al. 2002, Wang et al. 2003). Bununla birlikte, kYSSP'ler birkaç nedenden dolayı bitkilerde ilgi çekmiştir. İlk olarak, kYSSP'ler yüksek sıcaklık stresi

sırasında protein sentezi profilinin büyük kısmını oluşturmakta ve yüksek sıcaklık stresi koşulları altındaki soya fasulyesinde toplam yaprak proteininin %1'den fazlasını oluşturmaktadır (DeRocher et al. 1991, Hsieh et al. 1992). İkinci olarak, kYSSP'lerin evrimsel olarak farklılaşması bitkilere özgüdür. Tipik olarak diğer ökaryotlar sadece birkaç kYSSP'ye sahipken bitkiler en az altı farklı gen grubuna ayrılan 30-60 gene sahiptir. Son olarak, türler ve yapay olarak seçilmiş tarımsal ürün genotipleri arasında kYSSP'lerin yüksek sıcaklığa tepkilerinde farklılıklar bulunmuş ve bu farklılıkların termal tolerans ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ougham and Stoddart 1986, Nguyen et al. 1989, Water 1996, Park et al. 1996, 1997, Lee and Vierling 2000, Simões-Araújo et al. 2003). Bununla birlikte, kYSSP'lerin fonksiyonu kesin olarak belirlenmiş olmamasına rağmen, stres koşulları sırasında moleküler şaperonlar olarak rol oynadığına dair deliller bulunmaktadır (Sun et al. 2002). Diğer taraftan, Zhang vd. (2005), kYSSP'lerin normal hücrel fonksiyonlar için gerekli olup olmadığı hakkında kanıt bulunmadığını bildirmiştir. Araştırmacı, stres olmayan koşullarda *Festuca* genotiplerinde kYSSP geninin eksprese edilmediğini ve yüksek sıcaklık stresi (39°C, 42°C ve 44°C) altında daha fazla eksprese edildiğini bildirmiştir. Ancak, yüksek sıcaklık uygulamalarında termal toleranslı genotipe göre termal duyarlı genotipte kYSSP geninin daha fazla eksprese edildiği belirlenmiştir (Zhang et al. 2005).

Heckathorn vd. (1998), kloroplast kYSSP'lerinin yüksek sıcaklık stresi sırasında fotosistem II oksijen-çıkış proteinlerinin kararlı halde kalmasında direkt rol oynadığını ve böylelikle fotosistem II elektron taşıma sisteminin devam ettirildiğini bildirmiştir. Kloroplast kYSSP'lerinin oksijen çıkışını sağlayan proteinleri yüksek sıcaklık stresinin denatürasyon etkisinden koruduğu, ancak kYSSP'lerin denatüre olmuş proteinleri tekrar aktive edemediği bildirilmiştir (Heckathorn et al. 1999). Miyao-Tokutomi vd. (1998), transjenik tütün bitkisinde kYSSP ekspresyonunun fotosistem II'nin termal toleransında artışa neden olduğunu bildirmiştir. Ek olarak, yüksek sıcaklık toleransında kloroplastta lokalize olmuş kYSSP'lerin rolü için daha fazla delil, domates (Preczewski et al. 2000) ve *Agrostis palustris* (Park et al. 1996) gibi iki farklı bitki türünden elde

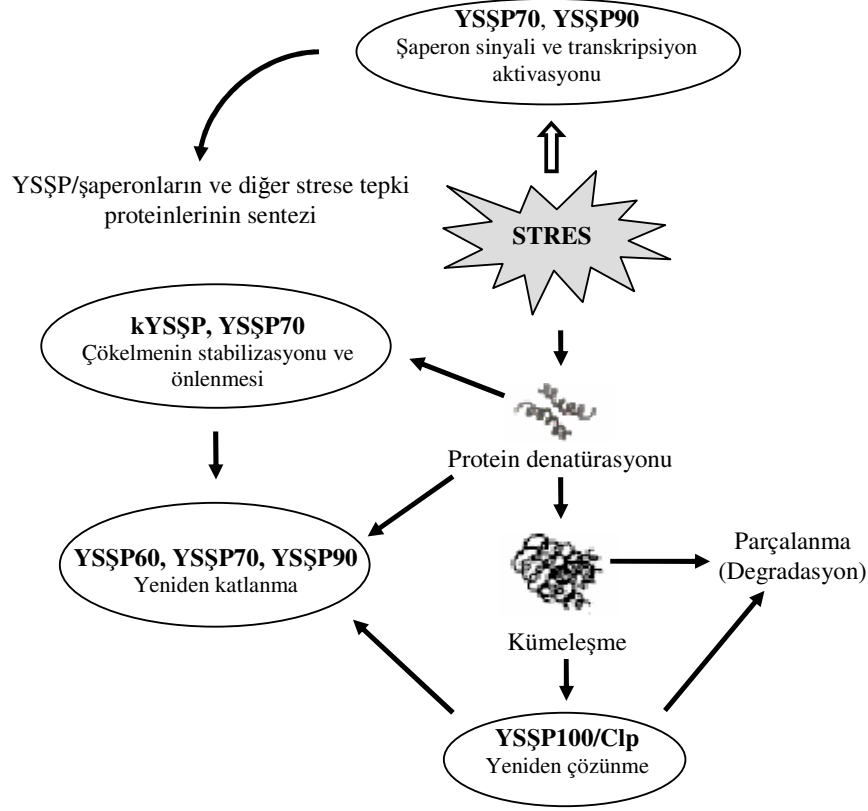
edilmiştir. Preczewski vd. (2000), 24 kDa molekül ağırlığındaki kloroplast küçük yüksek sıcaklık proteinin FSII'yi yüksek sıcaklık stresine karşı koruduğunu ve bu proteinin sentezindeki fenotipik varyasyonun FSII termal toleransı ile pozitif olarak ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, mitokondriyal kYSSP'lerin birikiminin mitokondrilerin termal toleransı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chou et al. 1989, Sanmiya et al. 2004).

2.3.3.2 Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri ve Moleküler Şaperon Ağı

Yüksek sıcaklık stresi sırasında sentezlenen birçok proteinin, hücresel dengenin sürdürülmesi için diğer hücresel proteinleri yüksek sıcaklığın geri dönüşümsüz denatürasyonuna karşı koruyan ve zarar görmüş proteinlerin yeniden katlanmasını kolaylaştıran “moleküler şaperonlar” olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Boston et al. 1996, Wang et al. 2004). Moleküler şaperonlar; normal hücresel işlevlerde protein katlanması, birleşmesi, translokasyonu ve parçalanmasından sorumludur. Proteinlerin ve membranların kararlı hale getirilmesinde fonksiyona sahiptir ve stres koşulları altında proteinlerin yeniden katlanmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, birçok moleküler şaperon stres proteindir ve birçoğu yüksek sıcaklık şoku proteini (YSSP) olarak teşhis edilmiştir (Lindquist and Craig 1988, Schöffl et al. 1998). Bu nedenle, bu proteinler YSSP/şaperonlar olarak adlandırılmıştır (Wang et al. 2004).

YSSP'lerin farklı grupları hücresel korumada birlikte hareket etmekte ve proteinlerin korunmasında tamamlayıcı rol oynamaktadır (Şekil 2.1) (Wang et al. 2004). YSSP/şaperonların farklı grupları, stres koşullarında proteinlerin korunmasında rol oynamaktadır. Bitkilerde abiyotik stres koşulları, yapısal ve fonksiyonel proteinlerde fonksiyon kaybına ve denatürasyona neden olmaktadır. Proteinlerin fonksiyonel konformasyonlarının sürdürülmesi ve protein çökmesinin engellenmesi, stres koşulları sırasında hücre canlılığı için oldukça önemlidir. Hücresel dengenin sürdürülmesi için YSSP'lerin bazı üyeleri (kYSSP ve YSSP70) protein konformasyonunu stabilize etmekte, çökelmeyi engellemekte ve böylelikle diğer YSSP'ler (YSSP60, YSSP70 ve YSSP90) tarafından sağlanan

tekrar katlanma için proteinlerin kararlı halinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Denatüre olmuş veya hatalı katlanmış proteinler çökelti oluşturduğunda, YSSP100 bu çökeltinin tekrar çözünmesini ve katlanmasını sağlamakta veya proteaz ile parçalamaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Abiyotik stres cevabında yüksek sıcaklık şoku proteini (YSSP) ve şaperon ağı (Wang et al. 2004'den değiştirilerek)

2.4 Bitkilerde Primer ve Sekonder Streslere Karşı Tolerans Cevabı

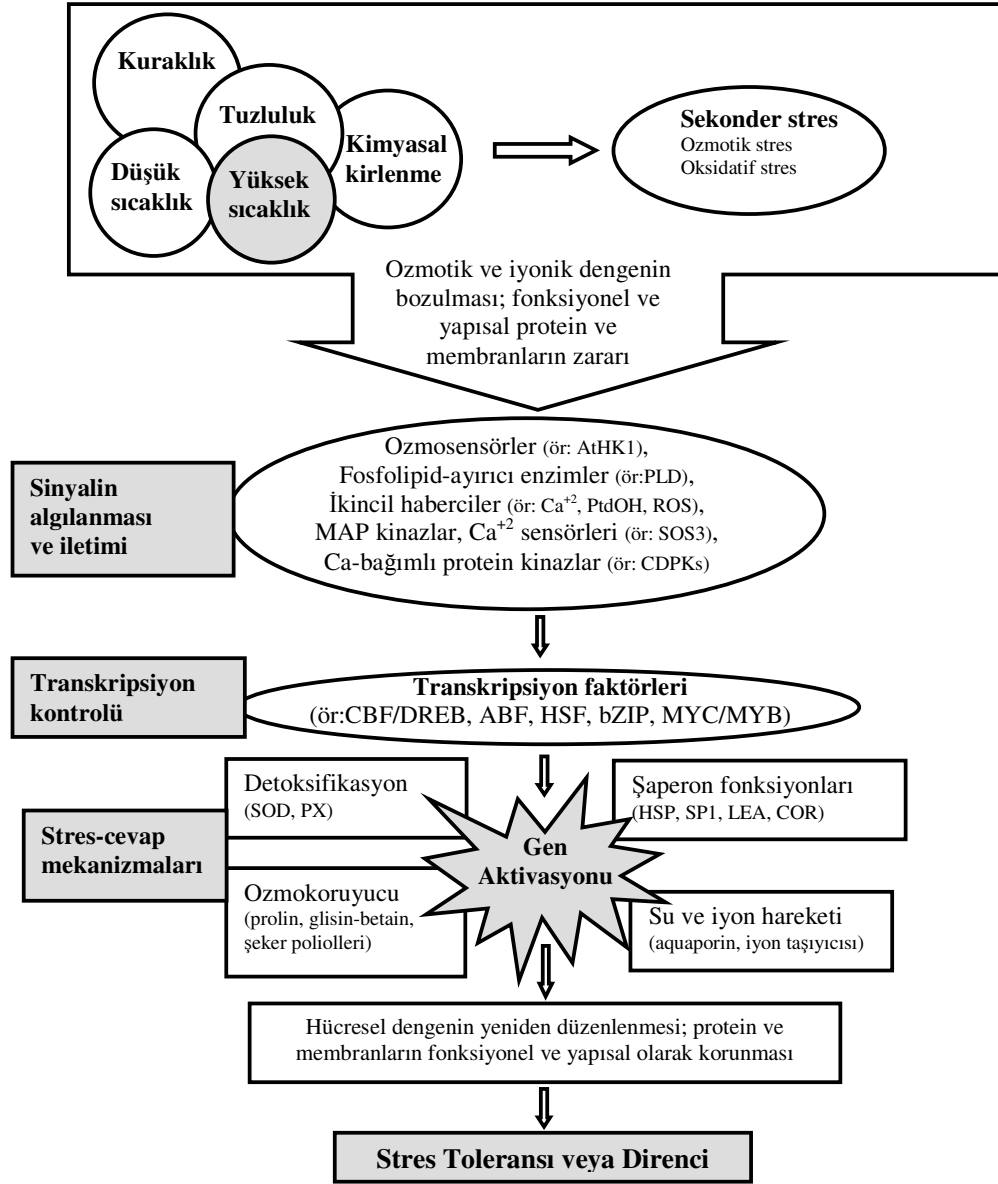
Yüksek sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi primer stresler hüresel zarara ve ozmotik ile oksidatif stres gibi sekonder streslere neden olmaktadır. Abiyotik streslere bitki cevapları, birçok geni ve biyokimyasal-moleküler mekanizmayı içeren karmaşık olaylar zinciridir (Şekil 2.2).

Yüksek toleransa sahip bitkilerin geliştirilmesi için abiyotik stres toleransının moleküler kontrol mekanizmaları, stresle ilişkili spesifik genlerin ifadesine dayanmaktadır. Bu genler; (i) sinyal iletiminde görev yapan enzimler ve transkripsiyon faktörlerini (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000, Zhu 2001), (ii) membranların ve proteinlerin direkt olarak korunmasında fonksiyonu olan yüksek sıcaklık şoku proteinleri (YSSP'ler)/şaperonlar, geç embriyogenez (LEA) proteinleri (Vierling 1991, Tomashow 1999, Bray et al. 2000), ozmokeruyucular ve serbest radikal uzaklaştırıcıları (Bohnert and Sheveleva 1998) ve (iii) aquaporin ve iyon taşıyıcıları gibi su ve iyon alımını (Blumwald 2000) sağlayan genleri içermektedir. Ozmotik ve iyonik etkiler, sıcaklık veya membran akışkanlığındaki değişimler gibi ilk stres sinyalleri hücrenin tekrar düzenlenmesi, zarar görmüş protein ve membranların korunması veya tamiri için stres-cevap mekanizmalarını aktive eden bir sonraki sinyal basamaklarını ve transkripsiyon kontrollerini tetikler. Sinyal veya gen aktivasyon işlevlerinin bir veya birkaç basamağındaki yetersiz cevap, hücrenin ölümüne neden olan hücrenin dengede geri dönüşümü olmayan değişiklikler ve fonksiyonel ve yapısal protein ve membranların bozulması ile sonuçlanır (Wang et al. 2003).

Primer ve sekonder stresler, fonksiyonel ve yapısal proteinlerin denatürasyonuna neden olabilmektedir (Smirnoff 1998). Farklı çevresel stres koşulları benzer hücrenin sinyal iletim yollarını (Knight and Knight 2001) ve stres proteinleri, antioksidantların regülasyonu ve çözünenlerin birikimi (Vierling and Kimpel 1992, Zhu et al. 1997, Cushman and Bohnert 2000) gibi çeşitli hücrenin cevaplarını aktive etmektedir.

Büyüme ve verimliliği devam ettirmek için bitkiler stres koşullarına adapte olmak ve spesifik tolerans mekanizmalarını geliştirmek zorundadır. Artan tolerans için bitki modifikasyonu çoğunlukla hücrenin bileşenlerinin yapısını ve fonksiyonunu koruyan ve devam ettiren genlerin manipülasyonuna dayanmaktadır. Mevcut çalışmalar, ozmolitler ve antioksidantlar gibi fonksiyonel ve yapısal koruyucuların sentezine neden olan mevcut enzimlerin kodlanması veya stres toleransı ile ilişkili

proteinlerin kodlanması gibi sinyal ve düzenleyici yollarda fonksiyon gören bir veya birkaç genin transferine dayanmaktadır (Wang et al. 2003).



Şekil 2.2 Abiyotik streslere bitki cevapları. Kısaltmalar: AtHK1, *Arabidopsis thaliana* histidin kinaz-1; PLD, Fosfolipaz D; PtdOH, Fosfatidik asit; ROS, Reaktif oksijen türleri; MAP, Mitojen-aktive protein; bZIP, Bazik lösin fermuar transkripsiyon faktörü; CBF/DREB, C-Tekrar-bağlanma-faktörü/dehidrasyon-cevap bağlanma proteini; COR, Düşük sıcaklık-cevap proteini; HSP, Yüksek sıcaklık şoku proteini; LEA, Geç embriyogenez proteini; PX, Peroksidaz; SOD, Süperoksit dismutaz; SP1, Kararlı protein 1. (Wang et al. 2003'dan değiştirilerek)

Bu araştırmada, Türkiye’de ekimi yapılan 16 ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) ve 14 makarnalık (*Triticum durum* Desf.) buğday çeşidinin erken fide evresinde farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan fidelerin ilk yaprak dokularında hücre canlılığı [2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) indirgenme testi] ve fotosentetik pigmentlerin (klorofil *a*, *b* ve karotenoidler) birikimi değerlendirilmiştir. Diğer taraftan, 37→50°C/25°C oranında (%) klorofil *a+b* birikimindeki azalma bakımından tüm çeşitlerin ortalamasına (%48.40) göre en az klorofil kaybeden ve termal toleranslı olarak kabul edilen ekmeklik Gönen-98 (%32.13) ve makarnalık Ege-88 (%45.19) buğday eşitleri ile en fazla klorofil kaybeden ve termal duyarlı olarak kabul edilen ekmeklik Cumhuriyet-75 (%60.06) ve makarnalık Ankara-98 (%67.14) buğday eşitleri farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılmış ve ilk yaprak dokularından izole edilen total çözünebilir proteinlerdeki genotipik çeşitlilik iki-yönlü (2-D) SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (IEF/SDS-PAJE) tekniği ile analiz edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Kimyasallar

Bu araştırmada kullanılan kimyasallar Sigma, Merck ve Riedel de-Haën'in analitik grade ürünleridir. Besin çözeltisi monodistile su ve diğer çözeltiler ise bidistile su ile hazırlanmıştır.

3.2 Tohumların Temini

Bu araştırmada kullanılan hekzaploid ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) ve tetraploid makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşitlerine ait tohumların tescil tarihleri ve temin edildiği araştırma enstitüleri Çizelge 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Hekzaploid ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerine ait tohumların tescil tarihleri ve temin edildiği araştırma enstitüleri

	Çeşit adı	Tescil Tarihi	Tarımsal Araştırma Enstitüsü / İl
1	Bezostaya-1	19.03.1968	Anadolu / Eskişehir
2	Gerek-79	15.05.1979	Anadolu / Eskişehir
3	Altay-2000	28.04.2000	Anadolu / Eskişehir
4	Sönmez-2001	24.04.2001	Anadolu / Eskişehir
5	Cumhuriyet-75	13.05.1976	Ege / İzmir
6	İzmir-85	15.10.1985	Ege / İzmir
7	Kaşıfbey-95	20.04.1995	Ege / İzmir
8	Ziyabey-98	12.05.1998	Ege / İzmir
9	Basribey-95	20.04.1995	Ege / İzmir
10	Gönen-98	12.05.1998	Ege / İzmir
11	Meta-2002	02.05.2002	Ege / İzmir
12	Gün-91	26.04.1991	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
13	İkizce-96	16.04.1996	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
14	Adana-99	26.04.1999	Çukurova / Adana
15	Ceyhan-99	26.04.1999	Çukurova / Adana
16	Pandas	24.04.2001	Çukurova / Adana

Çizelge 3.2 Tetraploid makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşitlerine ait tohumların tescil tarihleri ve temin edildiği araştırma enstitüleri

	Çeşit adı	Tescil Tarihi	Tarımsal Araştırma Enstitüsü / İl
1	Kunduru-1149	26.04.1967	Anadolu / Eskişehir
2	Yelken-2000	28.04.2000	Anadolu / Eskişehir
3	Ege-88	26.04.1988	Ege / İzmir
4	Salihli-92	12.05.1992	Ege / İzmir
5	Şölen-2002	02.05.2002	Ege / İzmir
6	Tüten-2002	02.05.2002	Ege / İzmir
7	Gediz-75	13.05.1976	Ege / İzmir
8	Çakmak-79	15.05.1979	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
9	Kızıltan-91	26.04.1991	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
10	Ankara-98	12.05.1998	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
11	Çeşit-1252	26.04.2000	Tarla Bitkileri Merkez / Ankara
12	Amanos-97	06.05.1997	Çukurova / Adana
13	Fuatbey-2000	28.04.2000	Çukurova / Adana
14	Aydın-93	02.05.2002	Güneydoğu Anadolu / Diyarbakır

Elde edilen tohumlar, böceklenme ve enfeksiyonu önlemek için kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Denemelerde kullanılan sağlıklı tohumlar yaklaşık aynı boyutta ve renkte olacak şekilde seçilmiştir.

3.3 Tohum Yüzey Sterilizasyonu

Ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) ve makarnalık (*Triticum durum* Desf.) buğday çeşitlerine ait tohumların %2'lik sodyum hipokloritte 15 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu sallayıcı üzerinde yapılmıştır. Sterilizasyonu takiben tohumlar 3 kez distile sudan geçirilmiştir.

3.4 Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Steril edilen tohumlar kontrollü iklim kabininde 25°C'de 5 sa şişirilmiştir. Denemelerde uygulanan sıcaklık değeri, istenilen sabit değer 1°C altında veya üzerindedir ($\pm 1^\circ\text{C}$). Hücre canlılık testi (2,3,5-trifeniltetrazolium klorür

indirgenme testi), fotosentetik pigment birikimi ve protein analizleri için içerisinde distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan 20×11.5×5 cm boyutlarında ve kapağında hava giriş çıkışına uygun yaklaşık 1 mm çapında delikler bulunan şeffaf plastikten yapılmış çimlendirme kaplarında büyütülmüş fideler kullanılmıştır. Her bir analizde çeşitlere ait tohumlar, 25°C'de ve yaklaşık %60 nemde 2 gün süreyle karanlıkta çimlendirilmiştir. Bu süre sonunda, yaklaşık olarak aynı koleoptil ve kök uzunluğuna sahip olan fideler seçilmiştir. Bu aşamada ve sonrasında kaplara yarı yarıya sulandırılmış Hewitt besin çözeltisi, denemeler süresince gerektiğinde kaplara ilave edilmiştir. Araştırmamızda, fotoperiyot uygulamasında toplam ışık şiddeti yaklaşık 110 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olup; bu değer iklim kabininde bulunan 11 adet Sylvania Gro-Lux flüoresan lamba (F18W/GRO) ile sağlanmıştır.

Hücre canlılık testi, fotosentetik pigment birikimi ve protein analizleri için bitkiler Zadoks vd. (1974) tarafından tanımlanan GS 12 (ilk yaprağın tam, 2. yaprağın ise %50'sinin çıktığı evre) büyüme evresinde örneklenmiştir.

3.5 Hücre Canlılık Testi (TTC İndirgenme Testi)

Bu araştırmada kullanılan 16 ekmeklik ve 14 makarnalık buğday çeşidinin erken fide evresinde farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan fidelerinin ilk yapraklarında 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür kullanılarak hücre canlılıkları belirlenmiştir. Canlı hücrelerin çeşitli tetrazolium tuzlarını indirgeyebilme yeteneği çeşitli organizmalar için bildirilmiştir (Smith 1951).

Kontrol (25°C) sıcaklığında çimlendirilen ve büyütülen iki günlük etiyole fideler, 25°C sıcaklıkta ve 16/8 sa (ışık/karanlık) fotoperiyotta 3 gün daha büyütülmüştür. Bu süre sonunda, hücre canlılık testlerinde iki gruba ayrılan fidelerin I. grubuna aşağıdaki sıcaklık uygulaması fide durumunda iken uygulanmıştır.

I. grup:

25°C (2 gün)_{Karanlık} → 25°C (3 gün)_{16/8 sa fotoperiyot} → 37°C (24 sa)_{16/8 sa fotoperiyot}

II. grup fideler, I. grup fidelerin maruz kaldığı sıcaklık basamaklarının ardından fidelerin ilk yapraklarının uçlarından 1 cm kesilip atıldıktan sonra geriye kalan kısmın ucundan itibaren alınan 1'er cm uzunluğundaki iki yaprak segmenti, 100 µL distile su içeren ağzı kapaklı test tüplerine alındıktan sonra yüksek sıcaklık şoku uygulamasına (50°C, 1 sa) maruz bırakılmıştır. I. grup fidelerden alınan yaprak kesitleri için de aynı yaprak kesme işlemleri uygulanmıştır.

II. grup:

25°C (5 gün)_{Karanlık} → 25°C (3 gün)_{16/8 sa fotoperiyot} → 37°C (24 sa)_{16/8 sa fotoperiyot} → 50°C (1 sa)_{Karanlık}

Kontrol sıcaklığını takiben 50°C'de 1 sa yüksek sıcaklık şoku uygulanan fideler çoğunlukla canlılıklarını kaybetmiştir. Bu nedenle, TTC indirgenme testi I. ve II. grup uygulamaları kapsamaktadır.

Her bir buğday çeşidi ve sıcaklık uygulaması için 6 tekrarlı olacak şekilde örnekleme yapılmıştır.

Sıcaklık uygulamalarını takiben, 2 mL TTC solüsyonu (0.05 M potasyum fosfat tamponunda pH:7.5, %0.8'lik TTC ve %1 Tween-80) her bir tüpe eklenmiş ve dokulardaki havayı alarak TTC çözeltisinin dokulara nüfuzunu sağlamak için tüplere 15 dakika vakum uygulanmıştır (Porter et al. 1994). TTC çözeltisindeki her bir örnek 24 sa boyunca 25°C'de ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yapraklar üç kez distile su ile yıkanmış ve 2 mL %95'lik etanol içeren ağzı kapaklı test tüplerine yerleştirilerek 24 sa için 25°C ve karanlıkta tutulmuştur. Ekstraksiyon sonunda kırmızı formazanın çok yoğun olması nedeniyle uygun seyreltme yapılmıştır. Steponkus ve Lanphear (1967), indirgenmiş TTC'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 490 nm olmasına karşın klorofilli dokularda bu değerin 530 nm olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, etanol çözeltisinin optik densitesi (OD) 530 nm'de TU-1880 Double Beam UVI-VIS Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. TTC'nin formazana indirgenme yüzdesinin ölçülmesi ile kazanılan termal tolerans seviyesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$TT (\%) = (OD_{37 \rightarrow 50^\circ C} / OD_{37^\circ C}) \times 100$$

$OD_{37 \rightarrow 50^\circ C}$, uyumu takiben kesilmiş yaprak dokularının yüksek sıcaklık şoku uygulamasına maruz kalmasıyla elde edilen ortalama absorbans değerlerini ve $OD_{37^\circ C}$, uyum sıcaklığına maruz kalmış fidelerin yaprak dokuları için ortalama absorbans değerlerini ifade etmektedir.

3.6 Fotosentetik Pigmentlerin Analizi

Fotosentetik pigmentlerin [klorofil a ve b (Klo *a* ve Klo *b*) ve karotenoidler] sentezi ve birikimi üzerine farklı yüksek sıcaklık uygulamalarının etkisi incelenmiştir. Beş gün süreyle $25^\circ C$ 'de büyütülen etiyole fideler aşağıda belirtilen kontrol ve yüksek sıcaklık uygulamalarına karanlıkta maruz kaldıktan sonra $25^\circ C$ 'de 24 sa süreyle sürekli ışık periyoduna maruz bırakılmıştır.

Kontrol uygulaması:

$25^\circ C$ (5 gün)_{Karanlık} → $25^\circ C$ (24 sa)_{Karanlık} → $25^\circ C$ (24 sa)_{IŞIK}

Uyum (subletal) sıcaklık uygulaması:

$25^\circ C$ (5 gün)_{Karanlık} → $37^\circ C$ (24 sa)_{Karanlık} → $25^\circ C$ (24 sa)_{IŞIK}

Uyum → Yüksek sıcaklık şoku (letal) uygulaması:

$25^\circ C$ (5 gün)_{Karanlık} → $37^\circ C$ (24 sa)_{Karanlık} → $50^\circ C$ (1 sa)_{Karanlık} → $25^\circ C$ (24 sa)_{IŞIK}

Kontrol sıcaklığını takiben $50^\circ C$ 'de 1 sa yüksek sıcaklık şoku uygulanan fideler çoğunlukla canlılıklarını kaybetmiştir. Bu nedenle, fotosentetik pigment analizleri yukarıdaki uygulamalarda gerçekleştirilmiştir.

Toplam klorofiller (Klo *a* ve Klo *b*) ve karotenoidlerin ekstraksiyonu ve konsantrasyonlarının belirlenmesi Wellburn (1994)'e göre yapılmıştır. Farklı sıcaklık uygulamalarını takiben $25^\circ C$ 'de 24 sa sürekli ışık periyodunda tutulan fidelerin ilk yapraklarından yaklaşık 45 mg yaş yaprak dokusu alınmıştır. Her bir buğday çeşidi ve sıcaklık uygulaması için 6 tekrarlı olacak şekilde örnekleme

yapılmıştır. Küçük parçalara ayrılan dokular, 10 mL soğutulmuş metanol içeren ağzı kapaklı test tüplerine (160×10 mm) alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için tüpler 48 sa süresince +4°C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait çözeltinin Klo *a*, Klo *b* ve karotenoidlerin absorbansları sırasıyla 666, 653 ve 470 nm dalga boylarında, TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve konsantrasyonlar aşağıdaki formüllere göre yaş ağırlık (YA) temelinde mg.gYA⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil a (Klo } a) = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \times S^*$$

$$\text{Klorofil b (Klo } b) = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \times S$$

$$\text{Karotenoidler} = (1000A_{470} - 2.86\text{Klo } a - 129.2\text{Klo } b)/221 \times S$$

* S: Seyreltme katsayısı

Kontrole göre 37°C ve 37→50°C yüksek sıcaklık uygulamalarında klorofil birikimindeki azalma aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Klo } a+b \text{ miktarındaki azalma} = [1 - (\text{Klo } a+b_{37^\circ\text{C}} / \text{Klo } a+b_{25^\circ\text{C}})] \times 100$$

$$\text{Klo } a+b \text{ miktarındaki azalma} = [1 - (\text{Klo } a+b_{37 \rightarrow 50^\circ\text{C}} / \text{Klo } a+b_{25^\circ\text{C}})] \times 100$$

Kontrol ve yüksek sıcaklık uygulamalarında toplam klorofil/karotenoid oranı belirlenmiş ve kontrole göre 37°C ve 37→50°C yüksek sıcaklık uygulamalarında klorofil/karotenoid (Klo *a+b*/Karot) oranındaki azalma aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{Azalma}_{\text{Klo } a+b/\text{Karot}} = 1 - [(\text{Klo } a+b/\text{Karot})_{37^\circ\text{C}} / (\text{Klo } a+b/\text{Karot})_{25^\circ\text{C}}] \times 100$$

$$\% \text{Azalma}_{\text{Klo } a+b/\text{Karot}} = 1 - [(\text{Klo } a+b/\text{Karot})_{37 \rightarrow 50^\circ\text{C}} / (\text{Klo } a+b/\text{Karot})_{25^\circ\text{C}}] \times 100$$

3.7 Protein Analizleri

Bu araştırmada, 37→50°C/25°C oranında (%) klorofil *a+b* birikimindeki azalma bakımından tüm çeşitlerin ortalamasına (%48.40) göre en az klorofil kaybeden termal toleranslı ekmeklik Gönen-98 (%32.13) ve makarnalık Ege-88 (%45.19)

buğday çeşitleri ile en fazla klorofil kaybeden termal duyarlı ekmeklik Cumhuriyet-75 (%60.06) ve makarnalık Ankara-98 (%67.14) buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokuları protein analizleri için kullanılmıştır.

Protein analizleri için iki günlük etiyolet fideler, 16/8 sa (ışık/karanlık) fotoperiyotta ve 25°C'de kontrollü iklim kabiniinde 3 gün daha büyütülmüştür. Bu süre sonunda, fideler üç gruba ayrılmıştır.

I. grup : Kontrol (25°C, 24 sa)

II. grup : Uyumlama (37°C, 24 sa)

III. grup : Uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulaması (37°C, 24 sa→50°C, 1 sa)

Fide halinde bu uygulamalara maruz kalan bitkilerin ilk yaprakları (500 mg) sıvı azotta dondurularak protein ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.1 Protein Ekstraksiyonu

Sıvı azotta dondurulan yaprak örnekleri -20°C'ye alınmıştır. Dondurulmuş yaprak dokularından protein ekstraksiyonu Damerval vd. (1986)'a göre yapılmıştır: Dokular, soğutulmuş porselen havan içerisinde sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen dokular, %0.07 β -merkaptoetanol (β ME) içeren asetonda hazırlanmış %10'luk trikloro asetik asit (TCA) çözeltisinin 5 mL'sinde süspanse edildikten sonra santrifüj tüplerine alınmıştır. Proteinleri çöktürmek için -20°C'de en az 1 sa tutulan süspanسیون, Nüve NF 800 R santrifüjde +4°C'de 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonra süpernatant kısmının tamamı tüplerden uzaklaştırılmıştır. Tüplerin tabanında bulunan pelet üzerine asetonda hazırlanmış %0.07 β ME'den 0.5 mL ilave edilerek vortekslenmiş ve üzerine 4.5 mL aynı çözeltiden ilave edilerek tüpler en az 1 sa -20°C'de tutulduktan sonra aynı şekilde +4°C'de 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.7.2 Yaprak Örneklerinin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalmış çeşitlerin yaprak dokusundan izole edilen protein konsantrasyonu, Bradford metodunun (Bradford 1976) modifikasyonunu kapsayan Ramagli ve Rodriguez (1985)'e göre tespit edilmiştir.

Bradford stok çözeltisi (5X):

Commasie Brilliant Blue G-250	100 mg
%95 etanol (EtOH)	50 mL
%85'lik fosforik asit (H ₃ PO ₄)	100 mL

Bu karışım 200 mL'ye tamamlandıktan sonra 1:3 oranında distile su ile seyreltilerek Whatman No.1 filtre kağıdı ile süzümüştür. Standart için Bovin Serum Albumin (BSA) standart çözeltisi kullanılmıştır. Standart çözeltisi, 1 mg BSA urea karışımının (9 M urea, %2 amfolinler, %4 NP-40 ve %2 β ME) 200 μ L'sinde çözümlenerek hazırlanmıştır (Ramagli and Rodriguez 1985). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltisine (0-10 μ L) uygun olarak urea karışımı (10-0 μ L) ilave edilmiş ve 0-50 μ g BSA/10 μ L urea karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra sırasıyla 10 μ L 0.1 N HCl (hidroklorik asit), 80 μ L dH₂O ve 3.5 mL Bradford çözeltisi (1:3 oranında seyreltilmiş) ilave edilmiştir. Standart için hazırlanan kör tüpü, BSA dışındaki çözeltileri içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Yaprak örnekleri için hazırlanan kör tüpü ile standart için hazırlanan kör tüpündeki içerik aynıdır. Proteinleri ekstrakte edilmiş yaprak örneklerinin her birinin peletinden 5 mg protein 200 μ L urea karışımında çözülmüştür. Protein örnek çözeltileri 3 dakika 12750 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 10 μ L protein çözeltisi alınmıştır. Üzerlerine 10 μ L 0.1 N HCl, 80 μ L, dH₂O ve 3.5 mL Bradford çözeltisi (1:3 oranında seyreltilmiş) konulmuştur.

Üç tekrarlı olarak hazırlanan standart ve örnek çözeltilerin absorbanları 595 nm dalga boyunda TU-1880 Double Beam UVI-VIS Spektrofotometre ile belirlenmiştir. Standart grafiğinden (BSA) yararlanılarak örneklerin protein

konsantrasyonları ve elektroforez aşamasında kullanılacak her bir örneğin 70 µg çözünebilir protein içermesi için tartılacak miktarlar belirlenmiştir.

3.7.3 Elektroforez Analizi

Proteinler iki yönlü sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAJE) ile tespit edilmiştir. Tüm elektroforez çalışmaları Bio-Rad sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.3.1 İzoelektrik Fokuslama (İEF)

İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) Hochstrasser vd. (1988)'ne göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.3):

Çizelge 3.3 İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) için gerekli kimyasallar ve miktarları

Kimyasal	Miktarı
Urea	10.0 g
dH ₂ O	7.4 mL
Akrilamid/bis akrilamid stok çözeltisi	3.0 mL
CHAPS	0.3 g
NP-40	100.0 µL
Amfolin (pH:5-8)	200.0 µL
Amfolin (pH:3-10)	800.0 µL

İEFJÇ vakumlanıp, filtre edildikten sonra -20°C'de saklanmıştır. Örnek çözeltinin hazırlanması Naqvi vd. (1994)'ne göre yapılmıştır. Yaklaşık 70 µg protein konsantrasyonu içerecek şekilde tartılmış protein örneği 200 µL İEFJÇ'de yaklaşık 1 sa süresince oda sıcaklığında çözülmüştür. Bu süre sonunda 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatanttan 50 µL alınarak İEFJÇ'ye katılmıştır. Çözeltiye %2.5'lük taze olarak hazırlanan amonyum persülfat (APS)'dan 1.5 µL ve 0.5 µL N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) katılarak kısa süre vortekslenmiştir.

Karışım iç çapı 1.5 mm, uzunluğu 18 cm olan izoelektrik odaklama tüplerine mikropipet yardımıyla yüklenmiştir (O'Farrell 1975). Yükleme sonunda tüpler, bazik ucu parmak ile kapatılarak, asidik uç yukarıda kalacak şekilde dikey konumda tutulmuş ve bazik uca 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş İEFJÇ yüklenmiş ve jelin hava ile teması kesilerek polimerizasyon sağlanmıştır.

Protein örneği içermeyen kör tüp, pH gradientinin belirlenmesi amacıyla aynen örnek tüplerin hazırlandığı gibi hazırlanmıştır. İEF tüpleri genellikle son tüp doldurulup, tüm tüplerdeki jeller polimerleşinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Elektroforez tankının üst çözeltisi 20 mM sodyum hidroksit (NaOH, katodik çözelti) çözeltisiyle, elektroforez tankının alt çözeltisi ise 100 mM fosforik asit (H₃PO₄, anodik çözelti) çözeltisiyle doldurulmuştur (O'Farrell 1975).

Yürütme, 2 sa 400 voltu takiben 14 sa 800 volt sabit akımda (toplam 12000 volt/sa) gerçekleştirilmiştir. Yürütme tamamlandığında tüpler tanktan uzaklaştırılıp tüpün asidik ve bazik uçları parafilm ile hava almayacak şekilde kapatılmıştır. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAJE)'de kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.7.3.2 İzoelektrik Noktasının (pI) Belirlenmesi

Her izoelektrik odaklama sırasında kör olarak sadece İEFJÇ içeren jeller yürütülmüştür. Elektroforezden sonra kör tüpündeki jel, İEF tüplerinden şırınga yardımı ile çıkarılmıştır. Jelin asidik ve bazik uçlarından 0.5'er cm kesilerek atılmıştır. Geriye kalan kısım asidikten baziğe doğru 1'er cm'lik parçalara kesilmiştir. Kesilen parçalar, içerisinde 1.4 mL 1 M potasyum klorüre (KCl) alındıktan sonra +4°C'de gece boyunca tutulmuştur. pH ölçülmeden önce oda sıcaklığında 2 sa bekletilen KCl'deki kör jeli parçalarının pH'ı, asidikten baziğe doğru yine oda sıcaklığında belirlenmiştir. Belirlenen pH değerleri, proteinlerin izoelektrik noktalarını (pI) belirlemek için kullanılmıştır.

3.7.3.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAJE)

İEF’de izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılan protein örnekleri elektrophorez tankında yürütülmüştür. SDS-PAJE, Laemmli (1970)’ye göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 10-70 kilodalton (kDa) moleküler ağırlıktaki (Çizelge 3.4) polipeptidlerin kolaylıkla ayrılabilceği %12’lik akrilamid jel kullanılmıştır (Copeland 1993).

Çizelge 3.4 SDS-poliakrilamid jel elektrophorez için moleküler ağırlık standartları

Protein standartları*	Moleküler ağırlıkları (kDa)
Bovin albumin	66.0
Yumurta albumini	45.0
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	36.0
Karbonik anhidraz	29.0
Tripsinojen	24.0
Tripsin inhibitör, Soya fasulyesi	20.1
α -Laktalbumin	14.2

* Hazırlanan protein standartlarının her birinden 5’er μ L çekilmiş, kaynayan suda 1 dakika tutulmuş ve toplam hacim 1:1 oranında 0.5 M Tris-HCl, pH:6.8 stok çözeltisi ile seyreltilmiştir.

Hazırlanan jel çözeltisi, 1.5 mm kalınlıkta boşluk içeren 160×160 mm boyutundaki iki cam plak arasına dökülmüştür. Üzerine tek dişli tarak yerleştirilmiştir. Polimerleşmeyi takiben tarak çıkarılmış ve filtre kağıdı ile iki cam arasındaki jelin üst yüzeyindeki sıvı çekilmiştir. Jelin kuyucuk olmayan asidik tarafına %0.01 bromfenol mavisi içeren %0.5’lik agaroz çözeltisi üçgen olacak şekilde dökülmüştür.

İzoelektrik odaklama tüpündeki jel, şırınga yardımı ile parafilm üzerine çıkarılmıştır. İki cam arasındaki slab jelin üzerine asidik ve bazik kısımları esas alınarak, hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Yürütme tamponu

olarak tankın alt ve üst kısmına SDS'li Tris-Glisin çözeltisi konulmuştur. Tek dişli tarakla bazik tarafta açılan kuyucuğa standart moleküler ağırlık çözeltisinden 2 µL yüklenmiştir. Elektroforez tankının iç soğutma sisteminden sürekli olarak çeşme suyu geçirilmiştir. Ayırıştırma ilk 30 dakika jel başına 10 mA, sonra bromfenol mavisinin jelin tabanına yaklaşık 1 cm kalıncaya kadar jel başına 25 mA sabit akımda gerçekleştirilmiştir.

Yürütme işleminin bitiminde iki cam plak arasındaki jel, fiksatif (sabitleme) çözeltisine [%50 metanol : %12 glasiyal asetik asit : %0.05 formaldehit (%37'lik)] alınmıştır.

3.7.4 Slab Jellere Uygulanan İşlemler

3.7.4.1 Proteinlerin Boyanması

Jellerin gümüş boyaması Blum vd. (1987)'a göre yapılmıştır:

a) Fiksasyon (Sabitleme): Fiksasyon çözeltisi metanol (%50), glasiyal asetik asit (%12) ve 0.5 mL formaldehit (%37) ile hazırlanmıştır. Jeller en az 1 sa veya 1 gece fikse edilmelidir.

b) Yıkama: Yıkama çözeltisi %50'lik etil alkoldür. Yıkama işlemi, 3 kez 20'şer dakika uygulanmalıdır.

c) Ön-uygulama: Çözeltisi, sodyum tiyosülfat.5H₂O (0.2 g/L)'dır. Boyama zeminindeki artışı engellemek için uygulama fazla uzun sürmemeli, tam 1 dakika olmalıdır.

d) Durulama: Jel yüzeyindeki fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak ve AgNO₃ ile yüzey boyamasını sağlamak için 3 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanır.

e) Sabitleme: Sabitleme çözeltisi AgNO₃ (2 g/L) ve 0.75 mL formaldehit (%37) olup; uygulama zamanı 20 dakikadır.

f) Durulama: AgNO₃ ile sabitlenen jelin yüzeyindeki fazla AgNO₃'ü ve sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak için 2 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanma yapılan basamaktır.

g) Geliştirme: Geliştirme çözeltisi, sodyum karbonat (60 g/L), 0.5 mL formaldehit (%37) ve sodyum tiyosülfat.5H₂O (4 mg/L) içerir. Protein benekleri yaklaşık 10 dakikada gelişir.

g) Yıkama: Uygulama, 2 kez 2'şer dakika distile su ile gerçekleştirilir.

h) Durdurma: Durdurma çözeltisi metanol (%50) ve glasiyal asetik asit (%12) ile hazırlanır. Uygulama süresi 10 dakikadır.

i) Yıkama: Yıkama çözeltisi %50'lik metanoldur ve uygulama süresi 10 dakikadan fazladır.

Proteinleri boyama aşamalarının tamamı, oda sıcaklığında ve sallayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Boyamanın her aşamasında yeni şeffaf eldivenler kullanılmıştır. Boyama bitiminde jeller fotoğraflanmış ve kurutulmuştur.

3.7.4.2 Jellerin Fotoğraflanması

Boyanmış jeller, Fujitsu S7000 FinePix 19x (6x Optical 3.2x Dijital) fotoğraf makinesi takılmış Uvitec-UV marka illüminatör sisteminde özel filtre üzerine konularak fotoğraflanmıştır.

3.7.4.3 Jellerin Kurutulması

Jeller, gümüş boyamadan sonra saklanmak üzere kurutulmuştur. Kurutma işlemi, Krishnan ve Nguyen (1990)'e göre yapılmıştır. Kurutmada, selofan ve kalınlığı 6 mm, dış boyutları 35x35 cm, iç boyutları 20x20 cm olan şeffaf fleksiglas çerçeve kullanılmıştır. Jel, fleksiglas çerçeve üzerine yerleştirilen distile su ile ıslatılmış iki selafon arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Jeller oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.7.4.4 Jellerin Okunması

Kontrol jellerine göre sıcaklık uygulamalarına ait jellerde sentezi kaybolan, yeni sentezlenen ve sentezi belirgin şekilde artan veya azalan yüksek sıcaklık stresi proteinleri belirlenmiştir. Bu proteinlerin izoelektik noktaları (pI) ve moleküler ağırlıkları (kilodalton, kDa) belirlenmiştir.

3.8 İstatistiki Analizler

Fotosentetik pigment analizleri ve TTC indirgenme testi, 6 tekrarlı ve rasgele deneme deseni olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik absorbans ölçümleri ve hesaplanan % verilere SPSS (versiyon 10.0) paket programı kullanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Elde edilen verilere ait ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma testi ve Student-T testi kullanılarak belirlenmiştir ($P<0.05$).

4. BULGULAR

4.1 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin İlk Yaprak Dokusunda TTC İndirgenmesi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi

Bu araştırmada, bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin erken fide evresindeki ilk yaprak dokusunda 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) indirgenmesine bağlı olarak hücre canlılığı üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının (37°C, 24 sa ve 37°C, 24 sa→50°C, 1 sa) etkisi ve çeşitler arasında termal tolerans açısından genetik çeşitlilik belirlenmiştir.

Varyans analizleri, TTC indirgenme testi için 16 *Triticum aestivum* L. ve 14 *Triticum durum* Desf. çeşidi arasında önemli farklılıkların olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1). Çeşitlerin 37°C'de 24 sa uyumlanmasıyla fidelerin ilk yaprak dokusunda ölçülen absorbans değerleri, makarnalık buğday çeşidi Yelken-2000'de 1.262 (en düşük)'den ekmeklik buğday çeşidi İkizce-96'da 4.607 (en yüksek)'ye aralanmıştır (Çizelge 4.1). Uyum sıcaklığına göre uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulamasında TTC indirgenmesi önemli düzeyde azalmış ($P<0.05$); fakat dokular canlılıklarını kaybetmemişlerdir. Bu yüksek sıcaklık şoku uygulanmış dokularda absorbans değerleri, ekmeklik buğday çeşidi Sönmez-2001'de 0.122 (en düşük)'den ekmeklik buğday çeşidi İkizce-96'da 2.658 (en yüksek)'e aralanmıştır (Çizelge 4.1).

Sıcaklık uygulamalarında her bir çeşit için elde edilen absorbans değerleri formülde yerlerine konulduğunda termal tolerans (%TT) değerleri, en düşük %7.91 (Sönmez-2001)'den en yüksek %76.33 (Basribey-95)'e aralanmıştır (Çizelge 4.1). Ekmeklik buğday çeşidi Basribey-95 (%76.33) ve makarnalık buğday çeşidi Amanos-97 (%75.01) diğer çeşitlere göre önemli düzeyde daha yüksek termal toleransa sahipken, bu çeşitler arasındaki fark önemsizdir. TT (%) bakımından tüm çeşitlere ait ortalama değer %30.86 olarak belirlenmiştir. Ekmeklik buğday çeşitlerinden Basribey-95, Gerek-79, İkizce-96, Bezostaya-1, Ceyhan-99, Gönen-98, Gün-91 ve makarnalık buğday çeşitlerinden Amanos-97,

Ankara-98, Ege-88, Fuatbey-2000, Çakmak-79'un termal tolerans (%) değerleri ortalamanın üzerinde bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Fide evresindeki 16 ekmeklik ve 14 makarnalık buğday çeşidinin ilk yaprak dokularında TTC indirgenme testi ile belirlenmiş termal tolerans (%)

Çeşitler	Sıcaklık uygulamaları		TT (%)*
	37°C	37→50°C	
		OD ₅₃₀	
Basribey-95	1.467 ± 0.064 A**	1.119 ± 0.048 B	76.33 ± 3.30 a**
Amanos-97***	2.458 ± 0.128 A	1.844 ± 0.048 B	75.01 ± 1.94 a
Gerek-79	3.519 ± 0.090 A	2.208 ± 0.067 B	62.74 ± 1.91 b
İkizce-96	4.607 ± 0.066 A	2.658 ± 0.060 B	57.70 ± 1.31 c
Bezostaya-1	1.729 ± 0.053 A	0.949 ± 0.032 B	54.90 ± 1.85 cd
Ceyhan-99	1.887 ± 0.078 A	0.992 ± 0.020 B	52.56 ± 1.04 de
Ankara-98	2.436 ± 0.118 A	1.207 ± 0.056 B	49.56 ± 2.32 ef
Ege-88	2.432 ± 0.023 A	1.184 ± 0.030 B	48.70 ± 1.24 f
Fuatbey-2000	2.724 ± 0.021 A	0.862 ± 0.040 B	31.64 ± 1.47 g
Gönen-98	2.483 ± 0.037 A	0.773 ± 0.017 B	31.14 ± 0.70 g
Çakmak-79	1.329 ± 0.019 A	0.404 ± 0.014 B	30.40 ± 1.06 g
Gün-91	2.234 ± 0.045 A	0.679 ± 0.007 B	30.37 ± 0.33 g
İzmir-85	2.581 ± 0.047 A	0.661 ± 0.023 B	25.60 ± 0.90 h
Yelken-2000	1.262 ± 0.043 A	0.314 ± 0.006 B	24.84 ± 0.44 h
Gediz-75	2.653 ± 0.050 A	0.636 ± 0.014 B	23.98 ± 0.52 hi
Kızıltan-91	1.709 ± 0.031 A	0.405 ± 0.028 B	23.69 ± 1.63 hij
Aydın-93	1.732 ± 0.071 A	0.402 ± 0.031 B	23.23 ± 1.84 hij
Adana-99	1.681 ± 0.096 A	0.382 ± 0.025 B	22.72 ± 1.47 hij
Salihli-92	2.339 ± 0.059 A	0.478 ± 0.014 B	20.43 ± 0.60 ijk
Tütün-2002	1.937 ± 0.062 A	0.383 ± 0.027 B	19.75 ± 1.42 jkl
Şölen-2002	1.772 ± 0.054 A	0.319 ± 0.007 B	18.02 ± 0.41 klm
Çeşit-1252	2.711 ± 0.099 A	0.486 ± 0.024 B	17.92 ± 0.87 klm
Kunduru-1149	1.767 ± 0.052 A	0.294 ± 0.014 B	16.65 ± 0.82 klm
Meta-2002	3.165 ± 0.092 A	0.518 ± 0.033 B	16.36 ± 1.05 klm
Kaşifbey-95	3.543 ± 0.047 A	0.554 ± 0.017 B	15.63 ± 0.48 lm
Cumhuriyet-75	2.193 ± 0.057 A	0.337 ± 0.012 B	15.38 ± 0.56 m
Pandas	2.825 ± 0.099 A	0.408 ± 0.020 B	14.42 ± 0.70 m
Altay-2000	3.911 ± 0.046 A	0.393 ± 0.022 B	10.05 ± 0.57 n
Ziyabey-98	2.945 ± 0.100 A	0.244 ± 0.011 B	8.27 ± 0.39 n
Sönmez-2001	1.540 ± 0.020 A	0.122 ± 0.006 B	7.91 ± 0.38 n
Ortalama			30.86 ± 1.44

* TT (%) = (OD_{37→50°C} / OD_{37°C}) × 100

** Sütündeki farklı küçük harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre buğday çeşitleri arasında ve her bir satırdaki farklı büyük harfler Student-T testine göre sıcaklık uygulamaları arasında önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

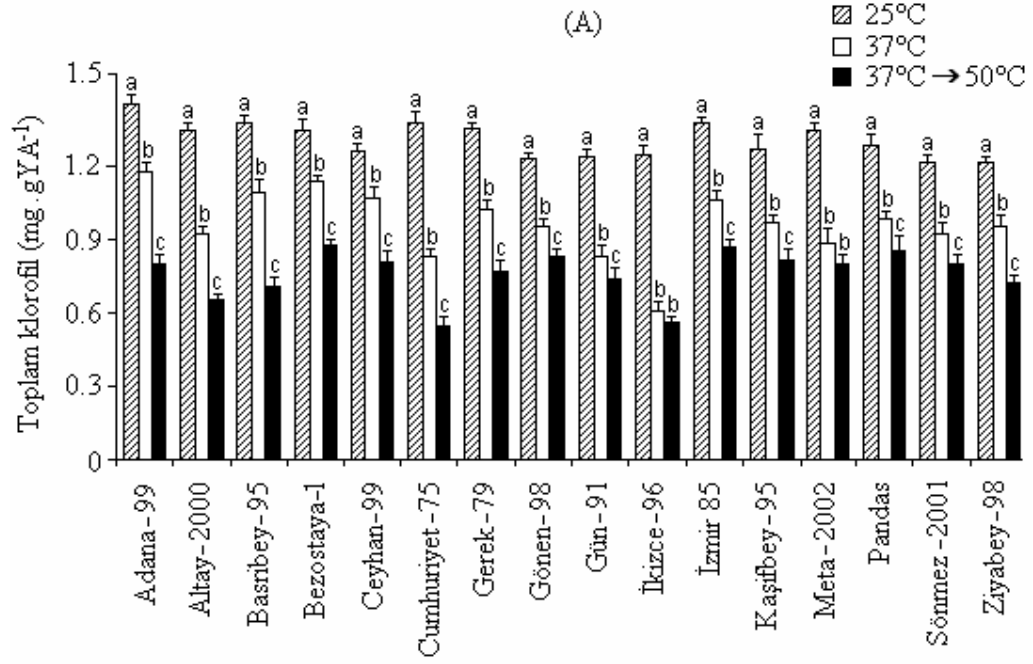
*** Makarnalık buğday çeşitleri koyu yazılmıştır.

4.2 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi

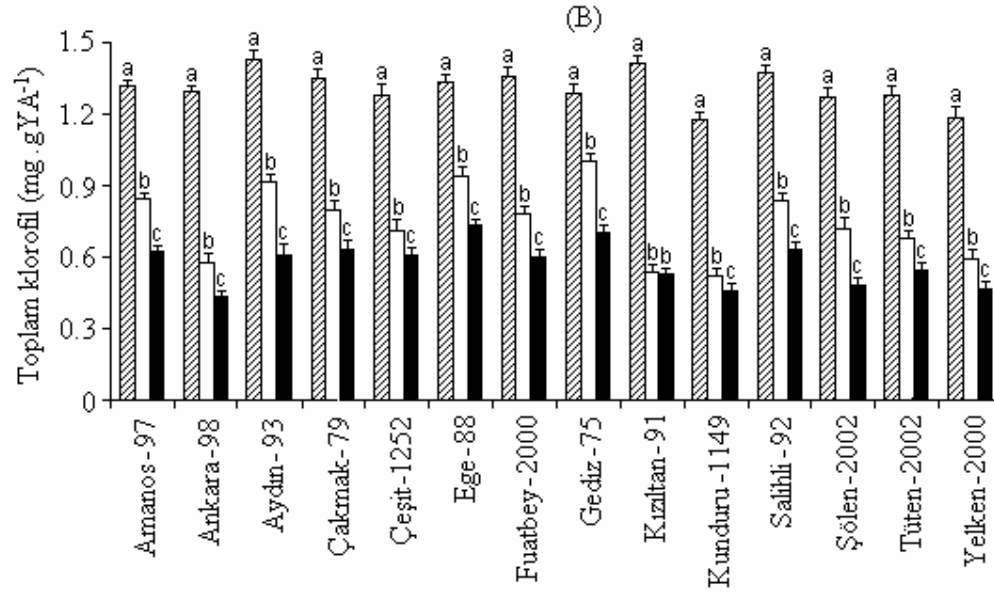
Triticum aestivum L.'a ait 16 çeşit ve *Triticum durum* Desf.'a ait 14 çeşidin 5 gün süreyle 25°C'de büyütülen etiyole fideleri kontrol (25°C, 24 sa), uyum (37°C, 24 sa) ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şokuna (37°C, 24 sa→50°C, 1 sa) maruz bırakılmıştır. Uygulamaları takiben 6 günlük etiyole fideler 24 sa için 25°C'de sürekli ışığa alınmış ve bu süre sonunda ilk yaprak dokusunda toplam klorofil (Klo $a+b$) ve karotenoidlerin birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.1A ve B).

Kontrol ve farklı yüksek sıcaklık uygulamalarını takiben ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde toplam klorofillerin (Klo $a+b$) pigmentasyonu sıcaklığın artmasına bağlı olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Şekil 4.1A ve B). Ancak, İkizce-96 ve Meta-2002 ekmeklik buğday ve Kızıltan-91 makarnalık buğday çeşitlerinde uyum (37°C) ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku (37→50°C) uygulamaları arasında toplam klorofil birikimi bakımından fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.1A ve B).

Klo $a+b$ miktarları bakımından 37°C ve 37→50°C sıcaklık uygulamaları kontrole göre % olarak oranlandığında, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin Klo $a+b$ birikimindeki % azalmaya göre yüksek sıcaklık zararı hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). 37→50°C/25°C oranında çeşitlerin klorofil birikiminde azalmanın 37°C/25°C oranındakine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C (%) oranlarında tüm çeşitlerin Klo $a+b$ birikimindeki azalma ortalamaları sırasıyla %34.22 ve %48.40 olarak bulunmuştur. Bu değerler dikkate alındığında, klorofil miktarındaki azalma bakımından makarnalık ve ekmeklik buğday çeşitleri 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranlarında ortalamanın altında ve üzerinde benzer dağılım göstermiştir. Ancak, yalnızca Altay-2000 ekmeklik buğday çeşidinde klorofil birikimindeki azalma 37°C/25°C oranında ortalamanın altında (%31.09) iken, 37→50°C/25°C oranında ortalamanın üzerinde (%51.00) yer almıştır.



Triticum aestivum L. çeşitleri



Triticum durum Desf. çeşitleri

Şekil 4.1 Bazı ekmeklik (A) ve makarnalık (B) buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda toplam klorofil (Klo a+b) birikimi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, her bir çeşit için Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre sıcaklık uygulamaları arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları ifade etmektedir ($P<0.05$). Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

Çizelge 4.2 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında Klo a+b birikimi üzerine yüksek sıcaklık uygulamalarının etkisi (%)

Çeşitler	Klo a+b birikimi		Çeşitler	Klo a+b birikimi	
	% Azalma* (37°C/25°C)			% Azalma* (37→50°C/25°C)	
Ceyhan-99	15.37 ± 2.58 a**		Gönen-98	32.13 ± 2.14 a	
Bezostaya-1	15.38 ± 1.47 a		Pandas	33.62 ± 0.98 a	
Adana-99	19.60 ± 2.10 ab		Ziyabey-98	34.08 ± 2.02 a	
Basribey-95	21.05 ± 3.08 ab		Bezostaya-1	34.96 ± 1.67 ab	
Sönmez-2001	21.38 ± 2.72 ab		Kaşifbey-95	35.59 ± 2.21 ab	
Gediz-75***	22.33 ± 1.06 b		Ceyhan-99	36.05 ± 2.11 ab	
Gönen-98	22.43 ± 1.51 b		İzmir-85	37.30 ± 2.05 ab	
Kaşifbey-95	23.18 ± 1.70 b		Gün-91	40.21 ± 2.11 bc	
İzmir-85	23.50 ± 2.46 b		Meta-2002	40.28 ± 2.50 bc	
Pandas	23.70 ± 2.50 b		Sönmez-2001	40.46 ± 1.76 bc	
Ziyabey-98	23.98 ± 2.80 b		Gerek-79	42.84 ± 2.52 c	
Gerek-79	24.25 ± 2.66 b		Adana-99	44.82 ± 2.14 cd	
Ege-88	30.32 ± 1.37 c		Ege-88	45.19 ± 1.34 cd	
Altay-2000	31.09 ± 2.26 c		Gediz-75	45.78 ± 0.84 cd	
Gün-91	32.84 ± 2.03 c		Basribey-95	48.68 ± 2.25 de	
Meta-2002	34.14 ± 2.29 cd		Altay-2000	51.00 ± 0.97 ef	
Amanos-97	35.96 ± 1.25 cde		Çeşit-1252	52.38 ± 1.56 efg	
Aydın-93	36.29 ± 2.64 cde		Amanos-97	52.94 ± 1.59 efg	
Salihli-92	39.58 ± 0.94 def		Çakmak-79	52.95 ± 1.26 efg	
Cumhuriyet-75	39.67 ± 0.65 def		Salihli-92	54.27 ± 1.42 fg	
Çakmak-79	41.02 ± 1.00 efg		İkizce-96	54.53 ± 1.62 fg	
Fuatbey-2000	41.93 ± 1.40 efg		Fuatbey-2000	55.02 ± 2.22 fgh	
Şölen-2002	42.92 ± 1.68 fg		Tüten-2002	56.74 ± 2.15 gh	
Çeşit-1252	44.62 ± 2.62 fgh		Aydın-93	57.35 ± 2.14 ghij	
Tüten-2002	46.70 ± 1.70 ghi		Cumhuriyet-75	60.06 ± 1.41 hij	
Yelken-2000	49.35 ± 2.25 hij		Yelken-2000	60.58 ± 1.31 ij	
İkizce-96	50.73 ± 1.19 ijk		Kunduru-1149	60.94 ± 1.43 ij	
Kunduru-1149	55.16 ± 0.72 jk		Şölen-2002	61.71 ± 1.15 ij	
Ankara-98	56.26 ± 1.88 k		Kızıltan-91	62.55 ± 1.01 jk	
Kızıltan-91	61.97 ± 2.41 l		Ankara-98	67.14 ± 0.86 k	
Ortalama	34.22 ± 1.01		Ortalama	48.40 ± 0.81	

* Klo a+b birikiminde azalma = 1- [(Klo a+b)_{37°C} / (Klo a+b)_{25°C}]×100

Klo a+b birikiminde azalma = 1- [(Klo a+b)_{37→50°C} / (Klo a+b)_{25°C}]×100

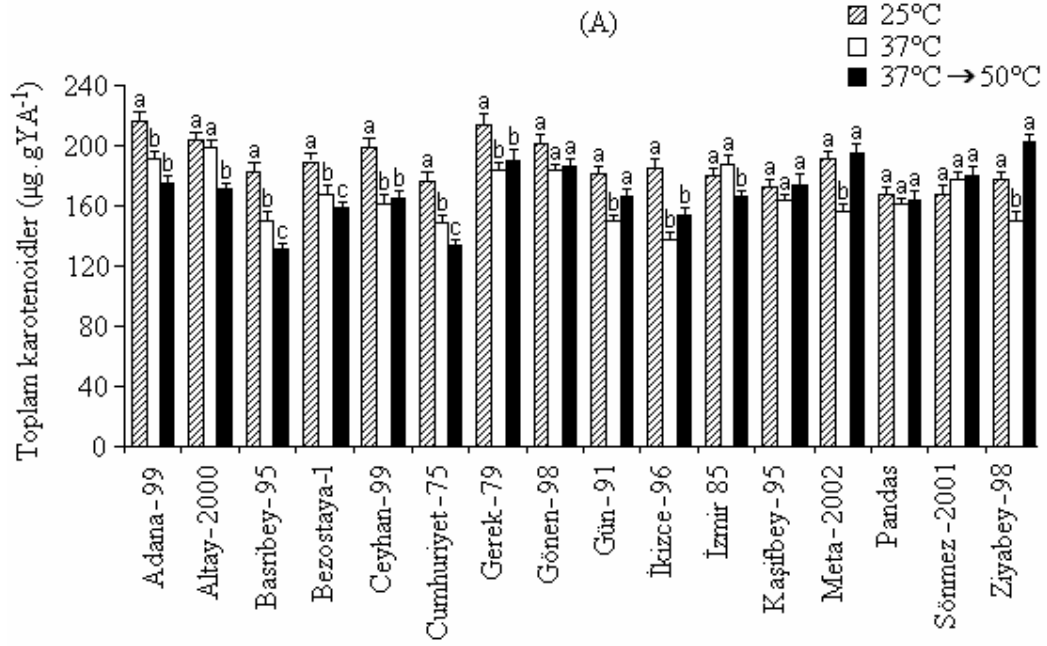
** Her bir sütundaki farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre çeşitler arasında önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

*** Makarnalık buğday çeşitleri koyu olarak yazılmıştır.

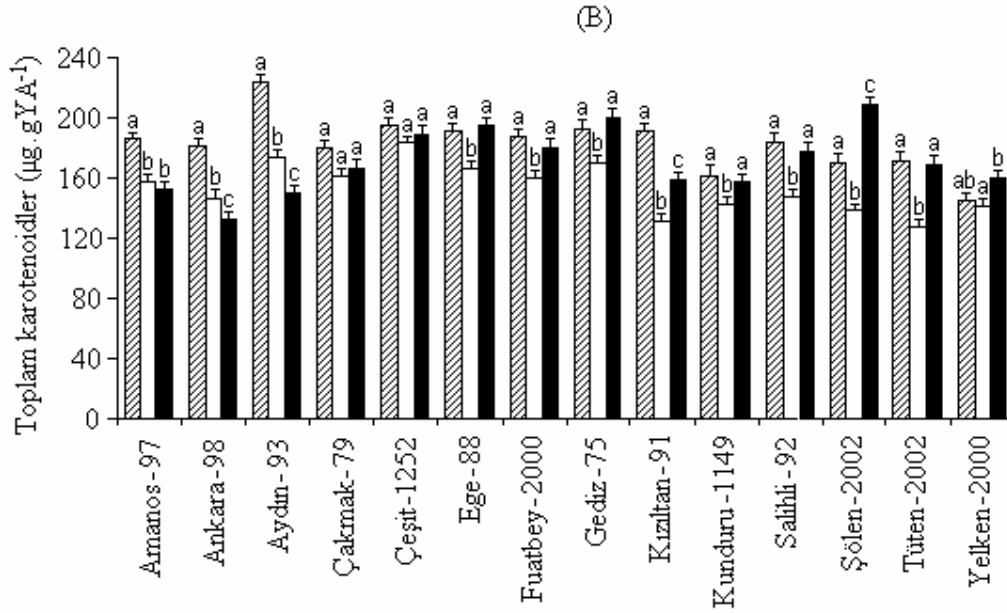
Diğer taraftan, 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranında, Cumhuriyet-75 ve İkizce-96 ekmeklik buğday çeşitleri hariç diğer ekmeklik buğday çeşitlerinde Klo $a+b$ birikimindeki azalma ortalamaya göre daha düşük belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, Gediz-75 ve Ege-88 makarnalık buğday çeşitleri hariç diğer tüm makarnalık buğday çeşitlerinde Klo $a+b$ birikimindeki azalma ortalamaya göre daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Klorofil birikiminde maksimum ve minimum azalma gösteren çeşitler 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranlarında farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.2): 37°C/25°C oranında (%), Klo $a+b$ birikimindeki azalma ekmeklik buğday çeşitlerinde %15.37'den (Ceyhan-99) %50.73'e (İkizce-96) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde %22.23'ten (Gediz-75) %61.97'ye (Kızıltan-91) aralanmıştır. 37→50°C/25°C oranında (%) Klo $a+b$ birikimindeki azalma ekmeklik buğday çeşitlerinde %32.13'den (Gönen-98) %60.06'ya (Cumhuriyet-75) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde %45.19'dan (Ege-88) %67.14'e (Ankara-98) aralanmıştır. (Çizelge 4.2).

Kontrol ve farklı sıcaklık uygulamalarını takiben ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde karotenoidlerin pigmentasyonunda sıcaklığın artışına bağlı olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) bazı farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 4.2A ve B): Sıcaklığın artışına bağlı olarak karotenoidlerin birikiminde önemli düzeydeki kademeli azalmalar Basribey-95, Cumhuriyet-75 ekmeklik buğday ve Ankara-98, Aydın-93 makarnalık buğday çeşitlerinde belirlenmiştir. Ek olarak, kontrole göre her iki sıcaklık uygulamasında karotenoidlerin birikiminde önemli düzeydeki azalmalar Adana-99, Bezostaya-1, Ceyhan-99, Gerek-79, İkizce-96 ekmeklik buğday ve Amanos-97, Kızıltan-91 makarnalık buğday çeşitlerinde belirlenmiştir. Buna karşın, Gün-91, Meta-2002, Ziyabey-98 ekmeklik buğday ve Ege-88, Fuatbey-2000, Gediz-75, Kunduru-1149, Salihli-92, Tüten-2002 makarnalık



Triticum aestivum L. çeşitleri



Triticum durum Desf. çeşitleri

Şekil 4.2 Bazı ekmeklik (A) ve makarnalık (B) buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda karotenoidlerin birikimi üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, her bir çeşit için Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre sıcaklık uygulamaları arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$). Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

buğday çeşitlerinde karotenoidlerin birikimi kontrole göre 37°C uygulamasında önemli düzeyde azalırken, kontrol ile 37→50°C arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Altay-2000 ve İzmir-85 ekmeklik buğday çeşitlerinde karotenoid birikimi diğer sıcaklık uygulamalarına göre 37→50°C uygulamasında önemli düzeyde azalırken, Şölen-2002 ve Yelken-2000 makarnalık buğday çeşitlerinde önemli düzeyde artmıştır. Diğer taraftan, Gönen-98, Kaşifbey-95, Pandas, Sönmez-2001 ekmeklik buğday ve Çakmak-79, Çeşit-1252 makarnalık buğday çeşitlerinde sıcaklığın artışına bağlı olarak karotenoidlerin birikimi bakımından fark önemsizdir (Şekil 4.2A ve B).

Farklı sıcaklık uygulamalarında, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin klorofil/karotenoid oranında bazı farklılıklar belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Klorofil/karotenoid oranı genellikle sıcaklığın artışına bağlı olarak kademeli olarak azalmıştır. Ancak, ekmeklik buğday çeşitleri Basribey-95, Ceyhan-99 ve Ziyabey-98'de klorofil/karotenoid oranı kontrole göre yalnızca 37→50°C uygulamasında azalmıştır. Ek olarak, ekmeklik buğday İzmir-85 çeşidinde klorofil/karotenoid oranı kontrole göre her iki sıcaklık uygulamasında önemli düzeyde azalırken, yüksek sıcaklık uygulamaları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3).

37°C/25°C oranında klorofil/karotenoid oranı yalnızca ekmeklik Ceyhan-99 (%6.27) ekmeklik buğday çeşidinde artmıştır (Çizelge 4.4). 37°C/25°C oranında klorofil/karotenoid oranındaki azalma (%) ekmeklik buğday çeşitlerinde, %4.23'ten (Basribey-95) %33.54'e (İkizce-96) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde, %12.24'den (Gediz-75) %48.99'a (Kundur-1149) aralanmıştır. 37→50°C/25°C oranında klorofil/karotenoid oranındaki azalma ekmeklik buğday çeşitlerinde, %22.52'den (Bezostaya-1) %47.10'a (Cumhuriyet-75) aralanırken, bu azalma makarnalık buğday çeşitlerinde, %36.29'dan (Aydın-93) %68.63'e (Şölen-2002) aralanmıştır. 37°C ve 37→50°C sıcaklık uygulamaları kontrole göre oranlandığında elde edilen ortalama değerler (sırasıyla %24.03 ve %43.31) dikkate alındığında, ekmeklik buğday çeşitlerinin

klorofil/karotenoid oranlarındaki azalmalar genellikle ortalamanın aşağısında aralanırken, makarnalık buğday çeşitlerinde bu değerin üzerinde aralanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında toplam klorofil/karotenoid oranı üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi

Çeşitler	Sıcaklık uygulamaları		
	25°C	37°C	37→50°C
	Klorofil / Karotenoid		
Adana-99	6.70 ± 0.19 a*	6.05 ± 0.15 b	4.54 ± 0.14 c
Altay-2000	6.51 ± 0.07 a	4.60 ± 0.15 b	3.79 ± 0.05 c
Amanos-97**	6.94 ± 0.11 a	5.23 ± 0.13 b	3.98 ± 0.08 c
Ankara-98	7.00 ± 0.15 a	3.85 ± 0.08 b	3.20 ± 0.03 c
Aydın-93	6.24 ± 0.16 a	5.13 ± 0.17 b	3.96 ± 0.09 c
Basribey-95	7.47 ± 0.09 a	7.15 ± 0.15 a	5.30 ± 0.14 b
Bezostaya-1	7.06 ± 0.20 a	6.71 ± 0.17 b	5.43 ± 0.17 c
Ceyhan-99	6.28 ± 0.23 a	6.58 ± 0.35 a	4.82 ± 0.09 b
Cumhuriyet-75	7.75 ± 0.14 a	5.50 ± 0.08 b	4.08 ± 0.21 c
Çakmak-79	7.38 ± 0.21 a	4.85 ± 0.12 b	3.80 ± 0.28 c
Çeşit-1252	6.43 ± 0.11 a	3.78 ± 0.16 b	3.16 ± 0.11 c
Ege-88	6.87 ± 0.09 a	5.51 ± 0.12 b	3.69 ± 0.10 c
Fuatbey-2000	7.09 ± 0.13 a	4.80 ± 0.10 b	3.29 ± 0.15 c
Gediz-75	6.58 ± 0.09 a	5.77 ± 0.09 b	3.44 ± 0.07 c
Gerek-79	6.23 ± 0.08 a	5.46 ± 0.11 b	4.00 ± 0.19 c
Gönen-98	6.09 ± 0.27 a	5.10 ± 0.08 b	4.41 ± 0.20 c
Gün-91	6.75 ± 0.09 a	5.43 ± 0.04 b	4.38 ± 0.12 c
İkizce-96	6.73 ± 0.42 a	4.41 ± 0.16 b	3.62 ± 0.10 c
İzmir-85	7.58 ± 0.17 a	5.55 ± 0.13 b	5.14 ± 0.13 b
Kaşifbey-95	7.25 ± 0.19 a	5.84 ± 0.14 b	4.63 ± 0.12 c
Kızıltan-91	7.26 ± 0.17 a	3.97 ± 0.17 b	3.29 ± 0.16 c
Kunduru-1149	7.09 ± 0.15 a	3.62 ± 0.14 b	2.85 ± 0.11 c
Meta-2002	6.90 ± 0.11 a	5.66 ± 0.38 b	4.10 ± 0.30 c
Pandas	7.57 ± 0.14 a	5.98 ± 0.06 b	5.15 ± 0.10 c
Salihli-92	7.30 ± 0.09 a	5.50 ± 0.10 b	3.49 ± 0.19 c
Sönmez-2001	7.14 ± 0.15 a	5.35 ± 0.30 b	3.97 ± 0.12 c
Şölen-2002	7.30 ± 0.17 a	5.08 ± 0.17 b	2.28 ± 0.09 c
Tüten-2002	7.34 ± 0.26 a	5.23 ± 0.26 b	3.19 ± 0.16 c
Yelken-2000	7.92 ± 0.11 a	4.14 ± 0.13 b	2.86 ± 0.13 c
Ziyabey-98	6.96 ± 0.52 a	6.11 ± 0.18 a	3.90 ± 0.14 b

* Satırlardaki farklı harfler, her bir çeşit için Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre sıcaklık uygulamaları arasında önemli düzeydeki farklılıkları ifade etmektedir (P<0.05).

** Makarnalık buğday çeşitleri koyu yazılmıştır.

Çizelge 4.4 Fide evresindeki ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında toplam klorofil/karotenoid (Klo a+b/Karot) oranı üzerine farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi (%)

Çeşitler	Klorofil / Karotenoid		Çeşitler	Klorofil / Karotenoid	
	% Azalma* (37°C/25°C)			% Azalma* (37→50°C/25°C)	
Ceyhan-99	-6.27 ± 0.10 a**		Bezostaya-1	22.52 ± 3.98 a	
Basribey-95	4.23 ± 2.25 b		Ceyhan-99	22.71 ± 3.45 a	
Bezostaya-1	4.70 ± 2.80 bc		Gönen-98	26.49 ± 6.02 ab	
Adana-99	9.33 ± 3.46 bcd		Basribey-95	29.03 ± 1.70 abc	
Ziyabey-95	9.53 ± 7.66 bcd		Pandas	31.79 ± 2.50 bcd	
Gediz-75***	12.24 ± 1.89 bcd		Adana-99	31.98 ± 2.53 bcd	
Gerek-79	12.34 ± 1.48 bcd		İzmir-85	32.10 ± 1.60 bcd	
Gönen-98	15.57 ± 3.55 cde		Gün-91	35.03 ± 2.48 bcde	
Aydın-93	17.44 ± 3.64 def		Gerek-79	35.71 ± 3.50 cdef	
Meta-2002	18.00 ± 5.46 defg		Kaşifbey-95	36.09 ± 1.78 cdef	
Kaşifbey-95	19.28 ± 2.51 defgh		Aydın-93	36.29 ± 1.79 cdef	
Gün-91	19.45 ± 1.39 defgh		Meta-2002	40.55 ± 4.43 defg	
Ege-88	19.72 ± 2.38 defgh		Altay-2000	41.70 ± 1.03 efgh	
Pandas	20.92 ± 1.83 defgh		Ziyabey-95	42.07 ± 5.54 efgh	
Amanos-97	24.26 ± 2.75 efghij		Amanos-97	42.54 ± 1.82 efgh	
Salihli-92	24.65 ± 0.73 efghij		Sönmez-2001	44.11 ± 2.80 efghi	
Sönmez-2001	24.88 ± 4.61 efghij		İkizce-96	45.10 ± 3.78 fghij	
İzmir-85	26.55 ± 2.65 efghij		Ege-88	46.41 ± 1.40 ghijk	
Tüten-2002	28.25 ± 4.59 fghij		Cumhuriyet-75	47.10 ± 3.57 ghijkl	
Cumhuriyet-75	28.82 ± 1.99 fghij		Gediz-75	47.75 ± 1.21 ghijkl	
Altay-2000	29.27 ± 2.48 ghij		Çakmak-79	48.45 ± 3.58 ghijkl	
Şölen-2002	30.25 ± 2.41 hij		Çeşit-1252	50.68 ± 2.05 hijklm	
Fuatbey-2000	31.88 ± 2.39 ijk		Salihli-92	52.09 ± 2.94 ijklm	
İkizce-96	33.54 ± 3.24 jk		Fuatbey-2000	53.48 ± 2.12 ijklm	
Çakmak-79	34.07 ± 2.53 jk		Ankara-98	54.20 ± 0.71 jklm	
Çeşit-1252	41.30 ± 1.82 kl		Kızıltan-91	54.71 ± 2.14 klm	
Ankara-98	44.91 ± 1.34 l		Tüten-2002	56.43 ± 2.06 lmn	
Kızıltan-91	45.26 ± 2.21 l		Kunduru-1149	59.84 ± 1.34 mn	
Yelken-2000	47.63 ± 2.03 l		Yelken-2000	63.77 ± 2.05 no	
Kunduru-1149	48.99 ± 1.65 l		Şölen-2002	68.63 ± 1.86 o	
Ortalama	24.03 ± 1.16		Ortalama	43.31 ± 0.99	

* % Azalma $K_{lo\ a+b/Karot} = 1 - [(K_{lo\ a+b/Karot})_{37°C} / (K_{lo\ a+b/Karot})_{25°C}] \times 100$

% Azalma $K_{lo\ a+b/Karot} = 1 - [(K_{lo\ a+b/Karot})_{37 \rightarrow 50°C} / (K_{lo\ a+b/Karot})_{25°C}] \times 100$

** Her bir sütundaki farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre çeşitler arasında önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

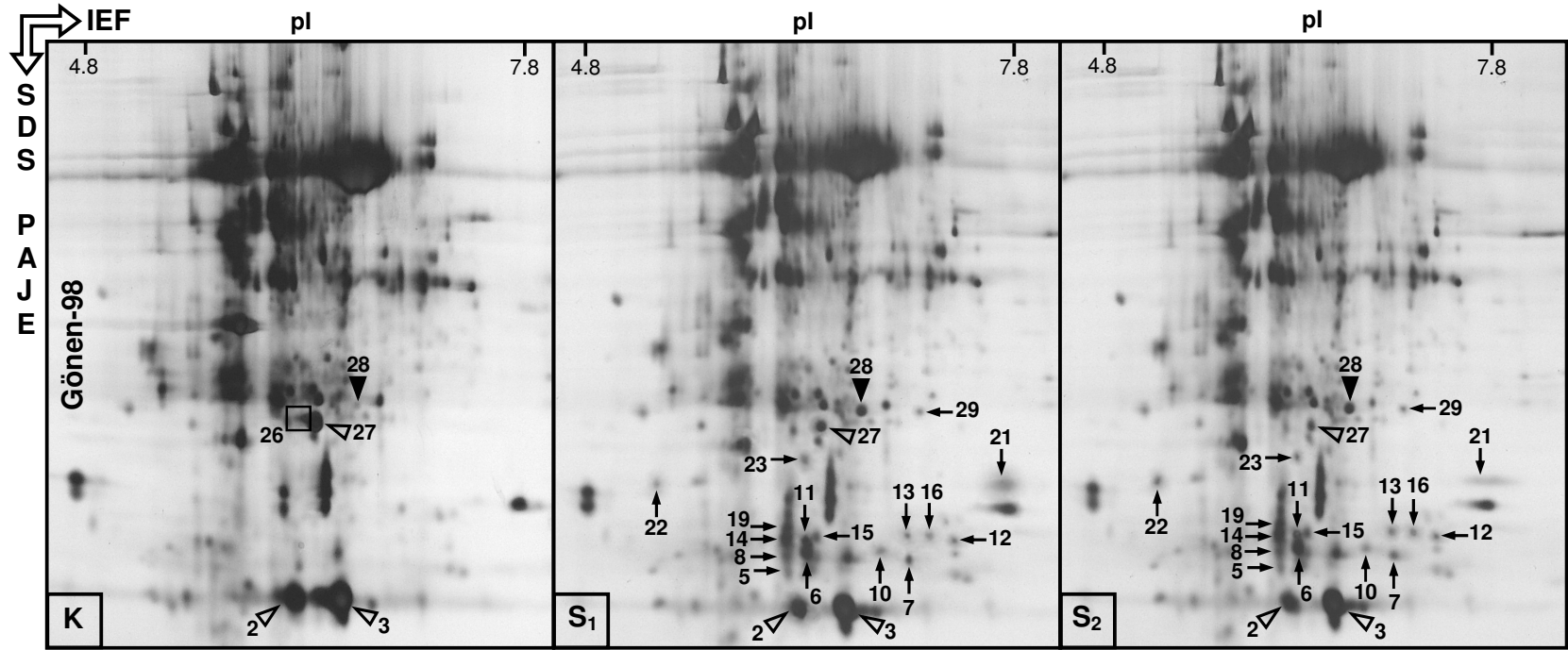
*** Makarnalık buğday çeşitleri koyu yazılmıştır.

4.3 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Protein Sentezi Üzerine Yüksek Sıcaklığın Etkisi

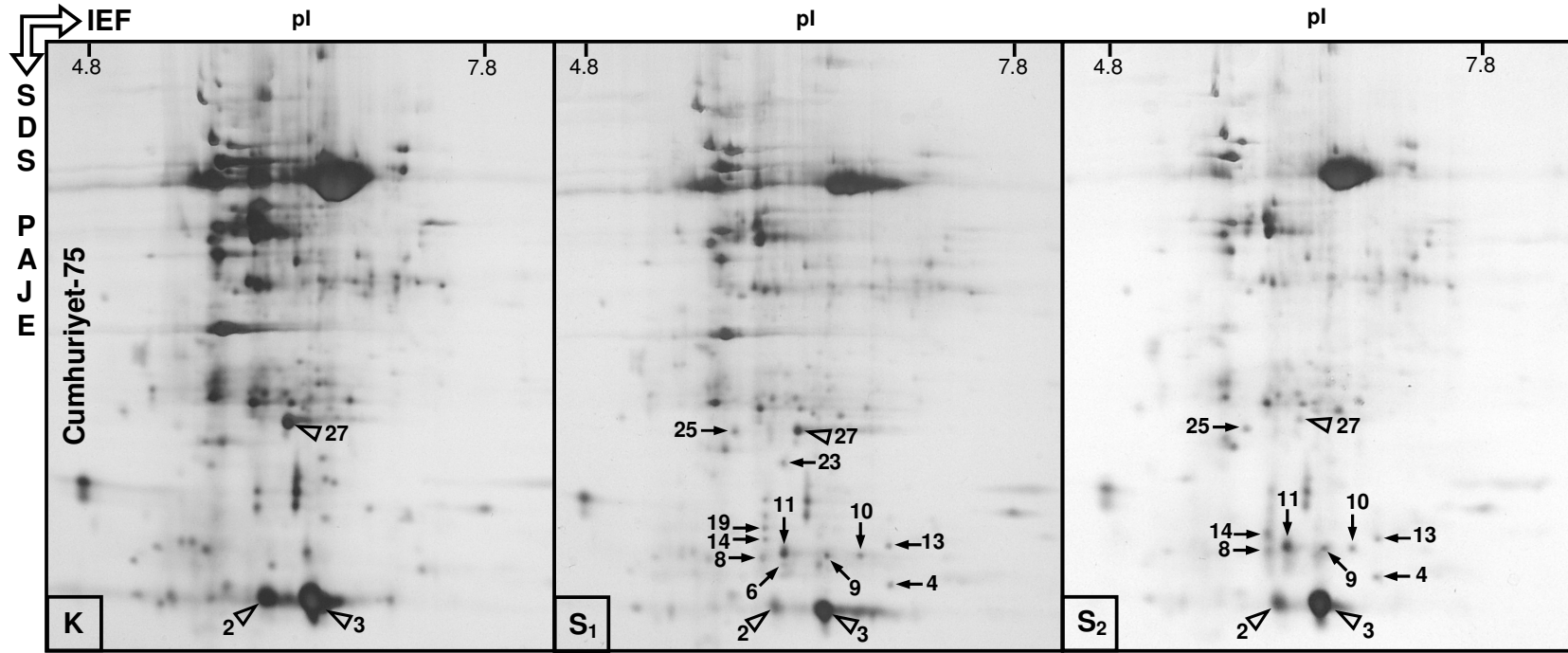
Bu araştırmada, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin 37°C/25°C ve 37→50°C/25°C oranlarında (%) K_{lo} *a+b* birikimindeki azalmaları bakımından dağılımları benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu bağlamda, protein analizlerinde kullanılacak buğday çeşitleri, yüksek sıcaklık şoku uygulamasını kapsayan ve toleransın daha belirgin ortaya konulduğu 37→50°C/25°C oranında K_{lo} *a+b* değerleri dikkate alınarak seçilmiştir. Toplam klorofil birikimindeki azalmaya göre 30 çeşidin % ortalama değerinin (%48.40) altında en düşük azalma gösteren ve termal toleranslı kabul edilen ekmeklik Gönen-98 (%32.13) ve makarnalık Ege-88 (%45.19) buğday çeşitleri ile ortalama değer üzerinde en yüksek azalma gösteren ve termal duyarlı olarak kabul edilen ekmeklik Cumhuriyet-75 (%60.06) ve makarnalık Ankara-98 (%67.14) buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında protein analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmada, 5 günlük buğday fidelerine kontrol (K, 25°C, 24 sa), uyum (S₁, 37°C, 24 sa) ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku (S₂, 37°C, 24 sa→50°C, 1 sa) uygulanmıştır. Bu uygulamaları takiben fidelerin ilk yaprak dokusundan izole edilen proteinler İEF yöntemiyle izoelektrik noktalarına (pI) ve SDS-PAJE yöntemiyle moleküler ağırlıklarına (MA, kDa) göre ayrıştırılmış ve gümüş boyama tekniği ile protein profilleri görünür hale getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

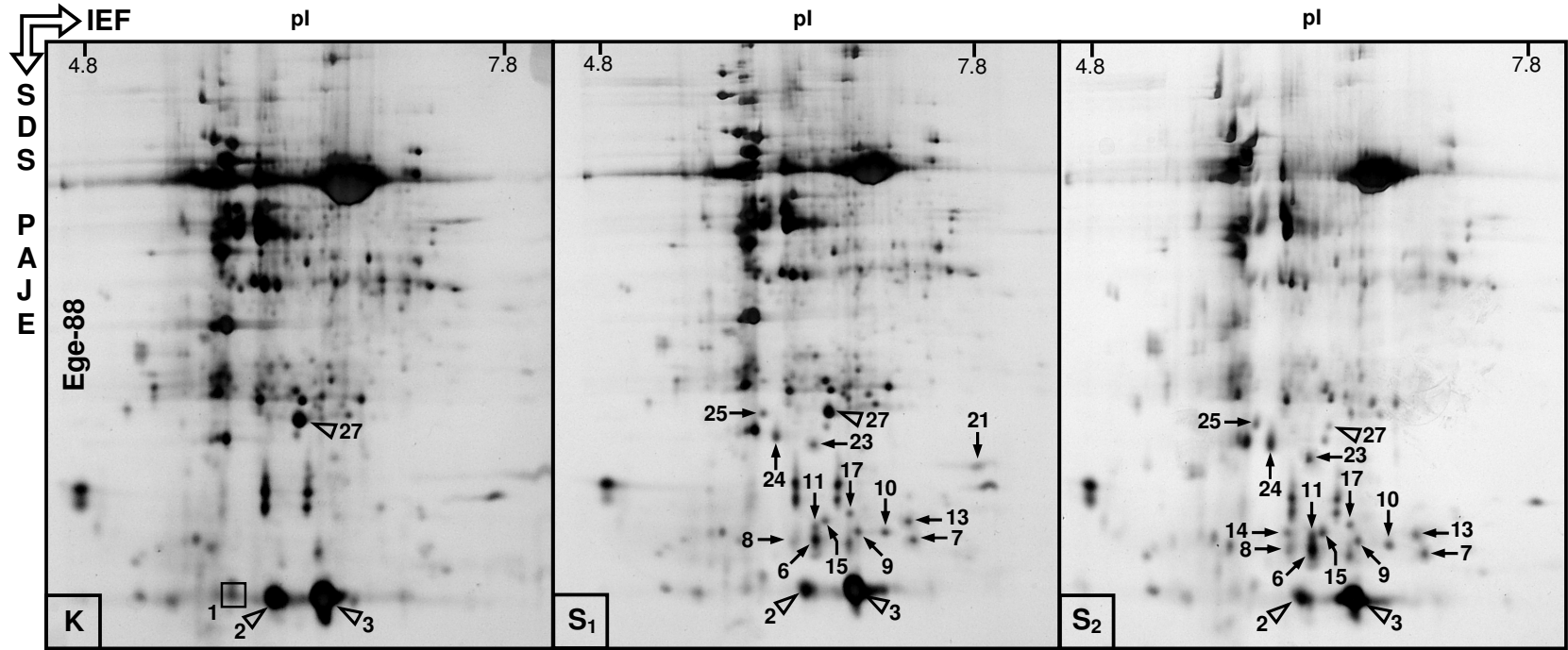
Protein analizlerinde; sentezi kaybolan, yeni sentezlenen, sentez miktarında belirgin artış veya azalış gösterdiği belirlenen proteinler yalnızca düşük moleküler ağırlığa (16.1-24.0 kDa) sahip proteinlerdir. Bu proteinlerin pI değerleri 4.8-7.8 aralığında olup çoğunluğu asidik (< pH 7) proteinlerdir (Şekil 4.3-6, Çizelge 4.5).



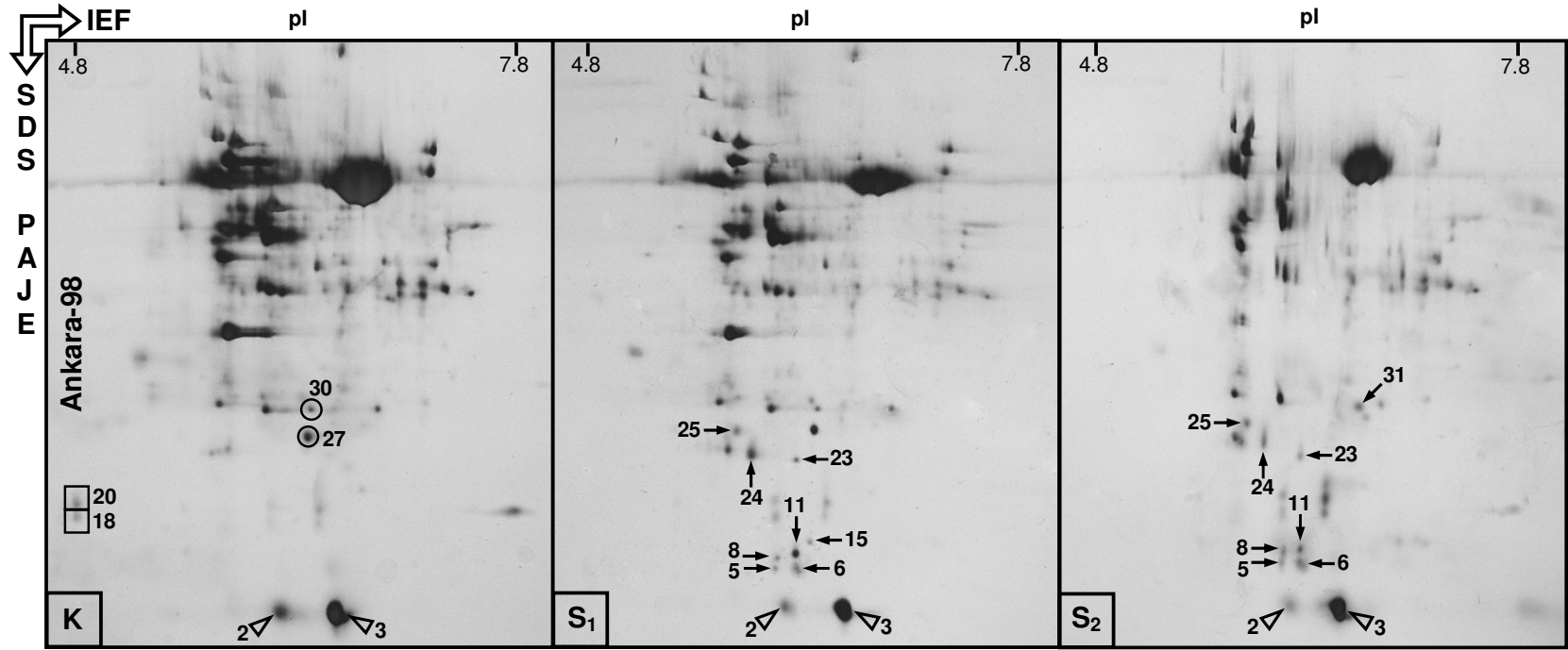
Şekil 4.3 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal toleranslı ekmeklik buğday Gönen-98 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. K (Kontrol: 25°C, 24 sa), S₁ (Uyum: 37°C, 24 sa) ve S₂ (Uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku: 37°C, 24 sa →50°C, 1 sa) sıcaklık uygulamaları. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri ok işareti ile gösterilmiştir. Kontrolle göre S₁ ve S₂'de sentezi kaybolan proteinler □ içerisinde gösterilmiştir. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de sentezi belirgin şekilde artan ▲ ve azalan proteinler △ işareti ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal duyarlı ekmeklik buğday Cumhuriyet-75 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. Kontrol K (Kontrol: 25°C, 24 sa), S₁ (Uyum: 37°C, 24 sa) ve S₂ (Uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku: 37°C, 24 sa →50°C, 1 sa) sıcaklık uygulamaları. Kontrole göre S₁ veya S₂'de yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri ok işareti ile gösterilmiştir. Kontrole göre S₁ veya S₂'de sentezi belirgin şekilde azalan proteinler △ işareti ile gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal toleranslı makarnalık buğday Ege-88 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. K (Kontrol: 25°C, 24 sa), S₁ (Uyum: 37°C, 24 sa) ve S₂ (Uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku: 37°C, 24 sa →50°C, 1 sa) sıcaklık uygulamaları. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri ok işareti ile gösterilmiştir. Kontrolle göre S₁ ve S₂'de sentezi kaybolan proteinler □ içerisinde gösterilmiştir. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de sentezi belirgin şekilde azalan proteinler △ işareti ile gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Farklı sıcaklık uygulamalarına maruz kalan termal duyarlı makarnalık buğday Ankara-98 çeşidinin ilk yaprak dokusundaki çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. K (Kontrol: 25°C, 24 sa), S₁ (Uyum: 37°C, 24 sa) ve S₂ (Uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku: 37°C, 24 sa →50°C, 1 sa) sıcaklık uygulamaları. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri ok işareti ile gösterilmiştir. Kontrolle göre yalnızca S₂'de kaybolan proteinler ○ ve S₁ ve S₂'de sentezi kaybolan proteinler □ içerisinde gösterilmiştir. Kontrolle göre S₁ veya S₂'de sentezi belirgin şekilde azalan proteinler △ işareti ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Termal toleranslı ve duyarlı bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin fide evresinde ilk yaprak dokularında kontrole göre S₁ ve/veya S₂ uygulamalarında sentez durumlarında farklılık belirlenen proteinlerin moleküler ağırlıkları (MA, kDa) ve izoelektrik noktaları (pI)*

Benek no	MA (kDa)	pI	<i>Triticum aestivum</i> L. çeşitleri				<i>Triticum durum</i> Desf. çeşitleri			
			Gönen-98 (Toleranslı)		Cumhuriyet-75 (Duyarlı)		Ege-88 (Toleranslı)		Ankara-98 (Duyarlı)	
			S ₁	S ₂	S ₁	S ₂	S ₁	S ₂	S ₁	S ₂
1	16.1	6.0					-	-		
2	16.1	6.3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
3	16.1	6.6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
4	17.7	7.1			+	+				
5	18.0	6.2	+	+					+	+
6	18.3	6.3	+	+	+		+	+	+	+
7	18.3	7.2	+	+			+	+		
8	18.5	6.2	+	+	+	+	+	+	+	+
9	18.8	6.6			+	+	+	+		
10	18.8	6.9	+	+	+	+	+	+		
11	18.9	6.3	+	+	+	+	+	+	+	+
12	19.0	7.7	+	+						
13	19.2	7.1	+	+	+	+	+	+		
14	19.3	6.2	+	+	+	+		+		
15	19.3	6.4	+	+			+	+	+	
16	19.3	7.5	+	+						
17	19.6	6.6					+	+		
18	20.1	4.8	◇	◇	◇	◇	◇	◇	-	-
19	20.1	6.2	+	+	+					
20	20.7	4.8	◇	◇	◇	◇	◇	◇	-	-
21	21.2	7.8	+	+			+			
22	21.5	5.4	+	+						
23	22.0	6.3	+	+	+		+	+	+	+
24	22.2	6.1					+	+	+	+
25	22.9	6.0			+	+	+	+	+	+
26	22.9	6.4	-	-						
27	23.0	6.4	↓	↓	↓	↓	↓	↓		-
28	23.6	6.7	↑	↑						
29	23.6	7.3	+	+						
30	23.8	6.4	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	-
31	24.0	6.4								+

* Kontrole göre S₁ ve/veya S₂ uygulamalarında yeni sentezlenen (+), sentezi kaybolan (-), miktarı belirgin şekilde artan protein (↑) ya da azalan (↓) proteinleri ifade etmektedir. Makarnalık buğday Ankara-98 çeşidinde kaybolan, fakat diğer çeşitlerde tüm sıcaklık uygulamalarında sentezi belirlenen protein ◇ ile gösterilmiştir.

Çeşitlerin ilk yaprak dokusuna ait çözünebilir proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri Şekil 4.3-6'da verilmiştir. Kontrole göre S₁ veya S₂ uygulamalarında kaybolan normal hücrel proteinler kontrol jelleri, yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri S₁ ve S₂ jelleri ve sentezi belirgin şekilde artan veya azalan proteinler ise K, S₁ ve S₂ jellerinde gösterilmiştir (Şekil 4.3-6, Çizelge 4.5).

Ekmeklik buğday Gönen-98 çeşidinin ilk yaprak dokusunda kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında, 22.9 kDa (pI 6.4; protein no. 26) molekül ağırlığında bir proteinin sentezi kaybolmuştur (Şekil 4.3, Çizelge 4.5). Kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında düşük moleküler ağırlıklı 16 yüksek sıcaklık şoku proteininin (18.0-23.6 kDa, pI 5.4-7.8) sentezlendiği saptanmıştır. Kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 23.6 kDa (pI 6.7; protein no. 28) molekül ağırlığında bir proteinin sentezinde belirgin bir artış belirlenirken, 3 proteinin (16.1, 16.1 ve 23.0 kDa, pI 6.3, 6.6 ve 6.4; protein no. 2, 3 ve 27) sentezinde belirgin bir azalma görülmüştür (Şekil 4.3, Çizelge 4.5).

Ekmeklik buğday Cumhuriyet-75 çeşidinin ilk yaprak dokusunda, kontrole göre S₁ uygulamasında düşük moleküler ağırlıklı 11 yüksek sıcaklık şoku proteininin (17.7-22.9 kDa; pI 6.0-7.1) sentezi belirlenmiştir (Şekil 4.4, Çizelge 4.5). S₁ uygulamasında yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinlerinden 3'ünün (18.3, 20.1 ve 22.0 kDa; pI 6.3, 6.2 ve 6.3) sentezi S₂ uygulamasında gözlenmemiştir. Kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 3 düşük moleküler ağırlıklı (16.1, 16.1 ve 23.0 kDa, pI 6.3, 6.6 ve 6.4; protein no. 2, 3 ve 27) proteinin sentezinde belirgin azalma saptanmıştır (Şekil 4.4, Çizelge 4.5).

Makarnalık buğday Ege-88 çeşidinin ilk yaprak dokusunda kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 16.1 kDa (pI 6.0, protein no.1) moleküler ağırlığında bir proteinin sentezi kaybolmuştur (Şekil 4.5, Çizelge 4.5). Kontrole göre S₁ uygulamasında düşük moleküler ağırlıklı 13 yüksek sıcaklık şoku proteini (18.3-22.9 kDa; pI 6.0-7.8) sentezlenirken, bu proteinlerden yalnızca 21.2 kDa (pI 7.8; protein no.21) molekül ağırlığındaki proteinin sentezi S₂ uygulamasında

gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 19.3 kDa (pI 6.2, protein no.14) molekül ağırlığındaki bir yüksek sıcaklık şoku proteininin sentezi kontrole göre yalnızca S₂ uygulamasında belirlenmiştir. Kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 3 düşük moleküler ağırlıklı (16.1, 16.1 ve 23.0 kDa, pI 6.3, 6.6 ve 6.4; protein no. 2, 3 ve 27) proteinin sentezinde belirgin azalma saptanmıştır (Şekil 4.5, Çizelge 4.5).

Makarnalık buğday Ankara-98 çeşidinin ilk yaprak dokusunda kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 20.1 ve 20.7 kDa (pI 4.8; protein no.18, 20) molekül ağırlığında 2 proteinin sentezi kaybolmuştur (Şekil 4.6, Çizelge 4.5). İlginç olarak, bu proteinlerin sentezi diğer genotiplerde kontrol ve her iki yüksek sıcaklık uygulamasında da belirlenmiştir. Kontrole göre yalnızca S₂ uygulamasında sentezi kaybolan 23.0 kDa (pI 6.4; protein no. 27) molekül ağırlığındaki proteinin diğer çeşitlerde kontrole göre her iki sıcaklık uygulamasında sentezinin belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Ek olarak, kontrole göre yalnızca S₂ uygulamasında sentezi kaybolan 23.8 kDa (pI 6.4; protein no. 30) molekül ağırlığındaki proteinin diğer çeşitlerde kontrole ve her iki sıcaklık uygulamasında da var olduğu belirlenmiştir. Kontrole göre S₁ ve/veya S₂ uygulamalarında düşük moleküler ağırlıklı 8 yüksek sıcaklık şoku proteininin (18.0-24.0 kDa, pI 6.0-6.4) sentezlendiği gözlenmiştir. Bununla birlikte, 19.3 kDa (pI 6.4; protein no. 15) molekül ağırlıklı bir yüksek sıcaklık şoku proteininin sentezi kontrole göre yalnızca S₁ uygulamasında ve 24.0 kDa (pI 6.4; protein no. 31) molekül ağırlıklı yüksek sıcaklık şoku proteininin sentezi ise yalnızca S₂ uygulamasında belirlenmiştir. Kontrole göre S₁ ve S₂ uygulamalarında 16.1 kDa molekül ağırlığındaki 2 proteinin (pI 6.3 ve 6.6; protein no. 2 ve 3) sentezinde belirgin bir azalma belirlenmiştir (Şekil 4.6, Çizelge 4.5).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Hücre Canlılığı ve Termal Tolerans

Bu araştırmada, farklı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan 16 ekmeklik ve 14 makarnalık buğday çeşidinin fide evresindeki ilk yaprak dokusunda 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) indirgenmesine bağlı olarak hücre canlılığı ve çeşitler arasında termal tolerans açısından genetik çeşitlilik belirlenmiştir.

TTC hücre canlılık testi, dehidrogenaz solunum enzimleri aracılığıyla tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesi prensibine dayanmaktadır (Towill and Mazur 1975). Bu nedenle, TTC testi mitokondriyal elektron transfer zincirini değerlendirmekte ve böylece solunum aktivitesi belirlenebilmektedir. Çalışmamızdakine benzer veya aynı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan buğday çeşitlerinin erken fide evresindeki koleoptil dokuları (Yildiz and Terzioğlu 2006a) ve yaprak dokularında (Porter et al. 1994, Fokar et al. 1998, Ibrahim and Quick 2001a) TTC'nin indirgenmesine bağlı olarak termal toleransta genotipik çeşitlilik belirlenmiştir. Bu araştırmalarda, fidelerin subletal sıcaklıklarda uyumlanmasına bağlı olarak termal toleransın kazanıldığı ve incelenen genotipler arasında önemli farklılıkların olduğu saptanmıştır. Bu araştırmada, 37°C'de 24 sa uyum ve uyumu takiben 50°C'de 1 sa yüksek sıcaklık şoku uygulamalarına maruz bırakılan çeşitlerin fidelerinde tetrazolium tuzunun indirgenmesine bağlı olarak hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Chen vd. (1982), yüksek sıcaklık şoku uygulamalarından önce 30°C üzerindeki sıcaklıklarda 24 sa uyumlanmanın hücre canlılığının sürdürülmesi için gerekli olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, test ettikleri farklı bitki türlerinde optimum uyum sıcaklıklarını yaklaşık 35-37°C olarak belirlemiştir. Uyumlanmamış kışlık buğday çeşitlerinin yaprak dokuları (Porter et al. 1994) ve bazı kültür ve yabani buğday genotiplerinin koleoptil dokularının (Yildiz and Terzioğlu 2006a) letal sıcaklıklara maruz kalmasıyla termal toleransın kazanılmadığı ve değerlerin negatif olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, uyumlanan fidelerde termal toleransın kazanıldığını

ve genotipler arasında önemli düzeyde farklılıkların olduğu belirlenmiştir (Porter et al. 1994, Yıldız and Terzioğlu 2006a). Bu nedenle, araştırmamızda termal tolerans açısından çeşitler arasındaki farkın ortaya konması için 37°C’de 24 sa uyumlanmış fideler kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, kazanılan termal toleransın belirlenmesi için uyumlanmış bir grup fidenin ilk yaprak dokularından alınan segmentler 50°C’de 1 sa yüksek sıcaklık şokuna maruz bırakılmıştır. Uyum sıcaklığına göre uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulamasında TTC indirgenmesi önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). İlk yaprak dokularının ön-uygulama (37°C) sıcaklıkları ile uyumlanmaları, yüksek sıcaklık şoku uygulamasının letal etkisine karşı koruma ve fidelerin canlılıklarını sürdürmelerini sağlamıştır. Yüksek sıcaklık şoku uygulamasına bağlı olarak TTC indirgenmesi ve dolayısıyla hücre canlılığındaki azalmanın, mitokondrilerin iç membranındaki bozulma ve/veya solunum enzimlerinin inaktivasyonundan dolayı elektron transfer zincirindeki düzensizlikten kaynaklandığı bildirilmiştir (Porter et al. 1994).

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yapraklarında, TTC indirgenmesine bağlı olarak uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulamasındaki absorbans değerleri, uyum sıcaklığındaki absorbans değerlerine oranlandığında hesaplanan termal tolerans (%TT) seviyeleri arasında önemli genotipik farklılıklar belirlenmiştir. En düşük (%7.91) ve en yüksek (%76.33) termal tolerans değerleri sırasıyla Sönmez-2001 ve Basribey-95 ekmeklik buğday çeşitlerinde belirlenmiştir. Tüm çeşitlerin ortalama TT değeri (%30.86) dikkate alındığında 7 ekmeklik (Basribey-95, Gerek-79, İkizce-96, Bezostaya-1, Ceyhan-99, Gönen-98 ve Gün-91) ve 5 makarnalık (Amanos-97, Ankara-98, Ege-88, Fuatbey-2000 ve Çakmak-79) buğday çeşidine ait termal tolerans değerlerinin TT (%) ortalamasının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, 9 makarnalık ve 9 ekmeklik buğday çeşidinin termal tolerans değerlerinin TT (%) ortalamasının altında olduğu ve bu çeşitlerin canlılığını önemli düzeyde kaybettiği görülmektedir. Diğer taraftan, benzer sonuçlar, İbrahim ve Quick (2001a) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, 14 yazlık ve kışlık buğday çeşidinin 8-10 günlük fidelerini 39°C’de 48 sa uyumlamış ve uyumlanan bir grup fidenin yaprak

segmentlerini 49°C'de 30 dakika yüksek sıcaklık şokuna maruz bıraktıklarında çeşitlerin kazanılan termal tolerans değerleri bakımından önemli düzeyde farklılıkların olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmanın varyans analizi sonuçlarına göre, tüm çeşitlerin termal tolerans ortalaması (%58.5) dikkate alındığında 4 çeşidin aynı önemlilik düzeyinde yüksek termal tolerans seviyelerine (%80.8-82.2) ve bu çeşitlere göre 6 çeşidin aynı önemlilik düzeyinde düşük termal tolerans seviyelerine (%54.7-63.9) sahip olduğu belirlenirken, diğer 4 çeşidin ortalamasının altında daha düşük termal tolerans seviyelerine (%20.4-39.8) sahip olduğu belirlenmiştir (Ibrahim and Quick 2001a).

Aynı buğday çeşitlerinin farklı büyüme ve gelişim evrelerinde belirlenen termal tolerans değerlerinde farklılıklar belirlenmiştir. Keza, çalışmamızda kullanılan ve aynı sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılan Bezostaya-1 ekmeklik buğday çeşidinin koleoptil dokusunda TTC indirgenmesine bağlı olarak termal tolerans değeri %37.82 olarak belirlenirken (Yildiz and Terzioğlu 2006a), çalışmamızda bu değer ilk yaprak dokusunda %54.90 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, erken fide evresindeki koleoptil dokusunun ilk yaprak dokusuna göre yüksek sıcaklığa daha fazla duyarlı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, Fokar vd. (1998), 8 yazlık buğday çeşidinin fide evresinde ilk yaprak ve çiçeklenme evresinde bayrak yaprakta TTC testi ile belirlenen termal tolerans değerlerinde farklılıklar belirlemiştir. Bu araştırmacılar, fide evresine göre çiçeklenme evresinde her çeşidin termal toleransını farklı (genellikle termal tolerans değerinde artma veya azalma şeklinde) bulmuştur. Ancak, iki farklı büyüme ve gelişme evresinde (fide ve çiçeklenme evresi) test ettikleri çeşitlerin ortalama termal tolerans değerleri arasında önemli düzeyde farklılığın olmadığı vurgulanmıştır (Fokar et al. 1998).

Farklı sıcaklık derecesi ve sürelerinde uyumlanan ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku uygulanan aynı buğday çeşitlerinin fide evresindeki ilk yaprak dokularında yapılan TTC indirgenme testine göre belirlenen termal tolerans değerleri arasında farklılıklar belirlenmiştir. Ibrahim ve Quick (2001a), 39°C'de 48 sa uyum ve uyumu takiben 49°C'de 30 dakika yüksek sıcaklık şoku uygulamalarında TTC indirgenmesine bağlı olarak Kauz buğday çeşidinde termal

tolerans değerini %82.2 olarak bildirirken, Fokar vd. (1998), 34°C’de 24 sa uyum ve uyumu takiben 50°C’de 1 sa yüksek sıcaklık şoku uygulamalarında Kauz buğday çeşidinin termal tolerans değerini %18.7 gibi oldukęa düşük bir değer olduğunu bildirmiştir. Buna ilaveten, bu iki ayrı ęalıřmada test edilen Seri 82, V5, Siete Cerros ve Deberia buğday çeşitlerinde termal tolerans seviyeleri (Fokar et al. 1998, Ibrahim and Quick 2001a) arasında farklılıkların olduğu tarafımızdan belirlenmiştir. Diğer taraftan, Ibrahim ve Quick (2001a), 39°C’de 48 sa uyum ve uyumu takiben 49°C’de 30 dakika yüksek sıcaklık şoku uygulamalarına maruz kalan kışlık TAM 108 buğday çeşidinin termal tolerans değerini %63.9 olarak bildirirken, Porter vd. (1994), daha düşük sıcaklıkta (37°C) ve kısa sürede (24 sa) uyumlanan ve uyumu takiben daha yüksek sıcaklıkta (50°C) ve uzun sürede (2 sa) şoklanan TAM 108 buğday çeşidinin termal tolerans seviyesinin %72.8 olduğunu bildirmiştir. Bu veriler ışığında, TTC hücre canlılık testi yüksek sıcaklık zararının belirlenmesinde önemli bir testtir. Ancak, termal tolerans açısından genotipler arasındaki farkın bitki gelişiminin hemen hemen aynı evrelerinde çok farklı sonuçlara neden olması uygulanan uyum ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şokunun derece ve sürelerinden kaynaklanabilir. Diğer taraftan, test edilen bitki genotiplerinin farklı gelişim evrelerinde hücre canlılığı bakımından değerlendirilmesi belirlenen termal toleransın hassasiyetini arttırabilir.

5.2 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Fotosentetik Pigmentlerin Birikimi ve Termal Tolerans

Bu araştırmada, fotosentetik pigment analizleri için bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin karanlıkta büyütölmüş 5 günlük etiyole fideleri kontrol (25°C, 24 sa), uyum (37°C, 24 sa) ve uyumu takiben yüksek sıcaklık şoku (37°C, 24 sa→50°C, 1 sa) uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Karanlıktaki bu uygulamaları takiben etiyole buğday fideleri klorofil ve karotenoidlerin pigmentasyonu için 25°C’de 24 sa (iyileşme periyodu) sürekli ışığa maruz bırakılmıştır.

Fotosentetik pigmentlerin analizi, yüksek sıcaklıkları takiben optimum sıcaklıklarda ve ışıkta etiyole dokuların klorofil sentez etme ve biriktirme yeteneği

temeline dayanmaktadır. Bu test, ilk olarak kabak bitkisinde sıcaklık hassasiyeti ve yüksek sıcaklık şoku cevabının araştırılması (Burke 1994) için geliştirilmiş ve daha sonra soya fasulyesinde (*Glycine max*) kazanılan termotoleransın belirlenmesinde kullanılmıştır (Burke 1998). Burke vd. (2000), fotosistem II'nin klorofil a/b ışık toplayan pigment-protein kompleksi ile ilgili yapılan bir çalışmaya (Burke et al. 1978) dayanarak kazanılan termal toleransın değerlendirilmesi için klorofili bir parametre olarak seçmiştir. Araştırmacılar, pigment-protein kompleksinin nükleusta kodlandığını, sitoplazmada translasyona uğradığını ve kloroplast tilakoidine taşındığını ve yüksek sıcaklık zararı için bir belirleyici olduğunu ifade etmiştir. Klorofil birikimi inhibisyon testi birçok bitki türünde yüksek sıcaklık zararı ve termal toleranstaki genotipik farklılıkların belirlenmesi için kullanılmıştır (Burke 1998, Burke et al. 2000, O'Mohany et al. 2000, Dash and Mohanty 2001, Burke and O'Mahony 2001).

Buğdayda klorofil biyosentezi ve birikiminin 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda zarar gördüğü bildirilmiştir (O'Mahony et al. 2000). Araştırmamızda, kontrole göre yüksek sıcaklık uygulamalarında ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin toplam klorofil (Klo $a+b$) pigmentasyonu sıcaklığın artmasına bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). Tewari ve Tripathy (1998), klorofil birikimindeki azalmanın klorofil biyosentezinde fonksiyona sahip 5-aminolevulinik asit dehidrataz ve porfobilinojen deaminaz enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda inhibe olmasından kaynaklandığını bildirmiştir.

Birçok organizmanın yüksek sıcaklık koşullarında hayatta kalma ve iyileşme (recovery) yeteneği "bazal termal tolerans" ve "kazanılan termal tolerans" tarafından belirlenmektedir. Bazal termal tolerans, optimum sıcaklığın üzerinde organizmada zarara neden olan sıcaklık ve uygulama süresi ile ilişkilidir. Kazanılan termal tolerans ise organizmaya ilk olarak subletal bir sıcaklık uygulanırsa, ardından uygulanan letal sıcaklığa organizmanın dayanma yeteneğidir (Burke et al. 2000). Bu bilgiler ışığında, 37°C/25°C oranında Klo $a+b$ birikimini buğday çeşitlerinin "bazal termal toleransı" ve 37→50°C/25°C oranındakini ise buğday çeşitlerinin "kazanılan termal toleransı" olarak

değerlendirmek mümkün olabilir. Bu bağlamda, klorofil pigmentasyonu (Klo $a+b$ birikimi) bakımından bazal termal toleransı en yüksek olan çeşit Ceyhan-99 ekmeklik buğday ve en düşük olan ise Kızıltan-96 makarnalık buğday çeşitleridir. Buna karşın, yüksek sıcaklık şoku uygulamasına bağlı olarak klorofil pigmentasyonu bakımından kazanılan termal tolerans bazal termal toleransa göre değerlendirildiğinde çeşitlerin sıralamasında bazı değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Buna göre, klorofil pigmentasyonu bakımından kazanılan termal toleransı en yüksek olan çeşit Gönen-98 ekmeklik buğday ve en düşük olan ise Ankara-98 makarnalık buğday çeşitleridir. Ancak, tüm çeşitlerin bazal ve kazanılan termal tolerans seviyelerine göre belirlenen ortalamalar (sırasıyla %34.22 ve %48.40) dikkate alındığında, ortalamaların üzerinde ve altında sıralamaları farklı olsa bile aynı makarnalık ve ekmeklik buğday çeşitlerinin var olduğu tespit edilmiştir. Buna ilaveten, her iki yüksek sıcaklık uygulamasında makarnalık buğday (AB genomu) çeşitlerine göre ekmeklik buğday (ABD genomu) çeşitlerinin klorofil pigmentasyonu genellikle yüksek sıcaklıktan daha az etkilenmiştir. Yapılan bir çalışmada, hekzaploid ekmeklik buğdaya (Chinese Spring) göre D genomunun 7. kromozomunun (7D) kısa kolundan yoksun ditelosomik bir hattının (DT7DS) yüksek sıcaklık uygulamasında düşük klorofil birikimi oranına (%7) sahip olduğu ve bu nedenle, hattın kazanılan termal tolerans seviyesinin düşük olduğu bildirilmiştir (O'Mahony et al. 2000). Bu bağlamda, araştırmamızda test edilen ekmeklik buğday çeşitlerine göre makarnalık buğday çeşitlerinin genellikle daha az klorofil biriktirmesinin nedeninin muhtemelen makarnalık buğday çeşitlerinde D genomunun olmayışından kaynaklanabileceği ileri sürülebilir.

Buğdayda optimum enzim fonksiyonu için termal kinetik pencere 17.5-23°C ve bununla birlikte, optimum fotosentez oranı için optimum sıcaklık 25°C'dir (Burke et al. 1988). Araştırmamızda, etiyole buğday fidelerinde klorofil birikimi için sürekli ışığa maruz bırakma optimum fotosentez sıcaklığı olan 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklık stresinin buğday fidelerinin ilk yapraklarında senesensi teşvik ettiğinden dolayı (Mohanty et al. 1987, Mohanty 1990) iyileşme (recovery) işlevleri üzerinde senesensin istenmeyen

etkilerinden kaçınmak için stres sonrası büyüme periyodu 24 saat ile sınırlandırılmıştır. Diğer taraftan, klorofil inhibisyonu testini kullanarak kazanılan termal toleranstaki eksiklikleri tam olarak belirleyebilmek için ebeveyn hat ve bundan elde edilen mutantları termal tolerans açısından değerlendirmede uygun sıcaklık parametrelerinin yalnızca ebeveyn hat için belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir (Burke 2001). İncelenen her bitki türü için belirlenmesi gereken bu sıcaklık parametreleri; maksimum klorofil birikimi, letal sıcaklıktan önce maksimum klorofil birikimini sağlayan ön-uyum sıcaklığı ve klorofil birikiminde maksimum azalmaya neden olan minimum letal sıcaklık için “optimum sıcaklıkları” içermektedir (Burke 1994). Ancak çalışmamızda, iki buğday türüne ait çeşitlerin fazlalığı nedeniyle bu sıcaklık parametreleri belirlenmemiş olmasına rağmen, 25°C’de buğday çeşitlerinin klorofil (Klo $a+b$) biriktirme miktarı birbirine çok yakınken (1.14-1.43 mg.gYA⁻¹), 37°C (0.51-1.15 mg.gYA⁻¹) ve 37→50°C (0.42-0.86 mg.gYA⁻¹) uygulamalarında klorofil birikimi daha geniş skalada aralanmıştır. Bu bağlamda, klorofil birikimine bağlı termal toleranstaki genotipik çeşitliliğin belirlenmesinde uygulanan yüksek sıcaklıkların uygun olduğu görülmektedir.

Dash ve Mohanty (2001), 8 ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidinin 4 günlük etiyole fidelerini ışıktaki 25°C ve 40°C’de 60 sa sıcaklık uygulamalarını takiben 25°C’de iyileşme periyoduna maruz bırakmış ve toplam klorofil birikimindeki inhibisyona göre çeşitlerin termal toleransındaki genotipik farklılıkları değerlendirmiştir. Araştırmacılar, yüksek sıcaklık stresine maruz kalan etiyole fidelerin yaprak dokularında yüksek sıcaklık uygulamasındaki klorofil miktarını kontroldekine oranladığında (%) klorofil birikimindeki azalmanın buğday çeşitleri arasında %32 ile %54 arasında değiştiğini bildirmiştir. Araştırmamızda ise 37°C/25°C oranında İkizce-96, Kündürü-1149, Ankara-98 ve Kızıltan-91 (Klo $a+b$ birikimindeki azalma %50.73-61.97) buğday çeşitleri hariç diğer çeşitlerde Klo $a+b$ miktarının %50’nin altında azalma (%15.37-49.35) gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, letal sıcaklık uygulamasını kapsayan 37→50°C/25°C oranında Klo $a+b$ birikimindeki azalmanın %32.13 ile %67.14 arasında değiştiği ve 50°C’de 1 sa yüksek sıcaklık şoku uygulamasından önce

37°C’de 24 sa uyumun klorofil birikimindeki inhibisyona karşı önemli koruma sağladığı belirlenmiştir. O’Mahony vd. (2000), hekzaploid Chinese Spring ekmeklik buğday çeşidinin 40°C’de 4 sa uyumu takiben 48°C’de 30 dakika yüksek sıcaklık şoku uygulamasına (klorofil birikiminde %95’den fazla azalmaya neden olan) maruz bırakılan yaprak dokusundaki klorofil miktarını kontroldekine (30°C) oranladığında klorofil birikiminde %48 azalmanın olduğunu belirtmiştir. Araştırmamızda, direkt uygulandığında bitkilerin ölümüne neden olan yüksek sıcaklık şoku (50°C, 1 sa), 37°C (24 sa) uyum sıcaklığının uygulanması ile birlikte tüm çeşitlerin ortalama klorofil birikiminde %48.40 azalmaya neden olmuştur. Uygulanan subletal ve letal sıcaklıklar buğday çeşitlerinin klorofil biriktirme bakımından önemli genotipik farklılıklar oluşturmasına neden olmuştur. Ancak, letal sıcaklık uygulamasını kapsayan 37→50°C uygulamasında klorofil birikiminin kontrole oranına göre kazanılan termal toleransın ve genotipik farklılığın belirlenmesinin daha önemli olduğu ileri sürülebilir.

Bu araştırmada, yüksek sıcaklığa bağlı olarak karotenoid birikimi buğday çeşitleri arasında oldukça farklılık göstermiştir. 37°C ve 37→50°C uygulamalarına maruz bırakıldıktan sonra kontrol sıcaklığında 24 sa sürekli ışık periyoduna alınan çeşitlerin etiyoletid fidelerinde karotenoid birikimindeki inhibisyonu kontrole göre oranlandığında (%) sırasıyla %2.44-30.05 ve %0.29-32.67 olarak belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıkta karotenoid birikimindeki bu düşük inhibisyona ilaveten bazı çeşitlerde artışlar saptanmıştır. Sonuç olarak, iyileşme periyodunda toplam klorofil birikimine göre karotenoid birikiminin yüksek sıcaklığa daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak, Dash ve Mohanty (2001), 25°C ve 40°C’de 60 sa sıcaklık uygulamalarını takiben 25°C’de iyileşme periyoduna maruz bırakılan 8 *Triticum aestivum* çeşidinde, klorofil pigmentasyonundaki azalmayı kontrole göre oranladıklarında azalmanın %32-54 arasında ve karotenoid pigmentasyonundaki azalmanın ise klorofil birikimindeki azalmaya göre daha düşük (%20-52) olduğunu bildirmiştir.

Bu araştırmada, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin klorofil/karotenoid oranı sıcaklığın artışına bağlı olarak genellikle kademeli olarak azalmıştır.

Klorofil birikimindeki azalmaya (%) göre genellikle tüm çeşitlere ait ortalamaların üzerinde sıralanan ekmeklik buğday çeşitleri termal toleranslı, ortalamanın altında sıralanan makarnalık buğday çeşitleri ise termal duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Klorofil/karotenoid oranında da benzer sonuçlar saptanmıştır. Yani, makarnalık buğday çeşitlerine göre ekmeklik buğday çeşitlerinde karotenoid miktarındaki azalmaya bağlı olarak klorofil/karotenoid oranı artmıştır. Buna karşın, yapılan bir çalışmada, 45°C’de 2 sa yüksek sıcaklık uygulamasına maruz bırakılan termal toleranslı yabani domates genotipi Nagcarlang’da karotenoid miktarının arttığı ve dolayısıyla klorofil/karotenoid oranının azaldığı, fakat termal duyarlı kültür domates çeşidi Campbell-28’de klorofil/karotenoid oranının değişmediği bildirilmiştir (Camejo et al. 2005). Araştırmamızda, yüksek sıcaklık uygulamalarının etiyole fidelere uygulanması ve ardından ışığa alındığında sıcaklığın optimum olması bitkilerin karotenoidlerin sentezi ilgili mekanizmalara göre klorofil biyosentez mekanizmalarını daha fazla çalıştırdığı ve koşulların optimum olması nedeniyle ışık toplayıcı sistemde koruyucu olarak görev yapan karotenoidlere çok fazla gereksinim olmadığı ileri sürülebilir.

5.3 Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Yüksek Sıcaklık Şoku Proteinleri ve Termal Tolerans

Burke (1998), TTC indirgenme testi ve klorofil birikimi testini yüksek sıcaklık zararının belirlenmesi için karşılaştırdığında, daha düşük letal sıcaklıklarda klorofil birikiminin zarar görmesi nedeniyle klorofil pigmentasyonu testinin çok daha hassas bir indikatör olabileceğini bildirmiştir. Bu nedenle, araştırmamızda letal sıcaklığı kapsayan 37→50°C uygulamasındaki Klo *a+b* birikimi kontrole (25°C) oranlandığında tüm çeşitlerin ait ortalamanın (%48.40) üzerinde en fazla ve ortalamanın altında en az klorofil biriktiren birer ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitleri seçilmiştir. Bu bağlamda, çeşitler termal toleranslarına göre en yüksekten en düşüğe doğru şu şekilde sıralanmaktadır: Gönen-98 (ekmeklik) > Ege-88 (makarnalık) > Cumhuriyet-75 (ekmeklik) > Ankara-98 (makarnalık).

Bu araştırmada, buğday çeşitlerine ait 5 günlük fideler farklı sıcaklık uygulamalarına [25°C, 24 sa (K); 37°C, 24 sa (S₁) ve 37°C, 24 sa→50°C, 1 sa (S₂)] maruz bırakıldıktan sonra ilk yaprak dokularından ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin profilleri iki-yönlü (2-D) elektroforezi (İEF/SDS-PAJE) takiben gümüş boyama kullanılarak analiz edilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamalarında yeni sentezlenen yüksek sıcaklık şoku proteinleri (YSSP'ler), sentezi kaybolan, miktarı artan veya azalan normal hücresel proteinlerin moleküler ağırlıkları (MA, kDa) ve izoelektrik noktaları (pI) belirlenmiştir. Farklı sentez durumlarına sahip olan bu proteinlerin düşük moleküler ağırlıklı (16.1-24.0 kDa) ve çoğunlukla asidik (pI 4.8-6.9) karakterde olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen buğday eşitlerinin 2-D elektroforetik protein profillerinde çok sayıda polipeptid belirlenmiştir. Ekmeklik (Gönen-98 ve Cumhuriyet-75, ABD genomuna sahip) ve makarnalık (Ege-88 ve Ankara-98, AB genomuna sahip) buğday çeşitlerinin genel olarak benzer profillere sahip olduğu gözlenmiştir. Farklı ploidi seviyesine sahip olan ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin aynı moleküler ağırlıkta ve izoelektrik noktasında proteinleri sentezleyebilmesi, farklı genomlardan oluşan bu türlerin benzer polipeptidleri sentezleyebileceğini göstermektedir. Benzer sonuçlar, farklı genomlara sahip tetraploid ve hekzaploid buğday çeşitlerinde de bildirilmiştir (Ouerghi et al. 2000, Yıldız In press).

Bu araştırmada, buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda kontrole göre 37°C ve 37→50°C veya yalnızca 37→50°C uygulamasında sentezi kaybolan düşük moleküler ağırlıklı bazı normal hücresel proteinler belirlenmiştir. Termal toleranslı ekmeklik Gönen-98 buğday çeşitinde 22.9 kDa (pI 6.4) ve makarnalık Ege-88 buğday çeşitinde 16.1 kDa (pI 6.0) molekül ağırlığında birer, termal duyarlı makarnalık Ankara-98 buğday çeşitinde ise 4 normal hücresel proteinin (20.1 kDa, pI 4.8; 20.1 kDa, pI 4.8; 23.0 kDa, pI 6.4 ve 23.8 kDa, pI 6.4) kaybolduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, termal duyarlı ekmeklik Cumhuriyet-75 buğday çeşitinde sentezi kaybolan normal hücresel protein belirlenmemiştir. Yıldız ve Terzioğlu (2006a), yüksek sıcaklık stresinin bir

sonucu olarak bazı normal hücrel proteinlerin kaybolmasını bu proteinlerin yüksek sıcaklık stresi sırasında kararsız olmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Subletal ve üzerindeki sıcaklıklarda, yüksek sıcaklık şoku proteinlerinin miktarındaki artış ile diğer birçok proteinin sentezindeki azalmanın eş zamanlı meydana geldiği ve bu metabolik işleyişin termal toleransın kazanılması ile aynı zamanda gerçekleştiği bildirilmiştir (Lindquist and Craig 1988, Vierling 1991).

Tüm organizmalarda, yüksek sıcaklığa maruz kalma yüksek sıcaklık şoku proteinleri (YSSP'ler) olarak adlandırılan bir grup proteinin sentezi ile sonuçlanan yüksek sıcaklık cevabını teşvik etmektedir (Waters et al. 1996). Key vd. (1985), soya fasulyesinde 28-45°C arasındaki sıcaklıklarda yaptıkları YSSP analizinde, 40°C'de sentezlenen proteinlerin çoğunun YSSP'ler olduğunu ve 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda amino asitlerin proteinlere katılma oranında azalmanın olduğunu belirtmiştir. Bitkilerde ve diğer ökaryotlarda sentez edilen YSSP'ler; YSSP100 (MA, 100-114 kDa), YSSP90 (MA, 80-94 kDa), YSSP70 (MA, 63-78 kDa), YSSP60 (MA, 53-62 kDa) ve küçük veya düşük moleküler ağırlıklı YSSP'ler (MA, 15-30 kDa) olmak üzere beş büyük gruba ayrılmaktadır (Vierling 1991, Waters et al. 1996, Sun et al. 2002). Araştırmamızda, çeşitlerin ilk yaprak dokusunda yeni sentezlenen YSSP'lerin sadece düşük moleküler ağırlıklı YSSP'ler (kYSSP, küçük YSSP) olması oldukça ilginçtir. Keza, Knight ve Ackerly (2003), bitkilerde kYSSP'lerin artışının ilginç olduğunu bildirmiştir. Yüksek sıcaklık stresi sırasında ve sonrasında protein sentezinin büyük kısmını ve bazı koşullarda ise toplam yaprak proteininin %1'inden fazlasını kYSSP'lerin oluşturduğu bildirilmiştir (Vierling 1991, Hsieh et al. 1992, Howarth and Ougham 1993, O'Connell 1994). Araştırmamızda, yeni sentezlenen kYSSP'lerin çoğu hem 37°C hem de 37→50°C uygulamasında belirlenmiş olması, bu proteinlerin yüksek sıcaklık şokunda termal kararlı olabileceğini gösterebilir. Keza, bazı çalışmalarda kYSSP'lerin son derece termal kararlı olduğu bildirilmiştir (Thompson and Eisenberg 1999, Chakravarty and Varadarajan 2000).

Bu araştırmada, kontrole göre yüksek sıcaklık uygulamalarında ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin ilk yaprak dokularında kYSSP'lerin sentezinde genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Kontrole göre her iki yüksek sıcaklık veya yalnızca 37→50°C uygulamasında ekmeklik buğday eşitleri Gönen-98'de 16 kYSSP ve Cumhuriyet-75'de 11 kYSSP ile makarnalık buğday eşitleri Ege-88'de 14 kYSSP ve Ankara-98'de 8 kYSSP'nin sentezlendiği saptanmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamalarında sentezi belirlenen bazı kYSSP'lerin genotipe özgü olduğu saptanmıştır. Termal toleranslı ekmeklik Gönen-98 buğday çeşitinde 4 kYSSP (19.0 kDa, pI 7.7; 19.3 kDa, pI 7.5; 21.5 kDa, pI 5.4; 23.6 kDa, pI 7.3) ve makarnalık Ege-88 buğday çeşitinde 1 kYSSP (19.6 kDa, pI 6.6)'nin genotipe özgü olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, termal duyarlı çeşitlerde genotipe özgü olarak ekmeklik Cumhuriyet-75 buğday çeşitinde 1 kYSSP'nin (17.7 kDa, pI 7.1) her iki yüksek sıcaklık uygulamasında sentezi belirlenirken, makarnalık Ankara-98 buğday çeşitinde 1 kYSSP (24.0 kDa, pI 6.4)'nin sentezi yalnızca 37→50°C uygulamasında belirlenmiştir. Her iki yüksek sıcaklık uygulamasında sentezlenen 2 kYSSP (18.5 kDa, pI 6.2 ve 18.9 kDa, pI 6.3)'nin tüm çeşitlerde mevcut olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, 2 kYSSP (18.3 kDa, pI 6.3 ve 22.0 kDa, pI 6.3)'nin sentezi Cumhuriyet-75 çeşitinin yalnızca 37→50°C uygulaması hariç diğer tüm uygulamalarda tüm çeşitlerde belirlenmiştir. Bununla birlikte, 22.9 kDa (pI 6.0) kYSSP diğer çeşitlere göre Gönen-98'de, 19.3 kDa (pI 6.4) kYSSP diğer çeşitlere göre Cumhuriyet-75'de ve 3 kYSSP (18.8 kDa, pI 6.9; 19.2 kDa, pI 7.1 ve 19.3 kDa, pI 6.2)'nin ise diğer çeşitlere göre Ankara-98'de sentezlenmediği saptanmıştır. Diğer çeşitlere göre termal toleranslı Gönen-98 ve Ege-88 eşitlerinde belirlenen 2 kYSSP (18.3 kDa, pI 7.2 ve 21.2 kDa, pI 7.8)'den biri (21.2 kDa) Ege-88 çeşitinin yalnızca 37→50°C uygulamasında belirlenmemiştir. Diğer taraftan, kontrole göre yüksek sıcaklık uygulamalarında 2 proteinin (16.1 kDa'da iki protein, pI 6.3 ve 6.6) sentezi tüm buğday çeşitlerinde, 1 proteinin (23.0 kDa, pI 6.4) sentezi ise termal duyarlı Ankara-98 hariç diğer çeşitlerde belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Buna ilaveten, 23.0 kDa molekül ağırlığındaki bu proteinin Ankara-98 çeşitinde kontrole göre 37°C uygulamasında belirgin bir şekilde azalma göstermediği, buna karşın 37→50°C uygulamasında kaybolduğu belirlenmiştir. Kontrole göre her iki yüksek sıcaklık uygulamasında

yalnızca termal toleranslı ekmeklik Gönen-98 buğday çeşidinde 23.6 kDa (pI 6.7) molekül ağırlığındaki bir proteinin sentezi çok belirgin bir şekilde artmıştır. Araştırmamızda, farklı sentez durumlarında belirlenen ve özellikle kYSSP'lerin, incelenen ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin yüksek sıcaklığa farklı seviyelerdeki termal toleranslarında önemli rol oynadığı ileri sürülebilir. kYSSP'lerin ekspresyonu hem termal stres zararının bir belirtisi hem de potansiyel koruyucu mekanizmanın bir göstergesi olarak ifade edilmektedir (Knight and Ackerly 2003). Membran akışkanlığındaki artış kadar hücrede denatüre olmuş proteinlerin miktarındaki artış (Vigh et al. 1998), kYSSP ekspresyonundaki artışın ilk sinyalleri olarak düşünülmektedir (Knight and Ackerly 2003). kYSSP'lerin genellikle denatüre olmuş proteinlere bağlanarak ve hidrofobik domainleri kararlı hale getirerek denatüre proteinlerin geri dönüşsüz kümeleşmelerini engellediği ve yüksek sıcaklık veya diğer stres koşulları sonrasında proteinlerin yeniden katlanmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Jakob et al. 1993, Jinn et al. 1995, Lee et al. 1997, Laksanalami et al. 2001). Protein kümelenmesinin engellenmesinin yanı sıra kYSSP'lerin membranları kararlı hale getirdiği ve muhtemelen bölgeye-spesifik antioksidantlar olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Harndahl et al. 1999, Lee et al. 2000, Gustavsson et al. 2001, Török et al. 2001).

Yapılan bazı çalışmalarda, yüksek sıcaklık uygulamalarında çok düşük oranlarda (%7 ve %20) klorofil biriktiren ve termal duyarlı olarak belirtilen ditelosomik buğday hattı (DT7DS) ve *Arabidopsis* mutantı (AtTS02) ile bunların kontrol bitkileri yüksek sıcaklık uygulamalarına maruz bırakıldığında YSSP'ler mukayese edilmiştir (Burke et al. 2000, O'Mahony et al. 2001). Kontrol bitkilerine göre ditelosomik buğday hattında 2 YSSP (31 ve 32 kDa) ve *Arabidopsis* mutantında ise 1 YSSP (27 kDa)'nin sentezlenmediği belirlenmiştir. Araştırmacılar, klorofil birikimindeki azalmaya bağlı olarak belirledikleri termal toleranstaki azalmanın bu YSSP'lerin sentezlenmemesinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüştür. Diğer taraftan, yüksek sıcaklık şokuna maruz kalmadan önce uygulanan 40°C uyum sıcaklığının soya fasulyesi fidelerinde klorofil birikimi için koruma sağladığı (Burke 1998) ve bu termal korumanın Key vd. (1985) tarafından bildirilen yüksek

sıcaklık cevabı (YSSP'ler) ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Burke 1998). Bu bağlamda, çalışmamızda buğday çeşidine bağlı olarak 37°C uyum sıcaklığında sentezlenen farklı YSSP'lerin muhtemelen yüksek sıcaklık şoku uygulamasında farklı seviyede termal tolerans sağladığı ve bu tolerans seviyesinin klorofil birikiminde farklılıklara neden olabileceği ileri sürülebilir.

Doğal koşullar altında strese adaptasyon bazı ekolojik avantajlara sahip olmasına rağmen, üründe kayıplar nedeniyle tarımsal açıdan bazı sınırlamalar getirmektedir. Bu nedenle, tarımsal bitkilerde abiyotik stres toleransının geliştirilmesi geleneksel ve moleküler ıslah çalışmalarının birleştirilmesi ile gerçekleştirilebilir (Kasuga et al. 1999, Dunwell 2000, Wang et al. 2001a). Bu bağlamda, bitkilerin yüksek sıcaklık stresi gibi abiyotik streslere karşı toleranslarının belirlenmesinde kullanılan kapsamlı ıslah stratejileri için bazı kriterler şu şekilde sıralanmıştır (Wang et al. 2003):

- (i) Özellikle genotiplerin yabani yakın akraba türlerinin geleneksel ıslahı ve germplazm seleksiyonu,
- (ii) Toleranslı ve duyarlı genotiplerde spesifik moleküler kontrol mekanizmalarının açıklanması,
- (iii) Fonksiyonel genomik analizleri aracılığıyla seleksiyon ve ıslah yöntemlerinin biyoteknolojik temelde geliştirilmesi, doğal ve ıslah edilmiş populasyonlar arasında seleksiyon için moleküler problemler ve markörlerin kullanımı ve spesifik genlerin transformasyonu,
- (iv) Mevcut tarımsal uygulamaların geliştirilmesi ve adaptasyonunu kapsamaktadır.

Sonuç olarak, dünyada çok fazla ekim alanına sahip ve çok farklı çevresel koşullara adapte olmuş buğday genotiplerinin yüksek sıcaklık toleranslarının belirlenmesi ve geliştirilmesi önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abernethy, R.H., Thiel, D.S., Peterson, N.S. and Helm, K., 1989, "Thermotolerance is developmentally dependent in germinating wheat seed", *Plant Physiol.*, Vol.89, pp.569-576.
- Adam, Z. and Clarke, A.K., 2002, "Cutting edge of chloroplast proteolysis", *Trends Plant Sci.*, Vol.7, pp.451-456
- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D.R. and Grover, A., 2001, "Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: Kith and kin", *Cell Stress Chaperones*, Vol.6, pp.219-224.
- Akkaya, A., 1994, "Buğday Yetiştiriciliği", Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Genel Yayın No: 1, Ziraat Fak. Genel Yayın No:1, Ders Kitapları Yayın No:1, s. 225.
- Al-Khatib, K. and Paulsen, G.M., 1989, "Enhancement of thermal injury to photosynthesis in wheat plants and thylakoids by high light intensity", *Plant Physiol.*, Vol.90, pp.1041-1048.
- Al-Khatib, K. and Paulsen, G.M., 1990, "Photosynthesis and productivity during high temperature stress of wheat cultivars from major world regions", *Crop Sci.*, Vol.30, pp.1127-1132.
- Anonim, 2004, Tarımsal Yapı ve Üretim, DİE, Ankara.
- Armond, P.A., Björkman, O. and Staehelin, L.A., 1980, "Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes- a manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus", *Biochim Biophys Acta*, Vol.601, pp.433-442.
- Azhar, M.T., Khan, A.A. and Khan, I.A., 2005, "Combining ability analysis of heat tolerance in *Gossypium hirsutum* L.", *Czech J. Genet. Plant Breed.*, Vol.41, pp.23-28.
- Batts, G.R., Ellis, R.H., Morison, J.I.L., Nkemka, P.N., Gregory, P.J. and Hadley, P., 1998, "Yield and partitioning in crops of contrasting cultivars of winter wheat in response to CO₂ and temperature in field studies using temperature gradient tunnels", *J. Agric. Sci., Cambridge*, Vol.130, pp.17-27.
- Bauer, H. and Senser, M., 1979, "Photosynthesis of ivy (*Hedera helix* L.) after heat stress. II. Activity of ribulose biphosphate carboxylase, Hill reaction, and chloroplast ultrastructure", *Z. Pflanzenphysiol.*, Vol.91, pp.359-369.
- Behl, R.K., Heise, K.P. and Moawad, A.M., 1996, "High temperature tolerance in relation to changes in lipids in mutant wheat", *Tropenlandwirt*, Vol.97, pp.131-135.

- Bernacchi, C.J., Portis, A.R., Nakano, H., von Caemmerer, S. and Long, S.P., 2002, "Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo", *Plant Physiology*, Vol.130, pp.1992-1998.
- Berry, J. and Björkman, O., 1980, "Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Vol.31, pp.491-543.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J., 1987, "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis*, Vol.8, pp.93-99.
- Blum, A., 1988, "Plant Breeding for Stress Environments", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp.223.
- Blum, A., Klueva, N. and Nguyen, H.T., 2001, "Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress". *Euphytica*, Vol.117, pp.117-123.
- Blumwald, E., 2000, "Sodium transport and salt tolerance in plants", *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol.12, pp.431-434.
- Bohnert, H.J. and Sheveleva, E., 1998, "Plant stress adaptations-making metabolism move", *Curr. Opin. Plant Biol.*, Vol.1, pp.267-274.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V. and Vierling, E., 1996, "Molecular chaperones and protein folding in plants", *Plant Mol. Biol.*, Vol.32, pp.191-222.
- Bradford, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, Vol.72, pp.248-254.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E., 2000, "Responses to Abiotic Stresses", In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, (eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: ASPB, pp.1158-1203.
- Buchner, J., Grallet, H. and Jakob, U., 1998, "Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein", *Meth. Enzymol.*, Vol.290, pp.323-338.
- Burke, J.J., Ditto, C.L. and Arntzen, C.J., 1978, "Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts", *J. Arch. Biochem. Biophys.*, Vol.187, pp.252-263.
- Burke, J.J., Mohan, J.R. and Hartfield, J.L., 1988, "Crop-specific thermal kinetic windows in relation to wheat and cotton biomass production", *Agron. J.*, Vol.80, pp.553-556.

- Burke, J.J., 1990, "High temperature stress and adaptation in crops", In: R.G. Alscher and J.R. Cummings (eds.), *Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Wiley-Liss, New York, pp.295-309.
- Burke, J.J., 1994, "Integration of acquired thermotolerance within the developmental program of seed reserve mobilization", In: Cherry, J.H., (ed), *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*, Springer-Verlag, Berlin, pp.191-200.
- Burke, J.J., 1998, "Characterization of acquired thermo-tolerance in soybean seedlings", *Plant Physiol. Biochem.*, Vol.36, pp.601-607.
- Burke, J.J., O'Mahony, P.J. and Oliver, M.J., 2000, "Isolation of *Arabidopsis* mutants lacking components of acquired thermotolerance", *Plant Physiol.*, Vol.123, pp.575-587.
- Burke, J.J., 2001, "Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance", *Physiologia Plantarum*, Vol.112, pp.167-170.
- Burke, J.J. and O'Mahony, P.J., 2001, "Protective role in acquired thermotolerance of developmentally regulated heat shock proteins in cotton", *Journal of Cotton Science*, Vol.5, pp.173-184.
- Busch, W., Wunderlich, M. and Schöffl, F., 2005, "Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*", *Plant J.*, Vol.41, pp.1-14.
- Camejo, D., Rodriguez, P., Morales, M.A., Dell'Amico, J.M., Torrecillas, A. and Alarcon, J.J., 2005, "High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility", *J. Plant Physiol.*, Vol.162, pp.281-289.
- Cao, J. and Govindjee, 1990, "Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1015, pp.180-188.
- Chakravarty, S. Varadarajan, R., 2000, "Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis", *FEBS Letter*, Vol.470, pp.65-69.
- Chen, H.H., Shen, Z.Y. and Li, P.H., 1982, "Adaptability of crop plants to high temperature stress", *Crop Sci.*, Vol.22, pp.719-725.
- Chou, M., Chen, Y.M. and Lin, C.Y., 1989, "Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins", *Plant Physiol.*, Vol.89, pp.617-21.
- Cushman, J.C. and Bohnert, H.J., 2000, "Genomic approaches to plant stress tolerance", *Curr. Opin. Plant Biol.*, Vol.3, pp.117-124.

- Copeland, R.A., 1993, "Methods for Protein Analysis, A Practical Guide to Laboratory Protocols, Chapman and Hall, New York, pp.228.
- Cornish, K., Radin, J.W., Turcotte, E.L., Lu, Z. and Zeiger, E., 1991, "Enhanced photosynthesis and stomatal conductance of Pima cotton (*Gossypium barbadense* L.) bred for increased yield", *Plant Physiol.*, Vol.97, pp.484-489.
- Crafts-Brandner, S.J. and Law, R.D., 2000, "Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state", *Planta*, Vol.212, pp.67-74.
- Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E., 2000, "Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.97, pp.13430-13435.
- Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E., 2002, "Sensitivity of photosynthesis in a C₄ plant, maize, to heat stress", *Plant Physiol.*, Vol.129, pp.1773-1780.
- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H., 1986, "Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins", *Electrophoresis*, Vol.7, pp.52-54.
- Dash, S. and Mohanty, N., 2001, "Evaluation of assay for the analysis of thermo-tolerance and recovery potentials of seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars", *J. Plant Physiol.*, Vol.158, pp.1153-1165.
- DeRocher, A.E., Helm, K.W., Lauzon, L.M. and Vierling, E., 1991, "Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery", *Plant Physiol.*, Vol.96, pp.1038-1046.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Coffey, M.J. and Neill, S.J., 1996, "Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme", *FEBS Lett.*, Vol.382, pp.213-217.
- Diego, A.M., Oliva, M.A., Carlos, A.M. and Cambraia, J., 2003, "Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress", *Environ. Exp. Bot.*, Vol.49, pp.69-76.
- Diepenbrock, W., Muller-Rehbehn, A. and Sattelmacher, B., 1989, "FA composition of root membrane lipids from 2 potatoes (*S. tuberosum*, L) genotypes differing in heat tolerance as affected by supraoptimal root-zone temperature", *Agrochimica*, Vol.33, pp.478-486.
- Doubuzet, J., Sakuma, Y., Kasuga, M., Doubouzet, E., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2003, "*OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription factors that function in drought-, high

- salt- and cold-responsive gene expression”, *The Plant Journal*, Vol.33, pp.751-763.
- Drozdo, S.N., Titov, A.F., Balagurava, N.I. and Kritenko, S.P., 1984, “The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. II. Cold resistance Species”, *J. Exp. Bot.*, Vol.35, pp.1603-1608.
- Dubey, R.S., 1999, “Protein synthesis by plants under stressful conditions”, In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, Pessarakli, M., (Ed), Marcel Dekker Inc. New York, pp.365-397.
- Dunwell, J.M., 2000, “Transgenic approaches to crop improvement”, *J. Exp. Bot.*, Vol.51, pp.487-496.
- Ellis, R.J., 1987, “Proteins as molecular chaperones”, *Nature*, Vol.328, pp.378-379.
- Elstner, E.F., 1982, “Oxygen activation and oxygen toxicity”, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Vol.33, pp.73-96.
- Enami, I., Kitamura, M., Tomo, T., Isokawa, Y., Ohta, H. and Katch, S., 1994, “Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn?”, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1186, pp.52-58.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2003, *FAO Statistical Databases*, <http://apps.fao.org>.
- Feierabend, J., 1977, “Capacity for chlorophyll synthesis in heat-bleached 70S ribosome-deficient rye leaves”, *Planta* Vol.135, pp.83-88.
- Feldman, M. and Sears, E.R., 1981, “The wild gene resources of wheat”, *Scientific Am.*, Vol.244, pp.102-112.
- Feller, U., Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E., 1998, “Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Rubisco”, *Plant Physiol.*, Vol.116, pp.539-546.
- Fokar, M., Nguyen, H.T. and Blum, A., 1998, “Heat tolerance in spring wheat. I. Genetic variability and heritability of cellular thermotolerance”, *Euphytica*, Vol.104, pp.1-8.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. and Kumar, K.J., 1994, “Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants”, *Plant Cell Environ.*, Vol.17, pp.507-523.
- Francisco, J.P., Daniel, V. and Nilo, M., 2002, “Ascorbic acid and flavonoidperoxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves”, *Phytochemistry*, Vol.60, pp.573-580.

- Frydman, J., 2001, "Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones", *Annu. Rev. Biochem.*, Vol.70, pp.603-647.
- Glover, J.R. and Lindquist, S., 1998, "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins", *Cell*, Vol.94, pp.73-82.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P.B., Tomoyasu, T. and Bukau, B., 1999, "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.96, pp.13732-13737.
- Gounaris, K., Brain, A.R.R., Quinn, P.J. and Williams, W.P., 1984, "Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat stress", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.766, pp.198-208.
- Grover, A., Agarwal, M., Katiyar-Argarwal, S., Sahi, C. and Argarwal, S., 2000, "Production of high temperature tolerant transgenic plants through manipulation of membrane lipids", *Curr. Sci.*, Vol.79, pp.5.
- Gusta, L.V. and Chen. T.H.H., 1987, "The physiology of water and temperature stress" In: Heyne E.G., (ed.) *Wheat and wheat improvement* (2nd ed.). ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp.115-149.
- Gustavsson, N., Kokke, B.P., Anzelius, B., Boelens, W.C. and Sundby, C., 2001, "Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity", *Protein Sci.*, Vol.10, pp.1785-1793.
- Guy, C.L. and Li, Q.B., 1998, "The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family", *Plant Cell*, Vol.10, pp.539-556.
- Hamilton, E.W. III. and Heckathorn, S.A., 2001, "Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine", *Plant Physiol.*, Vol.126, pp.1266-1274.
- Harding, S.A., Guikema, J.A. and Paulsen, G.M., 1990, "Photosynthetic decline from high temperature stress during maturation of wheat. I. Interaction with senescence process", *Plant Physiol.*, Vol.92, pp.648-653.
- Harndahl, U., Hall, R.B., Osteryoung, K.W., Vierling, E., Bornman, J.F. and Sundby, C., 1999, "The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress", *Cell Stress Chaperones*, Vol.4, pp.129-138.
- Hartl, F.U., 1996, "Molecular chaperones in cellular protein folding", *Nature*, Vol.381, pp.571-580.

- Hatice, G. and Atilla, E., 2003, "Some physiological changes in strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') plants under heat stress", J. Hort. Sci. Biotech., Vol.78, pp.894-898.
- Havaux, M., 1993, "Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures", Plant Cell Environ., Vol.16, pp.461-467.
- Havaux, M., 1998, "Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts", Trends Plant Sci., Vol.3, pp.147-151.
- Havaux, M. and Tardy, F., 1996, "Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments", Planta, Vol.198, pp.324-333.
- Heckathorn, S.A., Downs, C.A., Sharkey, T.D. and Coleman, J.S., 1998, "The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress", Plant Physiol., Vol.116, pp.439-444.
- Heckathorn, S.A., Downs, C.A. and Coleman, J.S., 1999, "Small heat shock proteins protect electron transport in chloroplasts and mitochondria during stress", American Zoologist, Vol.39, pp.865-876.
- Hochstrasser, D.F., Harrington, M.G., Hochstrasser, A-C., Miller, M.J. and Merrill, C.R., 1988, "Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis", Analytical Biochemistry, Vol.173, pp.424-435.
- Hodgins, R. and van Huystee, R.B., 1986, "Porphyrin metabolism in chill stressed maize (*Zea mays* L.)", Journal Plant Physiology, Vol.126, pp.257-268.
- Hong, S-W., Lee, U. and Vierling, E., 2003, "Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures", Plant Physiol., Vol.132, pp.757-767.
- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Torok, Z., Pali, T., Balogh, G., Kovacs, E., Nadasdi, L., Benko, S. and Joo, F., 1998, "Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a fluidity gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.95, pp.3513-3518.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., Linden, P.J. and Xiaosu, D., (Eds.), 2001, "Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)", Cambridge University Press, UK, 944 pp.
- Howarth, C.J. and Ougham, H.J., 1993, "Tansley review 51: gene expression under temperature stress", New Phytol., Vol.125, pp.1-26.

- Hsieh, M.H., Chen, J.T., Jinn, T.L., Chen, Y.M. and Lin, C.Y., 1992, "A class of soybean low molecular weight heat shock proteins: immunological study and quantitation", *Plant Physiol.*, Vol.99, pp.1279-1284.
- Huang, B., Liu, X. and Fry, J.D., 1998, "Shoot physiological responses of two bentgrass cultivars to high temperature and poor soil aeration", *Crop Sci.*, Vol.38, pp.1219-1225.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K., 1987, "The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots", *Plant Physiol.*, Vol.83, pp.517-524.
- Ibrahim, A.M.H. and Quick, J.S., 2001a, "Heritability of heat tolerance in winter and spring wheat". *Crop Sci.*, Vol.41, pp.1401-1405.
- Ibrahim, A.M.H. and Quick, J.S., 2001b, "Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured membrane thermal stability", *Crop Sci.* Vol.41, pp.1405-1407.
- Ishag, H.M. and Mohamed, A.B., 1996, "Phasic development of spring wheat and stability of yield and its components in hot environments", *Field Crop Research*, Vol.46, pp.169-176.
- Ismail, A.M. and Hall, A.E., 1999, "Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea". *Crop Sci.*, Vol.39, pp.1762-1768.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. and Buchner, J., 1993, "Small heat shock proteins are molecular chaperones", *J. Biol. Chem.*, Vol.268, pp.1517-1520.
- Jinn, T.M., Chen, Y.M. and Linn, C.Y., 1995, "Characterization and physiological function of class I-low molecular-mass-heat-shock protein complex in soybean", *Plant Physiol.*, Vol.108, pp.693-701.
- Jones, R.A. and Qualset, C.O., 1984, "Breeding crops for environmental stress tolerance". In: Collins, G.B. and Petolino, J.G., (eds.), *Application of genetic engineering to crop improvement*, Dordrecht, Netherlands, Nijhoff/Junk, pp.305-340.
- Karim, M.A., Fracheboud, Y. and Stamp, P., 1999, "Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves", *Physiol. Plant.*, Vol.105, pp.685-693.
- Kacperska, A., 2004, "Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity?", *Physiol. Plant.*, Vol.122, pp.159-168.
- Kasuga, M., Liu, Q., Setsuko, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 1999, "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor", *Nat. Biotechnol.*, Vol.17, pp.287-291.

- Keeler, S.J., Boettger, C.M., Haynes, J.G., Kuches, K.A., Johnson, M.M., Thureen, D.L., Keler jr., C.L. and Kito, S.L., 2000, "Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of bean Lima Bean", *Plant Physiol.*, Vol.123, pp.1121-1132.
- Key, J.L., Kimpel, J., Vierling, E., Lin, C.-Y., Nagao, R.T., Czarnecka, E. and Schöffl, F., 1985, "Physiological and Molecular Analysis of The Heat Shock Response in Plants", In: *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress*, Atkinson, B.G. and Walden D.B., (Eds.), Academic Press, New York, pp.327-348.
- Kim, B.H. and Schoffl, F., 2002, "Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins", *J. Exp. Bot.*, Vol.53, pp.371-375.
- Kimber, G. and Sears, E.R., 1987, "Evolution in The Genus *Triticum* and The Origin of Cultivated Wheat", In: Heyne, E.G. (ed.), *Wheat and wheat improvement*, ed. 2. Madison, pp.154-164.
- Klueva, N.Y., Maestri, E., Marmioli, N. and Nguyen, H.T., 2001, "Mechanisms of Thermotolerance in Crops". In: A.S. Basra (Ed.) *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, Food Products Press, Binghamton, NY, pp.177-217.
- Knight, H. and Knight, M.R., 2001, "Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk", *Trends Plant Sci.*, Vol.6, pp.262-267.
- Knight, C.A. and Ackerly, D.D., 2003, "Small heat shock protein responses of a closely related pair of desert and coastal *Encelia*", *Int. J. Plant Sci.*, Vol.164, pp.53-60.
- Krishna, P. and Gloor, G., 2001, "The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*", *Cell Stress Chaperones*, Vol.6, pp.238-246.
- Krishnan, M. and Nguyen, H.T., 1990, "Drying acrylamide slab gels for fluorography without using gel drier and vacuum pump", *Analytical Biochemistry*, Vol.187, pp.51-53.
- Krishnan, M., Nguyen, H.T. and Burke, J.J., 1989, "Heat shock protein synthesis and thermotolerance in wheat", *Plant Physiol.*, Vol.90, pp.140-145.
- Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C., 1989a, "Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation", *Plant Physiol.*, Vol.91, pp.401-408.
- Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C., 1989b, "A mutant of *Arabidopsis* deficient in desaturation of palmitic acid in leaf lipids", *Plant Physiol.*, Vol.90, pp.943-947.

- Kün, E., 1988, "Serin İklim Tahılları", Ankara Üniv., Ziraat Fak. Yayınları: 1032, Ders Kitabı: 299, s.322.
- Laemmli, U.K., 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, Vol.227, pp.680-685.
- Laksanalamai, P., Maeder, D.L. and Robb, R.T., 2001, "Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*", J. Bacteriol., Vol.183, pp.5198-5202.
- Larkindale, J. and Huang, B., 2004, "Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*)", Environ. Exp. Bot., Vol.51, pp.57-67.
- Law, R.D. and Crafts-Brandner, S.J., 1999, "Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase", Plant Physiol., Vol.120, pp.173-181.
- Lee, Y.J., Nagao, R.T. and Key, J.L., 1994, "A soybean 101-kD heat stress protein complements yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance", Plant Cell, Vol.6, pp.1889-1897.
- Lee, J.H. and Schöffl, F., 1996, "An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*", Mol. Gen. Genet., Vol.252, pp.11-19.
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R. and Vierling, E., 1997, "A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state", EMBO, Vol.16, pp.659-671.
- Lee, G.J. and Vierling, E., 2000, "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein", Plant Physiol., Vol.122, pp.189-198.
- Levitt, J., 1980, "Responses of Plant to Environmental Stresses", Vol.II, Water Radiation, Salt and Other Stresses, Academic Press, Inc., 2nd. Edition, pp.607.
- Levy-Rimler, G., Bell, R.E., Ben-Tal, N. and Azem, A., 2001, "Type I chaperonins: not all are created equal", FEBS Lett., Vol.529, pp.1-5.
- Lin C-Y., Chen, Y-M. and Key, J.L., 1985, "Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes", Plant Cell Physiol., Vol.26, pp.1493-1498.

- Lin, B.L., Wang, J.S., Liu, H.C., Chen, R.W., Meyer, Y., Barakat, A. and Delseny, M., 2001, "Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*", Cell Stress Chaperones, Vol.6, pp.201-208.
- Lindquist, S. and Craig, E.A., 1988, "The heat shock proteins", Ann. Rev. Genet., Vol.22, pp.631-637.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. and Marmioli, N., 2001, "Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals", Plant Molecular Biology, Vol.48, pp.667-681.
- Mamedov, M., Hayashi, H. and Murata, N., 1993, "Effects of glycinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803", Biochim. Biophys. Acta, Vol.1142, pp.1-5.
- Marcum, K.B., 1998, "Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass", Crop Sci., Vol.38, pp.1214-1218.
- McCain, D.C., Croxdale, J. and Markley, J.L., 1989, "Thermal damage of chloroplasts envelope membranes", Plant Physiol., Vol.90, pp.606-609.
- McCourt, P., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C.R., 1987, "The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*", Plant Physiol., Vol.84, pp.353-360.
- Miernyk, J.A., 1997, "The 70kDa stress-related proteins as molecular chaperones", Trends Plant Sci., Vol.2, pp.180-187.
- Mishra, R.K. and Singhal, G.S., 1992, "Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids", Plant Physiol., Vol.98, pp.1-6.
- Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L. and 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 Dev., Vol.16, pp.1555-1567.
- Miyao-Tokutomi, M., Lee, B.H, Mizusawa, N. and Yamamoto, N., 1998, "Active Oxygen and Photoinhibition of Photosystem II", In: Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H. and Bukau, B., 1999, "Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB", EMBO J., Vol.18, pp.6934-6949.

- Morimoto, R.I., 1998, "Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators", *Genes Dev.*, Vol.12, pp.3788-3796.
- Mullarkey, M. and Jones, P., 2000, "Isolation and analysis of thermotolerant mutants of wheat", *J. Exp. Bot.*, Vol.51, pp.139-146.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. and Iba, K., 2000, "Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature", *Science*, Vol.287, pp.476-479.
- Nachlas, M., Marquillies, S., Goldberg, J. and Seligman, A., 1960, "The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt", *Anal. Biochem.*, Vol.1, pp.317.
- Naqvi, S.M.S., Ozalp, V.C., Oktem, H.A. and Yucel, M., 1994, "Two-dimensional electrophoresis of proteins with a different approach to isoelectric focusing", *Analyst*, Vol.119, pp.1341-1344.
- Nash, D., Miyao, M. and Murata, N., 1985, "Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II from spinach chloroplasts", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.807, pp.127-133.
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T., 2002, "Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants", *J. Exp. Bot.*, Vol.53, pp.1237-1247.
- Nguyen, V.T, Morange, M. and Bensaude, O., 1989, "Protein denaturation during heat shock and related stress", *J. Biol. Chem.*, Vol.264, pp.10487-10492.
- Nguyen.,H.T. and Joshi, P.C., 1992, "Molecular Strategies for The Genetic Dissection of Water and High-Temperature Stress Adaptation in Cereal Crops", In: *Proceedings of an international symposium on the adaptation of food crops to temperature and water stress*, 13-18 August, Taiwan, pp.1-19.
- O'Connell, M.A., 1994, "Heat shock proteins and thermotolerance", In: Basra, A.S., (ed.), *Stress-induced gene expression in plants*, Harwood, Chur., pp.163-183.
- O'Farrell, P.H., 1975, "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", *The J. Biological Chemistry*, Vol.10, pp.4007-4021.
- O'Mahony, P, Burke, J.J. and Oliver, M.J., 2000, "Identification of acquired thermotolerance deficiency within ditelosomic series of 'Chinee Spring' wheat", *Plant Physiol. Biochem.*, Vol.38, pp.243-252.
- Ougham, H.J. and Stoddart, J.L., 1986, "Synthesis of heat-shock protein and acquisition of thermotolerance in high-temperature tolerant and high-temperature susceptible lines of *Sorghum bicolor*", *Plant Physiol.*, Vol.44, pp.163-168.

- Ouerghi, Z., Rémy, R., Ouelhazi, L., Ayadi, A. and Brulfert, J., 2000, "Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl", *Electrophoresis*, Vol.21, pp.2487-2491.
- Park, S.Y., Shivaji, R., Krans, J.V. and Luthe, D.S., 1996, "Heat shock response in heat tolerant and non-tolerant variants of *Agrostis palustris* Huds", *Plant Physiol.*, Vol.111, pp.515-524.
- Park, S.Y., Shivaji, R., Krans, J.V. and Luthe, D.S., 1997, "Recovery from heat shock in heat tolerant and nontolerant variants of creeping bentgrass", *Plant Physiol.*, Vol.115, pp. 229-240.
- Paulsen, G.M., 1994, "High Temperature Responses of Crop Plants", In: Boote et al. (eds.), *Physiology and determination of crop yield*, ASA, CSSA, and SSSA, Madison, pp.365-389.
- Pearcy, R.W., 1977, "Effects of growth temperature on the thermal stability of the photosynthetic apparatus of *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats", *Plant Physiol.*, Vol.59, pp.873-878.
- Porter, D.R., Nguyen, H.T. and Burke, J.J., 1994, "Quantifying acquired thermal tolerance in winter wheat", *Crop Sci.*, Vol.34, pp.1686-1689.
- Portis, A.R., 2003, "Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone", *Photosynth. Res.*, Vol.75, pp.11-27.
- Preczewski, P.J., Heckathorn, S.A., Downs, C.A. and Coleman, J.S., 2000, "Photosynthetic thermotolerance is quantitatively and positively correlated with production of specific heat-shock proteins among nine genotypes of *Lycopersicon* (tomato)", *Photosynthetica*, Vol.38, pp.127-134.
- Prandl, R., Hinderhofer, K., Eggers-Schumacher, G. and Schoffl, F., 1998, "HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, depresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants", *Mol. Gen. Genet.*, Vol.258, pp.269-278.
- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E. and Lindquist, S., 2000, "Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, Vol.12, pp.497-492.
- Rahman, H., Malik, S.A. and Saleem, M. 2004, "Heat tolerance of upland cotton during the fruiting stage evaluated using cellular membrane thermostability," *Field Crops Research*, Vol.85, pp.149-158.
- Raison J.K., Berry, J.A., Armond, P.A. and Pike, C.S., 1980, "Membrane Properties in Relation to The Adaptation of Plants to High and Low Temperature Stress", In: Turner, N.C. and Kramer, P.J., (eds.), *Adaptation of plants to water and high temperature stress*, Wiley, New York, New York, USA, pp.261-273.

- Ramagli, L.S. and Rodriguez, L.V., 1985, "Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer", *Electrophoresis*, Vol.6, pp.559-563.
- Ranson, N.A., White, H.E. and Saibil, H.R., 1998, "Chaperonins", *Biochem. J.*, Vol.333, pp.233-242.
- Reynolds, M.P., Singh, R.P., Ibrahim, A., Ageeb, O.A.A., Larqué-Saavedra, A. and Quick, J.S., 1998, "Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments", *Euphytica*, Vol.100, pp.84-95.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Devletova, S. and Mittler, R., 2004, "When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress", *Plant Physiol.*, Vol.134, pp.1683-1696.
- Saadalla, M.M., Shanahan, J.F. and Quick, J.S., 1990, "Heat tolerance in winter wheat: I. Hardening and genetic effects on membrane thermostability", *Crop Sci.*, Vol.30, pp.1243-1247.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002, "DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.290, pp.998-1009.
- Salvucci, M.E. and Crafts-Brandner, S.J., 2004, "Mechanism for deactivation of rubisco under moderate heat stress", *Physiol. Plant.*, Vol.122, pp.513-519.
- Sangwan, V., Örvár, B.L., Beyerly, J., Hirt, H. and Dhindsa, R.S., 2002, "Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways", *Plant J.*, Vol.31, pp.629-638.
- Sanmiya, K., Suzuki, K., Egawa, Y. and Shono, M., 2004, "Mitochondrial small heat shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants", *Federation of European Biochemical Societies*, Vol.557, pp.265-268.
- Santarius, K.S. and M. Muller, 1979, "Investigations on heat resistance on spinach leaves", *Planta*, Vol.146, pp.529-538.
- Santarius, K.A., Exner, M. and Thebud-Lassak, R., 1991, "Effects of high temperature on the photosynthetic apparatus in isolated mesophyll protoplasts of *Valerianella locusta* (L.) Bectke", *Photosynthetica*, Vol.25, pp.17-26.
- Sasaki, H. and Ishii, R., 1992, "Cultivar differences in leaf photosynthesis of rice bred in Japan", *Photosynthesis Res.*, Vol.32, pp.139-146

- Schirmer, E.C., Lindquist, S. and Vierling, E., 1994, "An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast", *Plant Cell*, Vol.6, pp.1899-1909.
- Schlesinger, M.J., Ashburner, M. and Tissières, A. 1982, "Heat shock, from bacteria to man", Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schöffl, F., Prändl, R. and Reindl, A., 1998, "Regulation of the heat-shock response", *Plant Physiol.*, Vol.117, pp.1135-1141.
- Schreiberg, U. and Berry, J.A., 1977, "Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus", *Planta*, Vol.136, pp.233-238.
- Setimela, P.S., Andrews, D.J., Partridge, J. and Eskridge, K.M., 2005, "Screening sorghum seedlings for heat tolerance using a laboratory method", *Europ. J. Agronomy*, Vol.23, pp.103-107.
- Shanahan, J.F., Edwards, I.B., Quick, J.S. and Fenwick, J.R., 1990, "Membrane Thermostability and Heat Tolerance of Spring Wheat". *Crop Sci.*, Vol.30, pp.247-251.
- Sharkey, T.D., Badger, M.R, von Caemmerer, S. and Andrews, T.J., 2001, "Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase", *Photosynth. Res.*, Vol.67, pp.147-156.
- Shewfelt, R.L. and Purvis, A.C., 1995, "Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders", *HortScience*, Vol.30, pp.213-218.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000, "Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways", *Curr. Opin. Plant Biol.*, Vol.3, pp.217-23.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Seki, M., 2003, "Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses", *Current Opinion in Plant Biology*, Vol.6, pp.410-417.
- Simões-Araújo, L.J., Rumjanek, N.G. and Margis-Pinheiro, M., 2003, "Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean", *Braz. J. Plant Physiol.*, Vol.15, pp.33-41.
- Skylas, D.J., Cordwell, S.J., Hains, P.G., Larsen, M.R., Basseal, D.J., Walsh, B.J., Blumenthal, C.S., Rathmell, W., Copeland, L. and Wrigley, C.W., 2002, "Heat Shock of Wheat During Grain Filling: Proteins Associated with Heat-tolerance", *Journal of Cereal Science*, Vol.35, pp.175-188.
- Smirnoff, N., 1998, "Plant resistance to environmental stress", *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol.9, pp.214-219.
- Smith, F.E., 1951, "Tetrazolium salt", *Science*, Vol.113, pp.751-754.

- Steponkus, P.L., and Lanphear, F.O., 1967, "Refinement of the triphenyltetrazolium chloride method of determining cold injury", *Plant Physiol.*, Vol.42, pp.1423-1426.
- Stidham, M.A., Uribe, E.G. and Williams, G.J., 1982, "Temperature dependence of photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb. II. Contribution from electron transport and photophosphorylation", *Plant Physiol*, Vol.69, pp.929-934.
- Stone, P.J. and Nicolas, M.E., 1994, "Wheat cultivars vary widely in their responses of grain yield and quality to short periods of post-anthesis heat stress", *Aust. J. Plant Physiol.*, Vol.21, pp.887-900.
- Stone, P., 2001, "The effects of heat stress on cereal yield and quality". In: Basra, A.S., (ed.), *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, Food Products Press, Binghamton, NY, pp. 243-291.
- Sullivan, C.Y., 1972, "Mechanisms of heat and drought resistance in grain sorghum and methods of measurement", In: Rao, N.G.P. and House, L.R. (ed.), *Sorghum in the seventies*, Oxford and IPH publishing Co., New Delhi, India.
- Sun, W., Bernard, C., van de Cotte, B., van Montagu, M. And Verbruggen, N., 2001, "At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression", *Plant J.*, Vol.27, pp.407-415.
- Sun, W., Motangu, M.V. and Verbruggen, N., 2002, "Small heat shock proteins and stress tolerance in plants", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1577, pp.1-9.
- Sundby, C., Melis, A., Maenpaa, P. and Andersson, B., 1986, "Temperature dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II alpha to photosystem II beta", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.851, pp.475-483.
- Sung, D-Y., Kaplan, F., Lee, K-J. and Guy, C.L., 2003, "Acquired tolerance to temperature extremes", *Trends Plant Sci.*, Vol.8, pp.179-187.
- Suss, K.H. and Yordanov, I.T, 1986, "Biosynthetic causes of in vivo acquired thermotolerance of photosynthetic light reactions and metabolic responses of chloroplast to heat stress", *Plant Physiol.*, Vol.81, pp.192-199.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2002, "Stress Physiology", Chapter 25 of *Plant Physiology*, pp.602-611.
- Tewari, A.K. and Tripathy, B.C., 1998, "Temperature stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat", *Plant Physiol.*, Vol.117, pp.851-858.
- Thomashow, M.F., 1999, "Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms", *Annu. Rev. Plant. Biol.*, Vol.50, pp.571-599.

- Thompson, M.J. and Eisenberg, D., 1999, "Transproteomic evidence of a loopdeletion mechanism for enhancing protein thermostability", *J. Mol. Biol.*, Vol.290, pp.595-604.
- Thomson, L.K., Blaylock, R., Sturtevant, J.M. and Brudvig, G.W., 1989, "Molecular basis of heat denaturation of photosystem II", *Biochemistry*, Vol.28, pp.6686-6696.
- Török, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N.M., Glatz, A., Balogh, G., and Varvasovszki, V., 2001, "*Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.98, pp.3098-3103.
- Towill, L.E. and Mazur, P., 1975, "Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures". *Can. J. Bot.*, Vol.53, pp.1097-1102.
- Uno, Y., Furuhashi, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000, "Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.97, pp.11632-11637.
- Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.A. and Vasil, I.K., 1991, "Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus", *Bio. Technology*, Vol.10, pp.667-675.
- van Hasselt, P.R. and Strikwerda, J.T., 1976, "Pigment degradation in discs of the thermophilic *Cucumis sativus* as affected by light, temperature, sugar application and inhibitors", *Plant Physiol.*, Vol.37, pp.253-257.
- Vierling, E., 1991, "The roles of heat shock proteins in plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol.42, pp.579-620.
- Vierling, E. and Kimpel, J.A., 1992, "Plant responses to environmental stress", *Curr. Opin. Biotech.*, Vol.3, pp.164-170.
- Vigh, L., Los, D.A., Horváth, I. and Murata, N., 1993, "The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.90, pp.9090-9094.
- Vigh, L., Maresca, B. and Harwood, J.L., 1998, "Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?", *Trends Biochem. Sci.*, Vol.23, pp.369-374.

- Wang, W.X, Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A., 2001, "Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations", *Acta Hort.*, Vol.560, pp.285-292.
- Wang, W-X., Pelah, D., Alergand, T., Shoseyov, O. and Altman, A., 2002, "Characterization of SP1, a stress-responsive, boiling-soluble, homo-oligomeric protein from Apsen", *Plant Physiol.*, Vol.130, pp.865-875.
- Wang, W.X, Vinocur, B. and Altman, A., 2003, "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance", *Planta*, Vol.218, pp.1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, B. and Altman, A., 2004, "Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response", *Trends Plant Sci.*, Vol.9, pp.244-252.
- Waters, E.R., Lee, G.J. and Vierling, E., 1996, "Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants", *J. Exp. Bot.*, Vol.47, pp.325-338.
- Wellburn, A.R., 1994, "The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution", *J. Plant Physiol.*, Vol.144, pp.307-313.
- Wells, R., Schulze, L.L., Ashley, D.A., Boerma, H.R. and Brown, R.H., 1982, "Cultivar differences in canopy apparent photosynthesis and their relationship to seed yield in soybeans", *Crop Sci.*, Vol.22, pp.886-890.
- Whitaker, B.D., Klein, J.D., Conway, W.S. and Sams, C.E., 1997, "Influence of pre-storage heat and calcium pre-treatments on lipid metabolism in Golden Delicious apples", *Phytochemistry*, Vol.45, pp.465-472.
- Weigel, H.J., 1983, "The effect of high temperatures on leaf cells of *Valerianella*: Relative heat stability of the tonoplast membrane of mesophyll vacuoles", *Planta*, Vol.159, pp.398-403.
- Xu, Q., Chitnis, V.P., Ke, A. and Chitnis, P.R., 1995, "Structural organization of photosystem I", In: P. Mathis (ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.87-90.
- Yamada, M., Hidaka, T. and Fukamachi, H., 1996, "Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence", *Sci. Hortic.*, Vol.67, pp.39-48.
- Yang, J.F., Cheng, B.S. and Wang, H.C., 1984, "Influence of high temperature and low humidity on the fatty acid composition of membrane lipids in wheat", *Acta Bot. Sin.*, Vol.26, pp.386-391.
- Yeh, D.M. and Hsu, P.Y., 2004, "Heat tolerance in English ivy as measured by an electrolyte leakage technique", *J. Hort. Sci. Biotech.*, Vol.79, pp.298-302.

- Yildiz, M. and Terzioglu, S., 2006a, "Heat shock of cultivated and wild wheat during early seedling stage: growth, cell viability and heat shock proteins", *Acta Biologica Hungarica*, Vol.57, pp.231-246.
- Yildiz, M. and Terzioglu, S., 2006b, "Synthesis of soluble heat shock proteins in seminal root tissues of cultivated and wild wheat genotypes", *Acta Biologica Hungarica*, Vol.57, pp.81-95.
- Yildiz, M., 2007, "Two-dimensional electrophoretic analysis of soluble leaf proteins of a salt sensitive (*Triticum aestivum*) and a salt tolerant (*Triticum durum*) cultivar in response to NaCl stress", *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol.49, In Press.
- Young, J.C., Moarefi, I. and Hartl, F.U., 2001, "Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool", *J. Cell Biol.*, Vol.154, pp.267-273.
- Zadoks, J. C., Chang, T.T. and Konzak, C.F., 1974, "A decimal code for the grown stages of cereals", *Weed Research*, Vol.14, pp.415-421.
- Zhang, Z., Quick, M.K., Kanelakis, K.C., Gijzen, M. and Krishna, P., 2003, "Characterization of a plant homolog of Hop, a co-chaperone of Hsp90", *Plant Physiol.*, Vol.131, pp.525-535.
- Zhang, Y., Rouf Mian, M.A., Chekhovskiy, K., So, S., Kupfer, D., Lai, H. and Roe, B.A., 2005, "Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions", *J. Exp. Bot.*, Vol.56, pp.897-907.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A., 1997, "Molecular aspects of osmotic stress in plants", *Crit. Rev. Plant Sci.*, Vol.16, pp.253-277.
- Zhu, J.K., 2001, "Plant salt tolerance", *Trends Plant Sci.*, Vol.6, pp.66-71.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolayı tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a, her türlü konudaki desteği ile dekanımız Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK'a, araştırma ve yazım süresince yardımlarımı esirgemeyen çok değerli arkadaşım Sayın Evrim Suna ARIKAN'a, istatistiksel değerlendirme yöntemlerinin belirlenmesinde yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Yüksel TERZİ'ye, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hakan TERZİ

Doğum Yeri : ORDU

Doğum Tarihi : 27.07.1981

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Bursa Anadolu Lisesi

Lisans : 1999-2003 Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (2005 Mart ÜDS: 61.25)

Yayımlar : Yayımlanmış uluslararası ve ulusal birer makalesi, çeşitli
ulusal kongrelerde sunulmuş 4 adet poster bildirisi
bulunmaktadır.

EKLER

EK-1
SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZ ÇÖZELTİLERİ VE
HAZIRLANMASI

1) Akrilamid/Bis Stok Çözeltisi (%30 T, %2.67 C)

Akrilamid	146 g
N,N'-metilen-bis-akrilamid	4g

Distile su ile 500 mL'ye tamamlanır. Filtre edilir ve renkli şişede +4°C'de saklanır. Bu koşullarda 30 gün içinde kullanılmalıdır.

2) Ayırıştırma Jel Stok Tamponu (1.5M Tris-HCl, pH:8.8)

Trizma base	54.45 g
Distile su	150.00 g

HCl ile pH:6.8 ayarlanır. Distile su ile 300 mL'ye tamamlanır. Renkli şişede +4°C'de saklanır.

3) SDS Stok Çözeltisi (%10): 10 g SDS 60 mL distile suda çözülüp, 100 mL'ye tamamlanır.

4) %10 Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL distile suda çözülür.

5) 5x Elektrot (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin)

Trizma base	22.5 g
Glisin	108.0 g

Distile su ile 3 litreye tamamlanır. +4°C'de saklanır. 5x stoktan 530 mL alınarak 2.12 L distile su ile seyreltme hazırlanırken 2.65 g SDS katılır. Seyreltik çözelti elektroforetik yürütme için kullanılır.

6) Ayırıştırma Jeli (%12) Hazırlanması (0.375 M Tris, pH:8.8)

Akrilamid/bis stok çözeltisi (%30 T, %2.67 C)	50 mL
Distile su	41.875 mL
Ayırıştırma jel stok tamponu (1.5M Tris-HCl, pH:8.8)	31.250 mL
SDS Stok Çözeltisi (%10)	1.250 mL
%10 APS*	0.625 µL
TEMED	62.5 µL

*APS çözeltisi her zaman taze olarak hazırlanmalıdır.

Hazırlanan çözelti hemen çalkalanmalı ve elektroforez camları arasına dökülmelidir.