

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***PAPAVER CİNSİ OXYTONA SEKSİYONUNA
AİT TÜRLERDE SICAKLIK STRESİNİN
ANTIOKSİDANT ENZİMLER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ***

Mesut KOYUNCU

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.03.00

Sunuş Tarihi : 19.02.2010

**Bornova-İZMİR
2010**

ÖZET

PAPAVER CİNSİ OXYTONA SEKSİYONUNA AİT TÜRLERDE SICAKLIK STRESİNİN ANTIOKSİDANT ENZİMLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

KOYUNCU, MESUT

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ

Şubat 2010, 54 sayfa

Bu çalışmada, *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonuna ait üç türün, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum*, üç aylık fidelerinde 10 dk ve 30 dk süreyle 40 °C sıcaklıkta ısı şoku uygulamasının, katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidant enzimlerin aktiviteleri ile sekonder metabolitlerden fenol grubu bileşiklerin anahtar enzimlerinden polifenol oksidaz (PFO) aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışılan üç türe ait 10 dk sıcaklık uygulamaları, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz enzimi aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde artırırken, 30 dk uygulaması kontrolden fazla olmakla birlikte 10 dk uygulamasından daha düşük düzeyde kalmıştır. 10 dk sıcaklık uygulaması *Papaver orientale*'de PFO aktivitesini artırırken, 30 dk sıcaklık uygulamasının çalışılan bitkilerin hepsinde PFO aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Papaver*, ısı şoku, antioksidant enzimler, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, polifenol oksidaz, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* and *Papaver bracteatum*, *Oxytona seksiyonu*

ABSTRACT**THE EFFECTS OF HEAT STRESS ON ANTIOXIDANT ENZYMES IN SPECIES
BELONGING *OXYTONA* SECTION OF *PAPAVER* GENUS****KOYUNCU, MESUT**

Msc in Biology

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Lale YILDIZ-AKTAŞ

February 2010, 54 pages

In this study, the effects of 10 min and 30 min of 40 °C heat shock application on antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbat peroxidase (APX) and poliphenol oxidase (PFO), which is one of the key enzymes of phenol groups from seconder metabolites, as well as on amount of protein, were investigated in three species (*Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* and *Papaver bracteatum*) belonging *Papaver* genus *Oxytona* section. In all three studied species, 10 min heat application raised the amount of catalase, peroxidase and ascorbat peroxidase significantly, and 30 min heat application, while still higher than that of control, was found to be lower than 10 min heat application. 30 min heat application lowered the amount of PFO activity in all studied species, whereas 10 min heat application raised it in *Papaver orientale*.

Keywords: *Papaver*, heat shock, antioxidant enzymes, catalase, peroxidase, ascorbat peroxidase, poliphenol oxidase, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* and *Papaver bracteatum*, *Oxytona* section

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ ile Prof. Dr. Avni GÜVEN'e, Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ ve Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK'e ve laboratuvarıda birlikte çalıőtığımız değerli arkadaşlarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmam boyunca gösterdiği katkı ve özverileri için değerli eŐime teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Yüksek sıcaklıklara Fizyolojik Tepkiler.....	3
1.2 Yüksek sıcaklıklar ve fotosentez.....	3
1.3 Yüksek sıcaklıklar ve üreme.....	4
1.4 Kazanılmış hücrel termotolerans.....	4
1.5 Isı şok proteinleri ve moleküler şaperonlar.....	5
1.5.1 Hsp100.....	6
1.5.2 Hsp90.....	7
1.5.3 Hsp70.....	7
1.5.4 Hsp60.....	8

1.5.5 sHSP protein ailesi.....	8
1.6 Sıcaklık tepkisinin diğer bileşenleri.....	9
1.7 Antioksidan üretimi.....	10
1.7.1 Antioksidant Sistem.....	11
1.7.2 Katalaz.....	12
1.7.3 Peroksidaz.....	12
1.7.4 Askorbat peroksidaz	13
1.7.5 Polifenol oksidaz.....	13
1.8 Papaveraceae Familyası Sınıflandırması, Önemi ve Türkiye’deki durumu.....	14
2. MATERYAL VE METOD.....	18
2.1 MATERYAL	18
2.2 METOD.....	19
2.2.1 Katalaz, Peroksidaz, Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin ve Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Homojenat Hazırlanması.....	19
2.2.2 Protein Miktarının Belirlenmesi.....	19
2.2.3 Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	20
2.2.4 Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
2.2.5 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
2.2.6 Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
2.2.7 İstatistik Analiz.....	22

3. BULGULAR.....	23
3.1 Isı Şoku Uygulamalarının Protein Miktarı Üzerine Etkisi.....	23
3.2 Isı Şoku Uygulamalarının Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	25
3.3 Isı Şoku Uygulamalarının Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	28
3.4 Isı Şoku Uygulamalarının Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	30
3.5 Isı Şoku Uygulamalarının Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	33
4. TARTIŞMA.....	36
5. KAYNAKLAR.....	41
6. ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Papaveraceae ailesinin alt bölümleri (Kadereit, 1993).....	14
Şekil 2.1. Üç aylık büyüme periyodu sonunda, saksı içerisindeki bitkiler.....	18
Şekil 2.2. Protein tayininde kullanılan BSA standart grafiği.....	20
Tablo 3.1. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının <i>Papaver pseudo-orientale</i> , <i>Papaver orientale</i> ve <i>Papaver bracteatum</i> , türlerinin 3 aylık fidelerinde toplam protein miktarı (mg/ml) üzerine etkisi.....	23
Şekil 3.1. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının <i>Papaver pseudo-orientale</i> (a), <i>Papaver orientale</i> (b) ve <i>Papaver bracteatum</i> (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde toplam protein miktarı (mg/ml) üzerine etkisi.....	25
Tablo 3.2. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, <i>Papaver pseudo-orientale</i> , <i>Papaver orientale</i> ve <i>Papaver bracteatum</i> türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....	26
Şekil 3.2. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, <i>Papaver pseudo-orientale</i> (a), <i>Papaver orientale</i> (b) ve <i>Papaver bracteatum</i> (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....	27
Tablo 3.3. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, <i>Papaver pseudo-orientale</i> , <i>Papaver orientale</i> ve <i>Papaver bracteatum</i> türlerinin 3 aylık fidelerinde peroksidaz (Podt) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....	28
Şekil 3.3. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, <i>Papaver pseudo-orientale</i> (a), <i>Papaver orientale</i> (b) ve <i>Papaver bracteatum</i> (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....	30

Tablo 3.4. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....31

Şekil 3.4. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....32

Tablo 3.5. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde polifenol oksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....33

Şekil 3.5. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde polifenol oksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.....35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AOT	Aktif oksijen türleri
HSP	Isı şok proteinleri
Rubisco	RuBP karboksilaz/oksijenaz
APX1	Askorbat peroksidaz geni
HSE	Isı şok elementi
HSFs	Isı şok transkripsiyon faktörleri
APX	Askorbat peroksidaz
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
POD	Peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ROOH	Hidroperoksit
OH ⁻	Hidroksil
kDa	Kilodalton
EU/g yaprak	Gram yaprak başına enzim ünitesi

1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında, doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi % 26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Bunu % 20 ile mineral stresi ve % 15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm streslerle beraber ısı şoku stresi de % 29'luk bir pay içinde yer almakta, ve yalnızca % 10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1986).

Bitkilerin yüksek sıcaklıklara maruz kalmaları, sıcak habitatlarda olduğu gibi uzun süreli veya mevsimsel ve günlük değişikliklerde olduğu gibi daha kısa süreli olabilir. Buna bağlı olarak, bitkilerin adaptasyon ve aklimasyonu, değişik şekillerde ve farklı organizasyon seviyelerinde görülmektedir. Farklı bitki doku ve organları; farklı bitki büyüme evrelerinde, stres esnasında aktif olan hücresel süreçlerin duyarlılığına bağlı olarak, farklı şekillerde etkilenecektir. Sonuç olarak; sıcaklık stresi ve dolayısıyla ısı toleransı, tek bir olgu değil, karmaşık tepkilerden oluşmaktadır.

Moleküler seviyede ısı stresi, çok sayıda yapı ve fonksiyonu etkiler. Yüksek sıcaklıklar lipidlerin özelliklerini değiştirir ve membranların daha akışkan hale gelmesine neden olarak membranın işlevselliğini etkiler. Bütün proteinlerin optimum performans gösterdikleri bir sıcaklık aralığı vardır. Bu yüzden, yüksek sıcaklıklar enzim aktivitesini değiştirerek metabolik yolların dengesini bozar ve son aşamada proteinleri denature ederler. Membranların ve proteinlerin hasar görmesi, aktif oksijen türlerinin (AOT) üretimine yol açar. Yüksek sıcaklıklarda AOT etkin bir şekilde kontrol edilemeyebilir ve bu durum da, sıcaklıklarda oluşturduğu dolaysız etkilere ek olarak, ısı kaynaklı oksidatif hasarın oluşmasına neden olur. Fizyolojik seviyede bu hasar; fotosentezin azalması, üretilen yapıtaş ve besin maddelerinin taşınmasında bozukluklar ve karbon aktivitelerinde kayıplar olarak karşımıza çıkar. Bu faktörler ise sonunda, tomurcuklanma ve çiçek açma gibi mevsimsel olaylarda değişikliklere, üreme bozukluklarına ve hücre ölümlerinde hızlanmaya yol açar (Hall, 2001). Bu yüzden, bitkilerin ısı stresine verdiği tepkilerde, çok sayıda genin de yer aldığı farklı süreçler söz konusudur.

Aşırı sıcaklıklara verilen tepkilerin en bilineni, ısı şok proteinlerinin (HSP) üretilmesidir. Bu proteinler, hücre proteinlerinin kalite kontrolünde moleküler koruma mekanizması olarak işlev görürler (Boston vd., 1996). Ancak, ısı şok proteinleri yüksek sıcaklıklara verilen tepkilerden yalnızca biridir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda elde edilen bilgiler, bitkilerin yüksek sıcaklıklara toleransına katkıda bulunan farklı yollar olduğunu göstermektedir.

Bitkide yüksek veya düşük sıcaklıkların neden olduğu stres, iki şekilde metabolizmada değişiklik oluşmasına yol açar. Birincisi; hücre metabolizması, artan veya azalan sıcaklıkların metabolik süreçler ve genel olarak metabolizma üzerinde gerçekleştirdiği sonuçlara uyum sağlamalıdır. Sıcaklık değişikliğinin enzimlerin yapısı, katalitik özellikleri ve işlevselliği ile (Kubien et al. 2003), membran metabolit taşıyıcıları üzerindeki farklı etkileri nedeniyle, herhangi bir düzenleyici mekanizma olmaması durumunda metabolit seviyeleri normal homeostatik koşullara göre bozulabilir. Ancak her koşulda, denge durumunu koruma amaçlı olarak, düzenleyici mekanizmalar aktif hale geçmekte, ve metabolit seviyelerini ve metabolit akımı (metabolik bir pathway aracılığı ile moleküllerin üretilme oranı ve hızı) normale döndürmektedir (Fernie et al. 2005, Schwender et al. 2004).

Artan veya azalan sıcaklıklara karşı oluşan tepkilerdeki metabolizma değişikliklerinin ikinci yanı, artan tolerans mekanizmaları ile ilgili olanlardır. Stres toleransına katkıda bulunacak özellikleri olduğu düşünülen çok sayıda metabolitin, stres tepkileri ile ilişkisi olduğu uzun zamandır düşünülmektedir (Guy 1990, Levitt 1972,). Çalışmalar, özellikle metabolitlerin aşağıdaki fonksiyonları üzerinde yoğunlaşmıştır:

- 1) Hücresel dehidrasyonu azaltmak üzere hücresel su ilişkilerini düzenleyen ozmolitler olarak iş görürler.
- 2) Enzimleri, membranları ve diğer hücresel bileşenleri stabilize etmede işlev gören çözülebilir maddeler olarak iş görürler.

3) Potansiyel olarak zehirli olabilecek seviyelerdeki metal ve inorganik iyonları nötralize etmede iş gören maddelerdir.

4) Düzgün membran işlevselliği için gerekli olan sıvı-kristal yapının optimize edilmesi için membran lipid kompozisyonunu düzenlemede iş görürler.

5) Enerji kaynakları olarak iş görürler.

Stres tepkilerinde ortaya çıkan metabolitler arasında; çözülebilir şekerler, amino asitler, organik asitler, poliaminler ve lipidler sayılabilir (Guy 1990, Levitt 1972).

1.1 Yüksek sıcaklıklara Fizyolojik Tepkiler

Bitkiler, günlük veya mevsimsel olarak geniş çapta sıcaklık dalgalanmalarına maruz kalmaktadırlar. Bitkilerin bu değişken sıcaklıklarda hücrel aktivitetlerini sürdürmelerini mümkün kılan mekanizmalar henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Patterson ve Graham, 1987). Genel olarak bitkilerin optimal ısı aralığı yetiştirme sıcaklıklarına göre $\pm 10^{\circ}\text{C}$ olarak hesaplanmıştır (Mahan vd., 1995). Bu optimum dışında maruz kalınan sıcaklıkların, öldürücü olmamakla birlikte, stres oluşturdukları kabul edilmektedir. Bitkilerin canlı kalabildiği üst sınır, ılıman bölge bitkileri için ve sıcaklığa maruz kalma süresine bağlı olmak koşuluyla, 40°C ila 55°C arasında değişmektedir (Klueva vd., 2001). Bu üst sınır, aynı zamanda bitkilerin dağılımını ve tarım amacıyla kullanılmasını sınırlandıran bir faktör olarak da karşımıza çıkmaktadır.

1.2 Yüksek sıcaklıklar ve fotosentez

Yüksek ısılarda fotosentezi sınırlandırdığı çok sayıda araştırmayla gösterilmiştir. Fotosentez, bitki için ölümcül olan sıcaklıkların çok altındaki sıcaklıklarda azalmaya başlamaktadır. Ancak, bu olayın gerçekleşme mekanizması hala tartışılan bir konudur. Mevcut bilgiler, fotosentezdeki bu azalmanın ortak bir mekanizma ile mi, yoksa farklı yollarla mı gerçekleştiğini kesin olarak söylememize imkan vermemektedir (Jenks vd., 2005). Fotosentez aygıtının farklı bileşenleri ısıya duyarlılık sergilemektedir, ancak sıcaklık stresi

altında hangisinin sınırlayıcı bir etki oluşturduğunu belirlemek zordur. Uzun bir süredir Fotosentez II sisteminin en hassas bileşen olduğu düşünülmektedir. Zayıf halka olduğu düşünülen diğer yapılar arasında; hücreler arası boşluklardan kloroplasta CO₂ transferini gerçekleştiren bileşenler (Bernacchi vd., 2002), fotosentez elektron taşıma sistemi (Wise vd., 2004) ve ribuloz bifosfat (RuBP) rejenerasyon kabiliyetinin kaybolması (Wise vd., 2004) sayılmaktadır.

Salvucci ve Crafts-Brandner (2004), hücrelerin RuBP karboksilaz/oksijenaz'ı (Rubisco) optimal durumda tutamamalarının, değişik fotosentez bileşenlerinin sıcaklığa dayanıksızlığından daha önemli olduğunu iddia etmektedirler. Sıcaklık stresi altında Rubisco aktivitesi azalmaktadır. Ancak, Wise vd. (2004) yaptıkları çalışmalarda Rubisco aktivitesinin yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Sıcaklık stresi esnasında fotosentezi sınırlandıran faktörlerin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu düşünülmektedir.

1.3 Yüksek sıcaklıklar ve üreme

Bitkilerde döllenme ve tohum geliştirme faaliyetlerinin, vejetatif büyümeye oranla yüksek ısıya daha duyarlı oldukları rapor edilmektedir. Ancak, yüksek sıcaklıklarda fertilité ve tohum veriminin azalmasının, tek bir işlevsel bozukluktan ziyade, sıcaklık stresinin çeşidine ve bitki türüne bağlı olduğu düşünülmektedir. Fertilité kaybı; erkek mayozu, polen çimlenmesi, polen tübü büyümesindeki problemlerden kaynaklanabilir. Benzer şekilde, sıcaklık stresinin değişik bitki türlerinde çiçek üretimi, endosperm bölünmesi, fotosentez ve ürün taşınması gibi süreçler üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmaktadır (Commuri & Jones, 2001; Kim vd., 2001; Sato vd., 2002; Cross vd., 2003; Hurkman vd., 2003; Zahedi vd., 2003; Young vd., 2004; Kobata & Uemuki, 2004).

1.4 Kazanılmış hücresel termotolerans

Bitkiler, özellikle de ılıman bölge bitkileri, akut sıcaklık stresi esnasında hayatta kalmalarını sağlamak üzere sıcaklık aralıklarını genişletecek indüklenebilir termotolerans özelliğine sahiptir. Yüksek sıcaklıkların neden olduğu sıcaklık stresinde söz konusu olan ve kısa süreli sıcaklıklara maruz kalma

neticesinde tetiklenen yüksek sıcaklık toleransına “kazanılmış termotolerans” adı verilmektedir (Kotak et al. 2007, Lin et al. 1984). Kazanılmış termotolerans, son derece karmaşık biyokimyasal, moleküler ve metabolik süreçler içerir (Kotak et al. 2007, Larkindale et al. 2005,).

Bitkiler ve diğer organizmalar, “kazanılmış termotolerans” yoluyla, normalde öldürücü olması gereken sıcaklıklara dayanabilecek şekilde hızla uyum sağlayabilmektedirler (Vierling, 1991). Termotoleransın kazanılması, önceki dönemlerde maruz kalınan bir ön muamele, öldürücü olmayan yüksek sıcaklıklar ve orta dereceli stres koşullarından kaynaklanabilir. Doğal ortamlarda olduğu gibi, sıcaklıkların öldürücü seviyelere ulaşmasından önce aşamalı olarak artması da termotolerans kazanılmasına neden olabilir. Örneğin pek çok ılıman bitki türü, bir kaç saatliğine doğrudan 45°C sıcaklığa maruz bırakılırsa ölür, ancak doğada olduğu gibi sıcaklık gün boyunca kademeli olarak artırılırsa, aynı sıcaklıkta yaşamını sürdürecektir. Laboratuvar koşullarında aynı sonuç, kısa süreli ön sıcaklık uygulamalarıyla (2 saat veya daha az) öldürücü sıcaklıklara yakın ısılarda elde edilebilmektedir (Hong & Vierling, 2000). Bu hızlı uyumun olmaması durumunda, bitkiler optimal ortamlarda bile öldürücü veya hasar oluşturucu sıcaklıklara maruz kalabilirler. Bitkiler tipik olarak günlük ısı dalgalanmaları yaşadıkları için, termotolerans kazanımının metabolik dengeyi koruyan daha genel bir mekanizmanın bir parçası olduğu düşünülmektedir. Kazanılmış tolerans, buna neden olan ön uygulamadan 24 saat sonra tamamen ortadan kalkmaktadır (Jenks vd., 2005).

1.5 Isı şok proteinleri ve moleküler şaperonlar

Bitkilerin ve diğer organizmaların yüksek sıcaklıklara verdikleri tepkilerin en iyi bilineni ısı şok proteinlerinin (HSPs) üretilmesidir. Büyüme için optimum olan sıcaklıkların 5–10°C üzerine çıkılmasından saniyeler sonra ısı şok proteinlerinin transkripsiyonu tetiklenir. 1-2 saat içerisinde maksimum transkript seviyelerine ulaşılır ve daha sonra transkript seviyeleri azalmaya başlar. Proteinler, stresin başlamasından itibaren 1 saat içinde hassas antibodiler aracılığıyla tespit edilebilir. Isı şok proteinlerinin seviyesi tıpkı bir termometre

gibidir ve öldürücü sıcaklıklara ulaşıncaya kadar meydana gelen stresin derecesiyle doğru orantılıdır (Chen vd., 1990; DeRocher vd., 1991).

Hem bitkilerde hem de diğer organizmalarda iyi karakterize edilmiş beş HSP sınıfı vardır: Hsp100/ClpB, Hsp90, Hsp70/DnaK, Hsp60/GroE ve küçük HSPLer (sHSPLs). Strese karşı verilen hücrel tepkilerdeki temel rollerine uygun olarak, Hsp70 ve Hsp60 proteinleri en korunmuş proteinlerdir (Külz, 2003). Bütün bu HSPLerin moleküler şaperon olarak işlev gördükleri deneylerle kanıtlanmıştır. Moleküler şaperonlar, yapısal açıdan kararsız durumdaki başka proteinlere bağlanma özelliğinde olan değişik protein gruplarıdır (Boston vd., 1996). Şaperonlar; proteinlerin katlanması, proteinlerin membranların bir tarafından diğer tarafına taşınması, protein aktivitesinin ayarlanması, protein bozunmasının düzenlenmesi ve geri dönüşümsüz protein yapışmasının engellenmesi gibi birçok işlev gerçekleştirirler. Son bahsedilen aktivitenin, yüksek sıcaklık streslerinde canlı kalabilme ve söz konusu proteinlerin üretilmesinin tetiklenmesinde çok önemli olduğu düşünülmektedir.

1.5.1 Hsp100

Hsp100 sınıfı şaperonlar; bakteri, maya, bazı parazitik protozoalar ve bitkilerde mevcuttur, fakat daha yüksek ökaryotlarda bulunmazlar (Schirmer vd., 1996; Agarwal vd., 2001, 2002). Bitkilerin hem sitoplazmalarında, hem de kloroplastlarında Hsp100 proteinleri bulunur ve bunların her ikisinin de ısı ile tetiklendiği deneysel olarak gösterilmiştir (Schirmer vd., 1994; Keeler vd., 2000). Sitoplazmik Hsp100 proteinleri, bitkilerde kazanılmış termotoleransta bir rol oynadıkları genetik olarak kanıtlanmış tek HSPLerdir (Hong & Vierling, 2000; Hong vd., 2003; Queitsch vd., 2000). Ancak, bu proteinler kazanılmış termotoleransta sıcaklık stresinin etkilerini azaltmada çok önemli bir görev üstlenirken, uzun süreli ve daha yumuşak sıcaklık stresinde herhangi bir rol oynadıklarını gösteren bir kanıt bulunmamaktadır (Hong & Vierling, 2001).

1.5.2 Hsp90

Hsp90 şaperonları, muhtemelen bitkiler dahil, çok sayıda ökaryotun canlılığı için gerekli olan ve bol miktarda bulunan proteinlerdir. Hayvanlarla ve mayalarla yapılan çalışmalar, Hsp90'ın sinyal iletiminde yer alan proteinlerin aktivitelerini düzenlemede kilit bir rol oynadığını göstermiştir. Bunu, ligandların etkileşimini düzenleyerek, proteinleri membranlara götürüp getirerek veya bu proteinlerin diğer hücrel bileşenlerle etkileşimini değiştirerek gerçekleştirirler. Bu aktiviteler; Hsp70, Hs40 ve başka proteinleri içeren dinamik bir multiprotein kompleksi içinde işlev görmesine bağlıdır.

Arabidopsis'in yedi Hsp90 geni vardır. Bunlardan dördü sitosolik formları kodlar. Diğerleri kloroplast, mitokondri ve endolazmik retikulum formlarını kodlamaktadır (Krishna & Gloor, 2001). Bu genlerin bazıları önemli ölçüde sıcaklık uyarımı göstermekle birlikte, Hsp90'la sıcaklık toleransı arasında herhangi bir doğrudan ilişki belirlenmemiştir.

1.5.3 Hsp70

Hsp70 şaperon ailesi, moleküler şaperonlar içinde belki de en iyi anlaşılanlardır. *Arabidopsis*'in genetik analizi, 14 Hsp70 proteini ortaya çıkarmıştır: 5 sitosolik, üç endolozmik retikulum, üç kloroplast, iki mitokondri ve bir tane de potansiyel psödo-gen formu (Lin vd., 2001; Sung vd., 2001). *Arabidopsis*'in detaylı ekspresyon analizleri, bu farklı genlerin kompleks gelişimsel ve stres tepkiselliğini ortaya koymuştur. Bir mitokondriyal ve bir kloroplast Hsp70 proteini hariç hepsi, sıcaklığa tepki olarak önemli ölçüde uyarılmışlardır (Sung vd., 2001).

Bitkilerdeki Hsp70 genlerinin sayısı, bitkilerdeki sıcaklık toleransındaki rollerinin genetik analizini zorlaştırmaktadır. Lee and Schöffl (1996), Hsp70'in ısı toleransındaki gerekliliğini ortaya çıkarmışlardır. Deneylerde ekspresyonda değişiklik elde etmede zorlanılması Hsp70 seviyelerinin sıkı bir şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir. Ancak Hsp70-1'in aşırı ekspresyonu, spesifik test koşulları altında artmış sıcaklık toleransı ile sonuçlanmıştır. Endoplazmik

retikulum Hsp70'inin kuraklık stresi etkisini ortadan kaldırmakla birlikte sıcaklık toleransını artırmadığı gösterilmiştir (Alvim vd., 2001). *Chlamydomonas*'ta kloroplast Hsp70'inin fotoinhibisyon esnasında PSII'nin korunmasında görev yaptığı tahmin edilmektedir (Schroda vd., 1999). Sonuç olarak, Hsp70'lerin bitkilerde sıcaklık toleransında önemli oldukları, fakat sıcaklık toleransını artırmak için bu proteinlerin ekspresyonunu manipüle etmenin zor olacağı ileri sürülmektedir.

1.5.4 Hsp60

Hsp60 veya şaperonin ailesi proteinlerinin, bitkilerin sıcaklık stresine aklimasyonunda görev yaptıkları doğrudan gösterilememiştir. Ancak, bazı kanıtlar plastidlerde, mitokondrilerde ve öbakterilerde bulunan Grup I şaperoninlerin (Hill & Hemmingsen, 2001; Wang vd., 2004) ısı stresi bağlamında işlev görebileceklerini işaret etmektedir. Örneğin sıcaklık, mitokondiyal şaperonin Cpn60(2)'nin ekspresyonunu indüklemektedir (Prasad & Stewart, 1992). Kloroplastta bulunan Hsp60 ailesinin bir üyesi olan Cpn60-b3 sıcaklıkla düzenlenmemektedir (Zabaleta vd., 1994), ancak bu gene, bir T-DNA eklenmiş olan bitkiler artmış ısı hassasiyeti sergilemektedir (Ishikawa vd., 2003).

Genellikle proteinlerin katlanmasını gerçekleştirdikleri düşünülmekle birlikte, şaperoninlerin membranların yapımı ve işlevselliğinde oynadığı çeşitli roller son zamanlarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Deaton vd. (2004) Grup I şaperonin GroEL'in sitoplazmik membranların bir araya getirilmesini koordine etmesinin olası olduğunu rapor etmişlerdir. Trent vd. (2003) ise, Grup II şaperonin'in normal ve stres koşulları altında membranlarla ilgili olduğunu bulmuş ve membran kararlılık ve geçirgenliğini sürdürmede yapısal bir rol oynadığını düşünmektedirler.

1.5.5 sHSP protein ailesi

Diğer ökaryotlarla kıyaslandığında bitkiler, sHSP ailesine mensup son derece karmaşık proteinler içerir. Bitkilerdeki sHSP'ler, sıcaklık tarafından hızla ve büyük miktarlarda indüklenirler, ve hücrede bulunan en bol RNA'lar arasında

yer alırlar (Vierling, 1991). Buna ek olarak, sıcaklık stresi esnasında sHSP transkript ve proteinleri başka stres koşullarında ve belirli gelişim aşamalarında da belirlenmişlerdir, fakat çoğu vejetatif dokuda genellikle görülmezler (Waters vd., 1996).

Diğer organizmalarda sHSP'ler sitoplazmada ve bazen de çekirdekte bulunurken, bitkilerde hem sitosolde, hem de organellerde görülürler. Sitosolde, sınıf I ve sınıf II proteinler olarak adlandırılan iki tip sHSP vardır. Mitokondri, plastid ve endoplazmik retikulumun sHSP'lerini kodlayan ve her birisi uygun organeli hedefleyen sinyaller içeren üç ayrı gen ailesi tespit edilmiştir. *Arabidopsis* genomunun analizi, sHSP ailesinin daha karmaşık yapısını ortaya çıkarmıştır (Scharf vd., 2001).

Şu andaki modeller, sHSP'lerin ATP'den bağımsız olarak işlev gören şaperonlar olduğunu ve agregat proteinlere bağlandıklarını, Hsp70 ve bazı koşullarda da Hsp100 proteinlerince tekrar katlanmaları için bu proteinleri hazır halde tuttuklarını göstermektedir. sHSP'lerin şaperon olarak etkileşmelerinin yanı sıra, yüksek sıcaklıkların neden olduğu membran akışkanlığını azaltmak için membranlarla etkileştiğini ifade eden bir hipotez ileri sürülmüştür (Vigh vd., 1998; Török vd., 2001).

Stres toleransında sHSP'lerin büyük bir rol oynadığına dair herhangi bir doğrudan kanıt bulunamamış olmakla birlikte, yine de sHSP'nin sıcaklık toleransında önemli bir rolü olduğunu destekleyen başka deliller de mevcuttur. Örneğin, siyanobakter *Synechocystis*'in tek sHSP geni olan Hsp16.6'nın genomdan çıkarılması, sıcaklığa duyarlı bir fenotipin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Giese & Vierling, 2002). Sitosolik bitki sHSP'lerinin ekspresyonu *E. Coli*'nin sıcaklık stresinden korunmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Yeh vd., 1997).

1.6 Sıcaklık tepkisinin diğer bileşenleri

HSP'lerin tetiklenmesi sıcaklık/ısı toleransında önemli olmakla birlikte, çok sayıda başka süreç de bu stresin atlatılmasında yer almaktadır. Bazı türlerin

HSP'si çıkarılmış mutantları yine de termotolerans kazanabilmektedir (maya, Smith & Yaffe, 1991; *Drosophila*, Zatssepina vd., 2001). Mayada, bu organizmanın önemli HSP'lerinin çoğunun ekspresyonunu düzenleyen HSF1'in çıkarılmasının termotolerans kazanılmasını engellemediği gösterilmiştir (Smith & Yaffe, 1991), ve HSP70 seviyeleri azaltılmış bir *Drosophila* mutanı son derece yüksek termotolerans seviyeleri sergilemiştir (Zatssepina vd., 2001). Buna ilaveten, termotolerans bakımından belirleyici olan ve fakat HSP'leri normal şekilde tetiklenen bazı mutantlar mevcuttur (Lee & Park, 1998; Hong vd., 2003). Diğer organizmalarda yapılan bazı deneylerde ise, kimyasal uygulamaların termotoleransı tetiklemekle birlikte, HSP'leri tetiklemediği rapor edilmiştir (Borrelli vd., 1996; Swan & Watson, 1999; Hershko vd., 2003). Bu veriler ve benzerleri, HSP'lerin tetiklenmesinden başka süreçlerin de termotoleransın elde edilmesinde işe karıştığını göstermektedir.

1.7 Antioksidant üretimi

Bitkilerde, sıcaklık tarafından aktivitesi artırılan (upregüle edilen) çok sayıda HSP-dışı transkript vardır. Özellikle *Arabidopsis* sitosolik askorbat peroksidaz geni'nin (APX1) sıcaklık tarafından aktivitesinin artırılmasıyla kalmayıp, aynı zamanda 5' promotör bölgesinde işlevsel bir ısı şok elementi (HSE) içerdiği de gösterilmiştir (Storozhenko et al., 1998). Isı şok transkripsiyon faktörleri (HSFs), bu HSE üzerine etki etmektedir (Panchuk et al., 2002). APX1'i kesilen *Arabidopsis* bitkilerinin yüksek ışık stresine karşı hassas oldukları gösterilmiş, ancak yüksek sıcaklıklardaki durum incelenmemiştir (Pnueli et al., 2003). Ancak, bu bitkilerin sıcaklık stresi altında normal bir şekilde HSP ürettikleri, ışık stresi altında ise HSP üretmedikleri gösterilmiştir. Arpa APX1 geni de sıcaklık tarafından tetiklenebilmektedir (Shi vd., 2001). Sıcaklık stresinin bitkilerde sekonder oksidatif hasar oluşturduğu bilinmektedir (Larkindale & Knight, 2002), ve APX'in oksidatif hasarı sınırlamada kullanıldığı düşünülmektedir.

Bitkilerdeki sıcaklık stresi esnasında APX'e ek olarak, başka antioksidant üreten enzimlerin aktiviteleri de değişikliğe uğramaktadır. *Agrostis palustris*'de, uzun süreli sıcaklık stresi esnasında süperoksit dismutaz (SOD) artarken, APX,

katalaz ve glutation reduktaz aktiviteleri azalmıştır (Jiang & Huang, 2001). Ancak, bu türde uzun süreli stresin ilk haftasında APX ve peroksidaz artarken, katalaz azalmış ve SOD aktivitesi daha yavaş artmıştır (Larkindale & Huang, 2004). Mısır bitkisinde sıcaklık stresi altında bu enzimlerin hepsinin aktivitesi artmıştır (Gong et al., 1998). Hücrenin antioksidant kapasitesini değiştiren kimyasallarla ön uygulama yapılması da bitkilerin sonraki sıcaklık stresini tolere etme yeteneğini etkilemektedir (Dat et al., 1998; Gong et al., 1998). Fakat bu uygulamalar genel olarak bitkilerin HSP üretme özelliklerini etkilememektedir. Bu durum ise, antioksidant kapasitesinde değişiklik oluşturmak suretiyle termotolerans elde edilmesinin, HSP'lerin tetiklenmesinden ayrı bir yol (pathway) ile gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ancak, APX'i eksik *Arabidopsis* bitkileriyle yapılan çalışmalarda, sıcaklık stresi altında HSP'lerin normal bir şekilde üretilmesiyle birlikte, başka stres koşullarında bazı HSP'lerin tipik olmayan bir şekilde eksprese edildikleri gösterilmiştir (Pnueli et al., 2003). Bu da sıcaklık stresi esnasında antioksidant ve HSP'lerin üretilmesi için ayrı ayrı metabolik yollar (pathwayler) bulunmakla birlikte, bu yolların zaman zaman kesişmelerinin olası olduğunu düşündürmektedir.

1.7.1 Antioksidant Sistem

Antioksidantlar, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin ve bazı toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin C, E, A, beta-karoten, metallotionin, poliaminler, melatonin, NADPH, adenzin, koenzim Q-10, urat, ubikinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metiyonin, s-adenozil-L-metiyonin, resveratrol, nitroksidler, GSH, bu gruba giren antioksidantlar arasındadır (Mercan, 2004). Bitkiler antioksidant sistem sayesinde kendilerini çevrenin zararlı etkilerinden (sıcaklık, radyasyon, ağır metal kirliliği vb.) korurlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar gibi bitki antioksidant sisteminin parçası olan bir grup protein, sıcaklığın neden olduğu oksidatif stres sonucu hızla aktive edilir. Isı stresi tepkisinin düzenlenmesi, ayrıca, hücredeki proteinlerin yıkım ve yapımının kontrol edilmesine bağlıdır (Mathew ve Morimoto, 1998; Mathew vd., 1998). Antioksidant sistem antioksidant enzimler ve antioksidant bileşiklerden oluşmaktadır. Antioksidant enzimler; süperoksit

dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi çok sayıda enzimi içermektedir. Antioksidant bileşikler ise karotenoidler, ksantofiller, askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi çok sayıda bileşikten meydana gelir. Ayrıca; bitkilerin kadmiyuma maruz kaldığı sürede hücrelerde aktive olmuş çeşitli detoksifikasyon mekanizmaları da rol oynamaktadır. Bunlar; fitoçelatinlerin metallere kompleks oluşturması, vakuollerde metallere biriktirilerek depolanması, hücre çeperinin kalınlaşması, plazma zarının geçirgenliğinin azalması ve çok önemli rolleri olan stres proteinlerinin sentezi gibi olaylardır (Jemal et al. 1998). Olumsuz çevre şartları bitkilerde stres metabolitlerinin birikimini artırır. Prolin, stres metabolitleri içinde en yaygın olanıdır. Bitkiler su eksikliği, yüksek tuzluluk, soğuk, sıcaklık ve ağır metallere maruz kaldıklarında, prolin içeriğinin arttığı görülmüştür. Prolin birikimi, çevresel stres indikatörü olarak değerlendirilmektedir (Chen et al. 2003).

1.7.2 Katalaz (E.C.1.11.1.6)

Katalaz enzimi (CAT), konsantrasyonu yüksek olan hidrojen peroksidin su ve oksijene kadar parçalanmasını sağlar. Bu enzim yapısında prostetik grup olarak porfirin içerir ve molekül ağırlığı yüksek olan bir enzimdir. Katalaz genellikle bitkilerin yaprak, kotiledon ve kök hücrelerinde peroksizom ve glioksizomlarında bulunur. Bundan farklı olarak ise mısırdaki bulunan CAT III ise hücrelerin mitokondrilerindedir (Öztürk, 2002). Katalaz enziminin ana fonksiyonu, moleküler oksijen varlığında hücre metabolizmasının bazı basamaklarında sentezlenen, radikal özellikli hidrojen peroksit veya ROOH gibi herhangi bir peroksidin radikal özelliğini gidererek oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarların önüne geçmektir. Zira hidrojen peroksit, potansiyel bir singlet oksijen ve hidroksil radikali (OH⁻) kaynağıdır (Öztürk, 2002).

1.7.3 Peroksidaz (E.C.1.11.1.7)

Peroksidaz enzimleri, hidrojen peroksit substratını kullanarak pek çok organik ve inorganik maddenin oksidasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Peroksidazların molekül ağırlıkları genellikle 35-100 kDa arasında değişmektedir. Peroksidaz enzimleri, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinoidaminler (yalnızca

benzidin türevi olanlar) gibi pek çok sayıda aromatik komponentlerin dehidrojenasyonlarında katalizlemektedirler. Peroksidazlar, çeşitli aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak metabolizmanın sonucunda meydana gelen hidrojen peroksiti etkisiz hale getirirler (Öztürk, 2002).

1.7.4 Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz hücrelerde meydana gelen fizyolojik olaylar sonucunda ortaya çıkan hidrojen peroksitin hasarlarını ortadan kaldırır. Bu enzim baskın olarak sitoplazmada, mitokondrilerde ve kloroplastlarda bulunur. Askorbat peroksidaz, hidrojen peroksiti nötralize etmek için askorbati bir elektron vericisi olarak kullanır. Bu enzim askorbat-glutasyon döngüsündeki ilk enzimdir. Askorbat peroksidaz hidrojen peroksitin suya redüksiyonunu katalizler ve bir redüktant olarak askorbata karşı yüksek bir afinitesi ve spesifikliğı vardır (Asada,1999).

1.7.5 Polifenol oksidaz (EC.1.10.3.1)

Polifenol oksidaz bakır içeren bir enzimdir ve moleküler oksijenin varlığında, monofenollerin o-difenollere ve o-difenollerin o-dikinsonlara oksidasyonunu katalizler. Oluşan kinonların polimerizasyonu sonucunda bitkilerde kararına meydana gelir (Vamos-Vigyara, 1981). Polifenol oksidaz enziminin doğal substratları; katekinler, antosiyaninler, flavenoller ve sinamik asit türevleri gibi flavonoid tipi fenoller ve katekol, gallik asit, tirozin, dihidroksi fenilalanin, dihidroksi feiletılamin, klorogenik asit benzeri basit fenollerdir (Vamos-Vigyara, 1981; Odabaşoğlu, 1998).

Polifenol oksidaz, bazı bakteri ve funguslarda, çoğu bitkide ve tüm memelilerde bulunur. Değişik patojenlere karşı direnç oluşturma ve hastalıklardan korunma sisteminin bir parçası olarak ele alınmaktadır (Martinez ve Whitaker, 1995; Odabaşoğlu, 1998).

1.8 Papaveraceae Familyası Sınıflandırması, Önemi ve Türkiye'deki durumu

Türkiye çok sayıda bitki türünün gen merkezi durumundadır. Bunun en önemli nedenleri; iklim farklılıkları, topografik çeşitlilikler, jeolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik farklılıkları ve ekolojik farklılıklardır (Atalay 1994, Çelik 2003). Yaklaşık 260 türü bulunan *Papaveraceae* ailesi Kadereit (1993)'e göre, 23 cinsi içeren 4 alt aileye ayrılmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Papaveraceae ailesinin alt bölümleri (Kadereit, 1993)

Aile	PAPAVERACEAE			
Alt Aile	<i>Chelidonioideae</i>	<i>Eschscholziadeae</i>	<i>Platystemonoideae</i>	<i>Papaveroideae</i>
Cins	<i>Chelidonium</i> (Tourn.)	<i>Eschscholzia</i> Cham.	<i>Platystemon</i> Benth.	<i>Meconopsis</i> Viguiet
	<i>Hylomecon</i>			<i>Papaver</i> (Tourn.) L.
		<i>Hunnemannia</i> A. Juss	<i>Herperomecon</i>	<i>Romeria</i> Medic.
	<i>Stylophorum</i> Nutt.			<i>Stylomecon</i> Benth.
		<i>Dendromecon</i>	<i>Meconella</i> Nutt.	<i>Arctomecon</i> Torr. Et Frém.
	<i>Eomecon</i> Hance			
	<i>Sanguinaria</i> Dill			<i>Argemone</i> (Tourn.) L.
	<i>Macleaya</i>			<i>Canbya</i> Parry
	<i>Bocconia</i> (Plum) L.			<i>Romneya</i> Harv.
	<i>Glaucium</i> (Tourn.) Adans			
	<i>Dicranostigma</i> Hook. Et Thoms.			

Dünyada *Papaver* cinsine ait yaklaşık 110 türün (Kapoor 1997) 50 taksonunun ülkemizde bulunduğu belirtilmiştir (Davis 1988, Seçmen vd 1995, Güner vd 2000).

Ülkemizin papaver türleri bakımından oldukça zengin bir floraya sahip olduğu bildirilmiştir (Boissier, 1888). Boissier' in Flora Orientalis'inde 11' i çok yıllık, 12' si tek yıllık olmak üzere 23 *Papaver* türünün yetiştiği bildirilmiştir (Boissier 1867-1888). Daha sonra 1905' de Fedde'nin yaptığı *Papaveraceae* familyası monografisinde Türkiye'de 21 çok yıllık ve 17 tek yıllık olmak üzere 38 *Papaver* türünün bulunduğu bildirilmektedir (Fedde, 1909). Davis; Flora of Turkey' de 19 tek yıllık ve 20 çok yıllık (2 alttür ve 7 varyete) olmak üzere toplam

39 *Papaver* türünün bulunduğunu belirtmektedir (Cullen, 1965; Davis, 1988; Kapoor, 1997). Bunlardan 10 tür, 2 alttür ve 4 varyete Türkiye için endemiktir. *Papaver* cinsi içerisindeki türler sistematik olarak 9 seksiyon altında toplanmaktadır.

Papaver cinsine ait türler 9 seksiyon altında toplanmaktadır. Bunlar;

Sect. I Argemonorhoeades Fedde (Syn. Argemonidium Spach)

Sect. II Carinatae Fedde

Sect. III Horride Elk.

Sect. IV Oxytona Bernh. (Syn. Macrantha Elk.)

Sect. V Mecones Bernh.

Sect. VI Miltantha Bernh.

Sect. VII Orthorhoeades Fedde (Syn. Papaver)

Sect. VIII Pilosa Prantl

Sect. IX Scapiflora Rchb.

III ve IX nolu seksiyonlarda yer alan türler Türkiye’de bulunmamaktadır (Cullen, 1965; Goldblatt, 1974)

Türkiye’de bulunan tek yıllık Papaver türlerini içine alan seksiyonlar:

Sect. Papaver L. (Syn. Orthorhoeades Fedde)

Sect. Carinatae Fedde

Sect. Mecones Bernh

Sect. Argemonidium Spach (Syn. Argemonorhoeades Fedde)

Türkiye’de bulunan çok yıllık Papaver türlerini içine alan seksiyonlar:

Sect. Oxytona Bernh. (Syn. Macrantha Elk.)

Sect. Pilosa Prantl.

Sect. Miltontha Bernh.

Çalışmamızda yer alan, *Oxytona* seksiyonu *Papaver* cinsine ait olup, çok yıllık türleri içermektedir. Yayılım olarak Orta ve Doğu Türkiye, Kuzey ve Kuzey batı İran, Kafkas ve Trans Kafkas bölgelerinde bulunmaktadır (Golddblatt, 1974).

Papaver bracteatum Lindl., *Oxytona* seksiyonunun en büyük bitkisidir. Aynı lokalitede her zaman var olan önemli taksonomik özellikleri ile uniformdur. Bir metreye kadar boylanabilir. 15 kadar çiçek açan gövdesi vardır. Yapraklar 45 cm kadar uzayabilir. Kromozom sayısı $2n = 14$ ’dür (Golddblatt, 1974).

1700-2500 m arasında açık, yarı kuru yamaçlarda, nadiren gölgeli derelerde, sel yatakları ya da sulama bendlerinin çevresinde çok yoğun *Astragalus*, *Thymus*, dikenli bitkiler ve *Ferula* türleri ile beraber bulunurlar (Cullen, 1965; Golddblatt, 1974).

Erzurum Kop dağı. Bayburt Aşkale arası 2050-2100 m. Kars, Kayseri Erciyes dağı, Sivas, Ulaş, Erzincan Karadağ 1960 m. Van, Çatak, Ağrı, Büyük Ağrı dağı, Niğde, Pertek 2000 m alanlarında yayılış gösterirler. (Cullen, 1965; Golddblatt, 1974).

Papaver orientale L., Kuzey batı İran ve kuzey doğu Türkiye de yayılış gösteren ince narin bitkidir. *P. orientale* 1800 m’nin genelde üzerinde bulunmasına rağmen bazen altında da Türkiye ve İran’da bulunabilmektedir. *P. bracteatum*’a göre daha nemli ve sulu alanlarda, açık dağ eğimlerinde ve güneşi az alan kuytularda bulunmaktadır. Kromozom sayısı $2n = 28$ ’dir (Golddblatt, 1974).

Orta ve Doğu Anadolu, Ağrı, Erzurum, Erzincan, Kars, Kayseri, Sivas, Tunceli ve Van çevresinde yayılış gösterirler. (Cullen, 1965; Golldblatt, 1974).

Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medw. genel olarak İran ve Türkiye'nin nemli yerlerinde bulunmaktadır. Literatürde yaygın olduğu bildirilmektedir. Bu tür arazide kendini belirgin bir şekilde göstermektedir. Bitkide diğer iki türe kıyasla değişiklik vardır. Bunlar; dik tomurcuk, ince narin yayılmış kaliks tüyleri, koyu kiremit kırmızısı petaller, koyu siyahımsı lekeler ve brakteli çiçeklerdir. 1600-2200 m arasında nemli yerlerde bulunmaktadır. Genel olarak akarsu kenarlarında, tabandan su çeken ıslak zeminlerde ya da bol miktarda yeşil olan bölgelerde bulunmaktadır. Kurak bölgelerde bitki boyu küçülmektedir. Kuzey Batı İran ve Batı Türkiye de bol miktarda bulunmaktadır. Kromozom sayısı $2n=42$ 'dir (Golldblatt, 1974).

1600-2200 m yükseklikte nemli yerlerde, nemli kayalar arasında ya da küçük akarsu kenarlarında rasgele dağılmış ve *P. orientale* ve *P. bracteatum* gibi kalabalık şeklinde olmayan popülasyonlardır (Golldblatt, 1974).

Çoruh, Erzincan, Erzurum, Muş, Ağrı, van, Niğde, Hakkâri çevresinde dağılım göstermektedir (Golldblatt, 1974).

Bu tez çalışmasının amacı, ülkemizde yayılış gösteren *Papaver* cinsinin önemli türlerinden *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C'de yapılan ısı şoku uygulamaları ile katalaz, peroksidaz ve askorbat peroksidaz enzimlerinin aktivitelerini belirleyerek bitkide antioksidant metabolizmada meydana gelen değişimleri tanımlamak ve ısı şoku stresinin, bitkide sekonder metabolitlerden fenollerin anahtar enzimlerinden biri olan polifenol oksidaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemektir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında, materyal olarak *Papaver* cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait üç tür; *Papaver bracteatum*, *Papaver orientale* ve *Papaver pseudo-orientale* kullanılmıştır. Çalışmamızda, Türkiye’de doğal olarak yetiştikleri lokalitelerden toplanan ve Tokat Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ve Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda korunan tohumlar kullanılmıştır. Otoklavda sterile edilerek saksılara konan toprak karışımına (% 40 torf, % 40 toprak, %20 kum) doğrudan tohum ekimi gerçekleştirilmiştir. Saksılardaki bitkiler, oda sıcaklığında ve 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında tutulmuş ve düzenli olarak sulanmıştır. Üç aylık büyüme periyodu sonunda, saksı içerisindeki fidelere, etüv içerisinde 10 dk ve 30 dk süreyle 40 °C ısı şoku uygulaması yapılmıştır. Isı uygulamasının hemen ardından hasat edilen genç yapraklar sıvı azot ile dondurulmuş ve alüminyum folyolara sarılarak, analizlerin yapılacağı zamana kadar saklanmak üzere -80 °C dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 2.1. Üç aylık büyüme periyodu sonunda, saksı içerisindeki bitkiler

2.2 METOD

2.2.1 Katalaz, Peroksidaz, Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin ve Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Homojenat Hazırlanması

Enzim aktiviteleri ve protein miktarının belirlenebilmesi için 0.25 g yaprak dokusu 2,5 ml 50 mM KH_2PO_4 (pH=7) tamponu içerisinde porselen havanda homojenize edilmiştir. Homojenat, eppendorf tüplerine aktararak +4 °C'de 15000 x g'de 20 dakika süresince santrifüj (Hettich R22-Almanya) edilmiştir. Santrifügasyon sonucunda elde edilen süpernatantlar buzdolabında tutulmuş ve enzim aktivite ölçümlerinde kullanılmıştır.

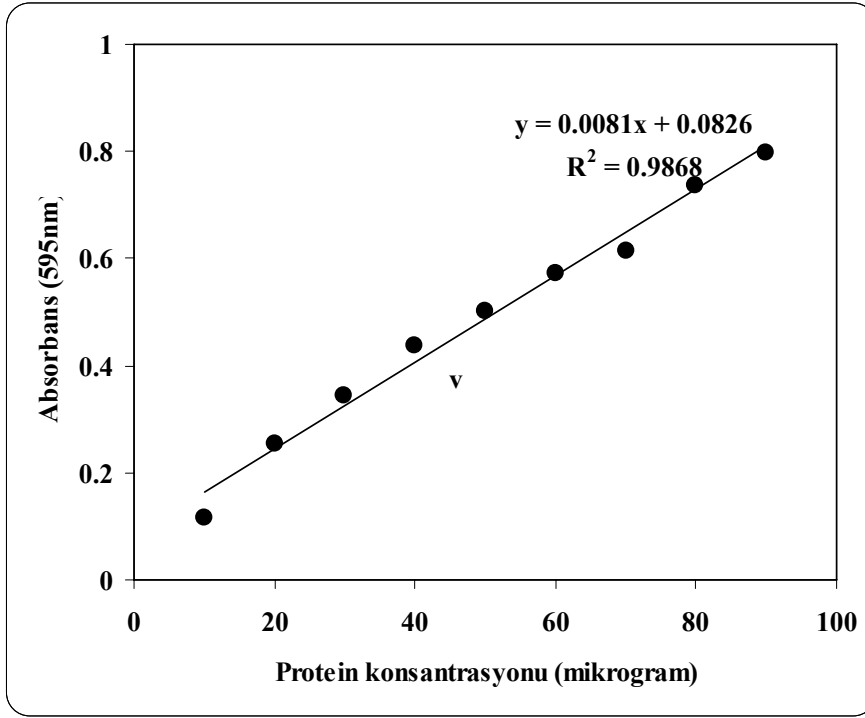
2.2.2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Yapraklardaki protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde kullanılan boya (Coomassie brilliant blue G-250) negatif yüklüdür ve protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanır. Hızlı ve tekrarlanabilir olan bu yöntemde meydana gelen renk, stabilitesini bir saat kadar koruyabilir.

Protein miktarının belirlenebilmesi için 0,25 g yaprak dokusu 2,5 ml 50 mM KH_2PO_4 (pH 7) tamponu içerisinde porselen havanda homojenize edilmiştir. Homojenat eppendorf tüplerine aktararak +4 °C'de 15000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 20 µl alınarak üzerine 2,5 ml Coomassie brilliant blue G-250 ilave edilmiştir. Her bir tüp vorteksenerek 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüplerin 595 nm'deki absorbansları ölçülerek, standart grafik yardımıyla yapraklardaki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik için ilk önce 1ml'sinde 1 mg protein çözeltisi ihtiva eden sıgır serum albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden tüplere sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µl pipetlenmiş ve son hacimler tampon ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpün üzerine 2,5 ml Coomassie brilliant blue G-250 ilave edilip ve vortekste karıştırılarak ve 10 dakikalık

inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbansları ölçülmüş ve her bir protein miktarına karşılık gelen absorbanslara standart grafik hazırlanmıştır.



Şekil 2.2. Protein tayininde kullanılan BSA standart grafiği.

2.2.3 Katalaz (E.C.1.11.1.6) Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Bergmeyer (1970) yöntemine göre belirlenmiştir. Katalaz hidrojen peroksitin (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijen (O_2)'e parçalanmasını katalizleyen bir enzimdir. Aktivite ölçümü ise bu reaksiyon sırasında H_2O_2 'nin su ve oksijene parçalanması sırasında meydana gelen renk açılmasınının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Aktivite ölçümünde 3 ml'lik reaksiyon karışımına, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H_2O_2 ve 30 μ l homojenat konulmuş ve 2 dakika boyunca spektrofotometrede (Jasco V-UV/VIS Spectrophotometer-Japonya) absorbansı ölçülmüştür. Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına düşen absorbans hesaplanmıştır. 240 nm'de, bir dakika içerisinde 1 μ mol H_2O_2 'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı 1 ünite olarak belirlenmiştir. Sonuçlar hesaplanırken bulunan enzim ünitesi miktarları belirlenen protein miktarına oranlanarak spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.4 Peroksidaz (E.C.1.11.1.7) Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Herzog and Fahimi (1973) yöntemine göre belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için aktivite ölçümünde 3 ml'lik reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 22,5 mM H₂O₂, 30 mM guaiacol ve 20 µl enzim ekstraktından oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon aktivite ölçüm ortamına en son olarak enzim çözeltisinin ilave edilmesiyle başlanmıştır ve 470 nm'de 2 dakika boyunca optik dansitesi kaydedilmiştir. Bir enzim ünitesi bir dakikada 1 µmol guaiacol'u katalizleyen enzim miktarı olarak hesaplanmıştır (Demir and Öztürk, 2003). Sonuçlar hesaplanırken bulunan enzim ünitesi miktarları belirlenen protein miktarına oranlanarak spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.5 Askorbat Peroksidaz (EC 1.11.1.11) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Nakano ve Asada (1981) yöntemine göre belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için aktivite ölçümünde 3 ml'lik reaksiyon karışımı 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 10 mM H₂O₂, 2.5 mM askorbik asit ve 100 µl enzim ekstraktından oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon aktivite ölçüm ortamına en son olarak hidrojen peroksitin ilave edilmesiyle başlanmış ve 2 dakika boyunca 290nm'de absorbansı kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹) (Karabal et al., 2003). Sonuçlar hesaplanırken bulunan enzim ünitesi miktarları belirlenen protein miktarına oranlanarak spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.6 Polifenol Oksidaz (EC.1.10.3.1) Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivite ölçümünde, 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 0.42 mM Na₂HPO₄ (pH 6.5) tamponundan 1,45 ml, 50 mM katekol çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra inkübasyon ortamına 50 µl enzim homojenatı ilave edilmiştir. Aktivite ölçümü bir o-fenol olan katekolün oksijen varlığında, kahverengi-sarı renkli kinona dönüşürken meydana gelen renk değişiminin sebep olduğu absorbans artışının 420 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Spektrofotometrede 420 nm'de 2,5 dakika ölçüm sırasında, absorbansın lineer olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25 °C'de bir dakikada absorbansı 0,001 artıran enzim miktarı bir enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar taze ağırlıkta gram yaprak başına enzim ünitesi olarak (EU/g yaprak) belirlenmiştir (Öztürk, 2002). Sonuçlar hesaplanırken bulunan enzim ünitesi miktarları belirlenen protein miktarına oranlanarak spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

2.2.7 İstatistik Analiz

Denemeler, üç tekrarlı iki set şeklinde yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiki analizleri, SPSS for Windows 11.0 Standard Version istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre $p < 0,05$ önemlilik değerinde yapılmış ve bu farklılıklar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile analiz edilmiştir (Duncan, 1955).

3. BULGULAR

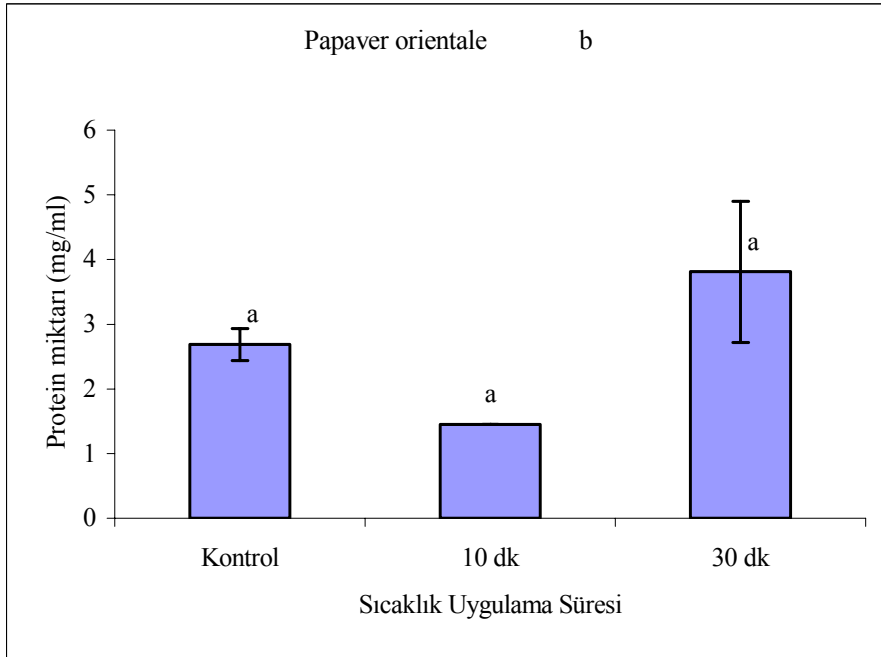
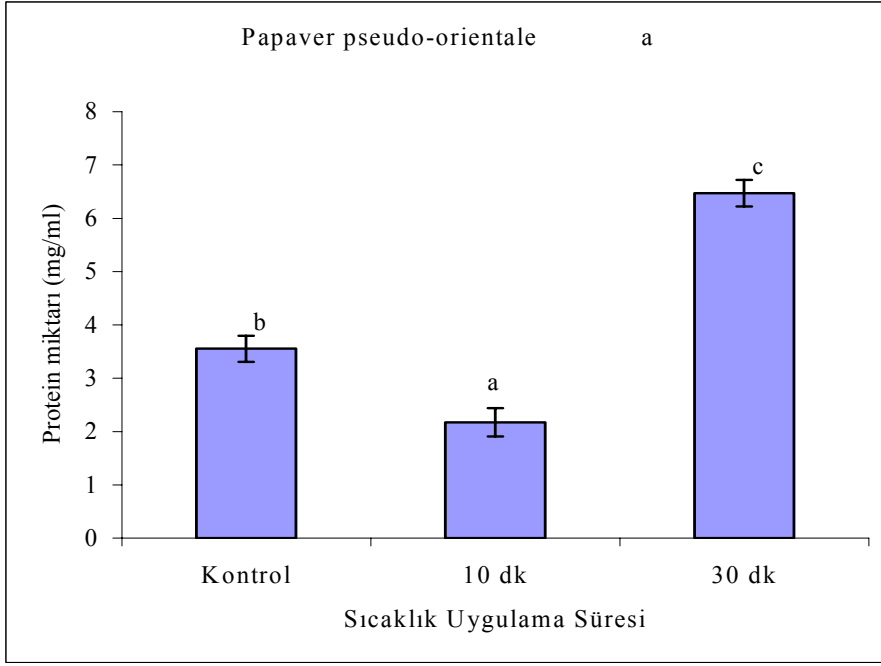
3.1 Isı Şoku Uygulamalarının Protein Miktarı Üzerine Etkisi

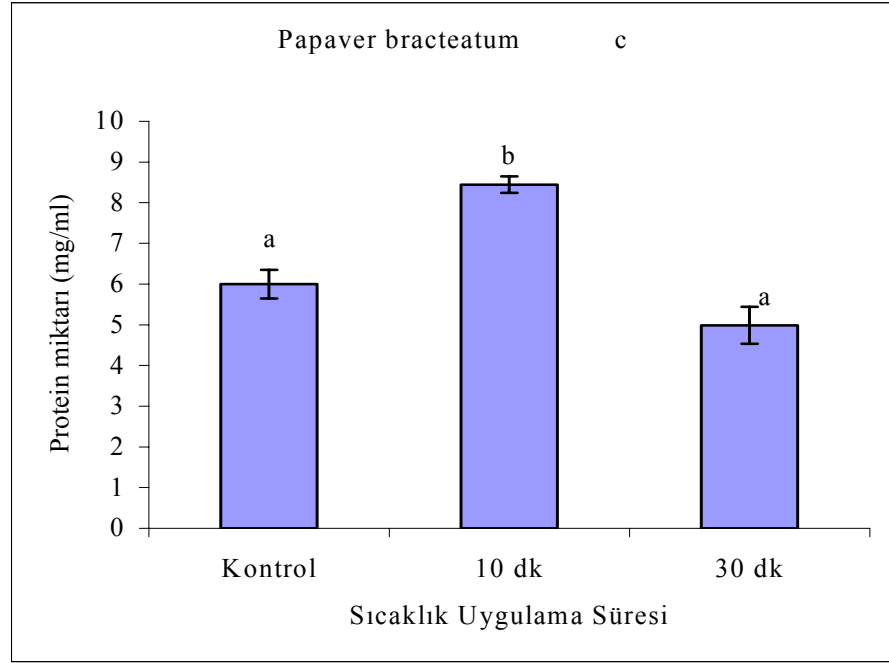
Çalışmamızda, *Papaver* cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C’de yapılan ısı şoku uygulamalarının toplam protein miktarı üzerindeki etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Tablo 3.1 ve Şekil 3.1 a, b ve c’de gösterilmiştir. Uzun süreli sıcaklık uygulaması *Papaver pseudo-orientale* ve *Papaver orientale* bitkisinde protein miktarını artmasına neden olmuştur. *Papaver bracteatum*’da ise protein miktarı kısa süreli uygulamada artmıştır.

Protein miktarı, *Papaver pseudo-orientale* bitkisine 40°C’de 10 dk sıcaklık uygulamasında kontrole göre % 40 oranında azalmış, 30 dk uygulamasında ise % 82,2 oranında artmış ve protein miktarındaki bu değişimler istatistik olarak $p < 0,05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. *Papaver orientale* bitkisinde 10 dk sıcaklık uygulamasında kontrole göre % 54,1 oranında azalma ve 30 dk sıcaklık uygulamasında % 42.1 oranında artış belirlenmesine karşın bu değerler kontrol ile uygulamalar arasında önemli fark oluşturmamıştır. *Papaver bracteatum* bitkisinde 10 dk sıcaklık uygulamasında % 40,9 belirlenen artış önemli bulunurken, 30 dk sıcaklık uygulamasında belirlenen % 20,4 oranında azalma kontrole göre istatistik anlamda farklı bulunmamıştır.

Tablo 3.1. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum*, türlerinin 3 aylık fidelerinde toplam protein miktarı (mg/ml) üzerine etkisi.

	Uygulamalar	<i>Papaver pseudo-orientale</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Papaver bracteatum</i>
Protein miktarı (mg/ml)	Kontrol	3.5515 b	2.6850 a	5.9970 a
	10 dk 40°C	2.1735 a	1.4500 a	8.4435 b
	30 dk 40°C	6.4705 c	3.8100 a	4.9900 a





Şekil 3.1. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c), türlerinin 3 aylık fidelerinde toplam protein miktarı (mg/ml) üzerine etkisi.

3.2 Isı Şoku Uygulamalarının Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

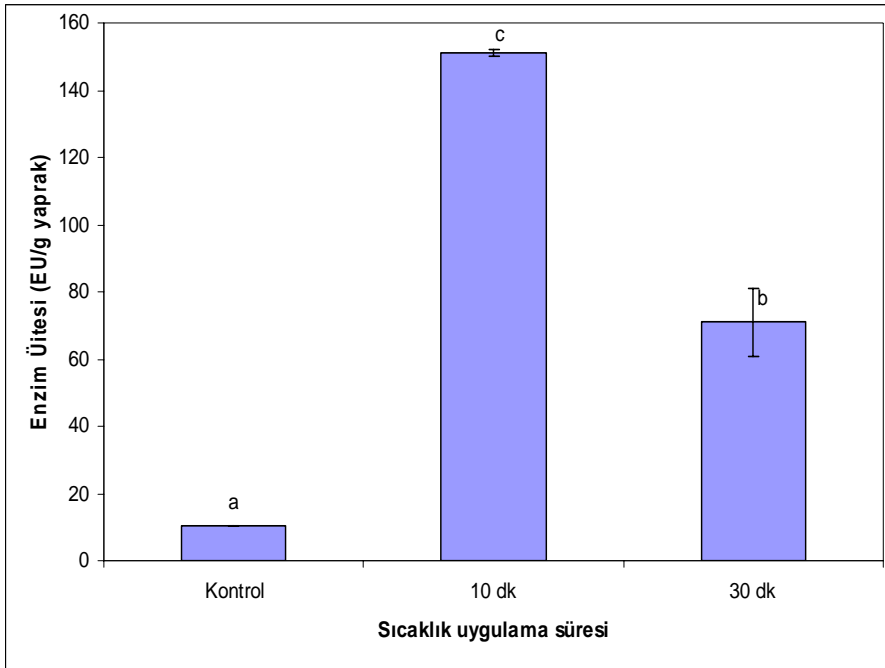
Çalışmamızda, *Papaver* cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C'de yapılan ısı şoku uygulamalarının katalaz (Cat) aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Tablo 3.2. ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi; *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* da 10 dk ısı şoku uygulaması kontrole göre enzim miktarını önemli ölçüde artırırken ($p < 0.05$), 30 dk uygulaması kontrole göre yüksek olmakla birlikte 10 dk uygulamasından daha düşük düzeyde kalmıştır.

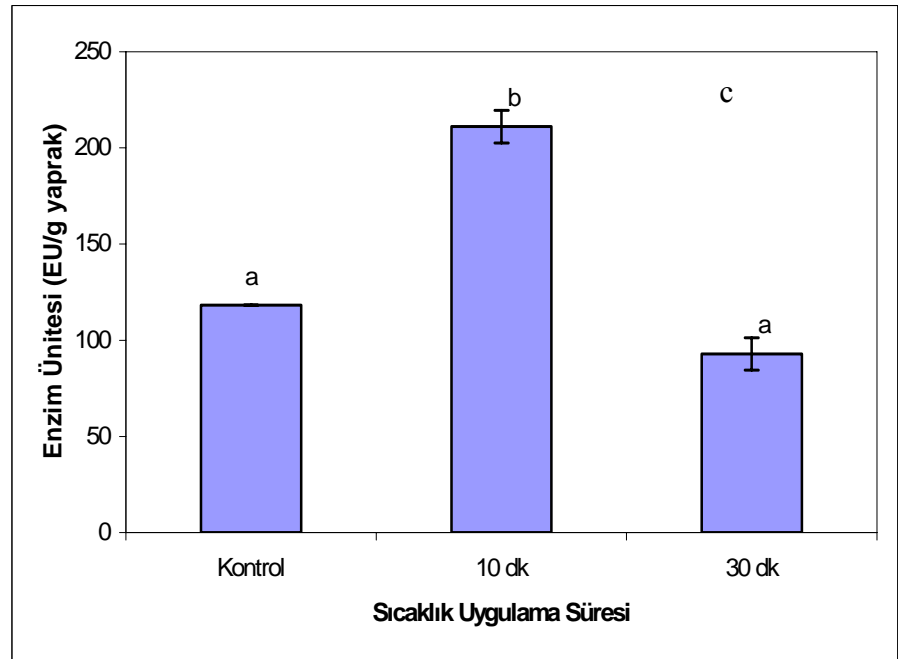
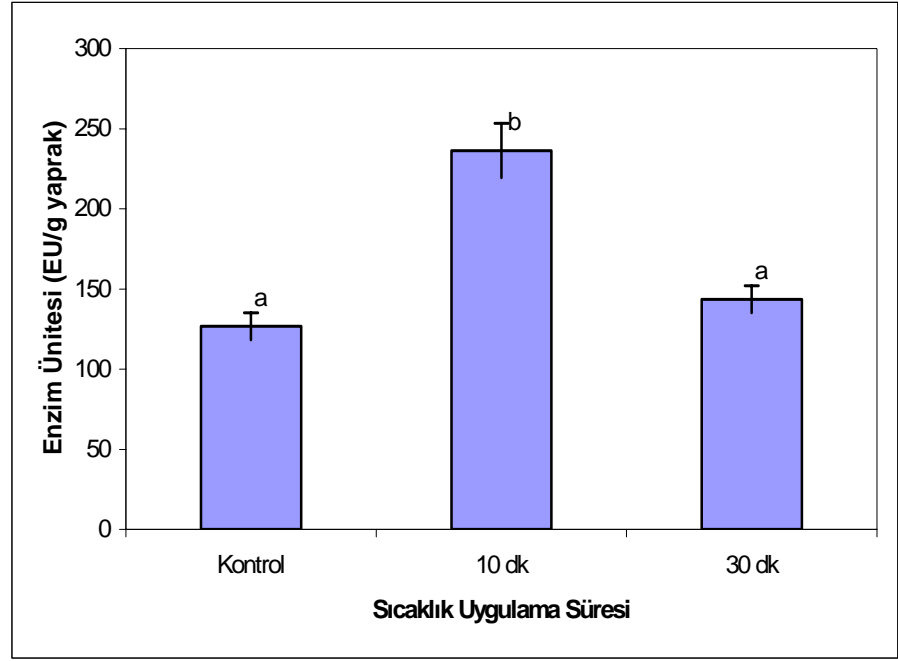
Papaver pseudo-orientale bitkisinde 40 °C'de 10 dk sıcaklık uygulamasında Cat aktivitesi kontrole göre 15 kat artış gösterirken, 30 dk uygulamasında 7 kat artmıştır. *Papaver orientale* 'de 40°C 10 dk uygulaması, Cat aktivitesi kontrole göre % 87,3 oranında, *Papaver brekteatum* fidelerinde ise % 78,8 oranında

$p < 0,05$ düzeyinde önemli artışa neden olmuştur. Bununla birlikte her iki türde de fidelere 30 dk sıcaklık uygulaması kontrole göre önemli fark oluşturmamıştır.

Tablo 3.2. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

Uygulamalar		<i>Papaver pseudo-orientale</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Papaver bracteatum</i>
Katalaz aktivitesi (EU/g)	Kontrol	10.1410 a	126.6400 a	118.2030 a
	10 dk 40°C	151.1135 c	236.4050 b	211.0770 b
	30 dk 40°C	70.9925 b	143.5250 a	92.8735 a





Şekil 3.2. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

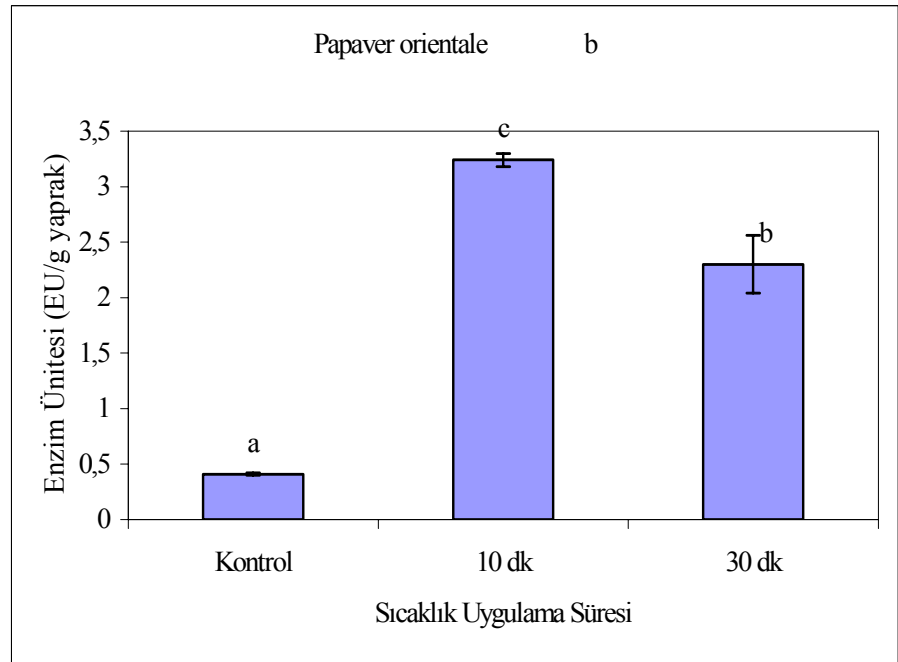
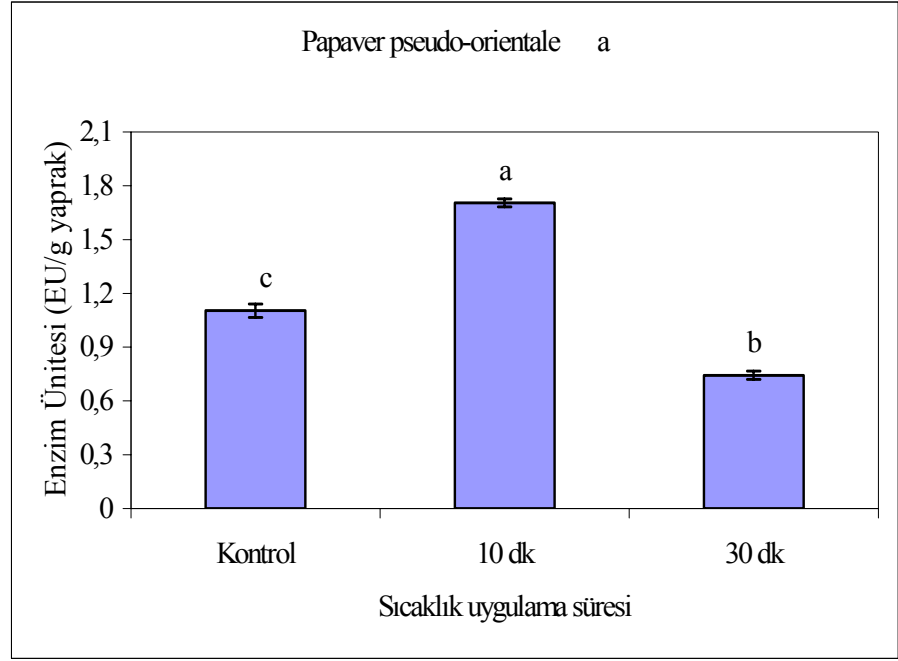
3.3 Isı Şoku Uygulamalarının Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

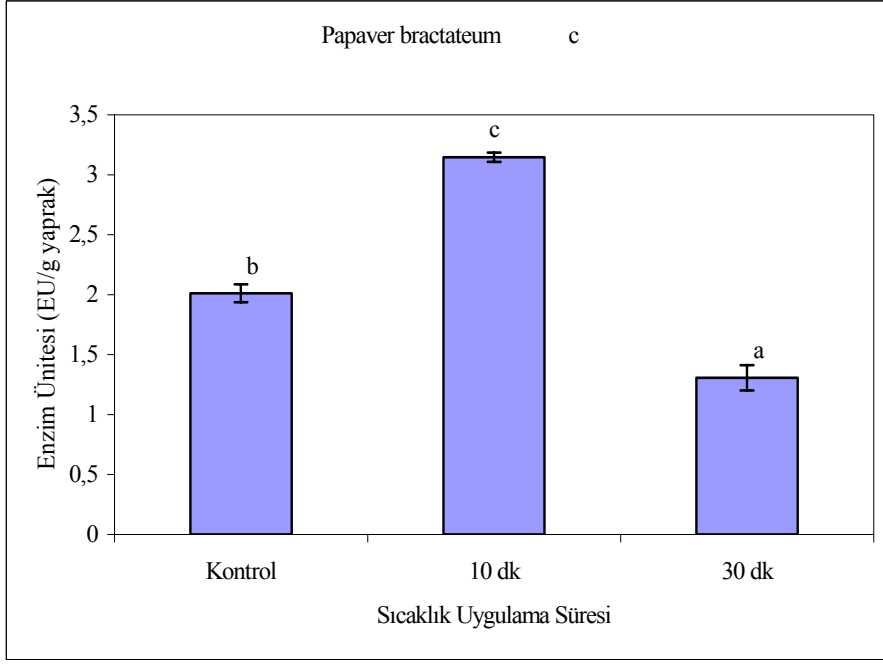
Papaver cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C’de yapılan ısı şoku uygulamalarının peroksidaz (Pod) aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Tablo 3.3. ve Şekil 3.3 a,b ve c’de gösterilmiştir.

Isı şoku uygulamasına bağlı olarak peroksidaz aktivitesi, katalaz enzimine benzer şekilde; *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* da 10 dk sıcaklık uygulaması durumunda kontrole göre önemli oranda bir artış göstermiştir. Ancak 3 türde de 30 dk uygulamada önemli ($p<0,05$) derecede düşüş gözlenmiştir. *Papaver pseudo-orientale* bitkisinde 40°C’de 10 dk sıcaklık uygulamasında Pod aktivitesi kontrole göre % 54,5 oranında artarken, 30 dk uygulamasında % 48,6 oranında azalmıştır. *Papaver orientale* bitkisinde 10 dk sıcaklık uygulamasında kontrole göre 7.9 kat artış, 30 dk sıcaklık uygulamasında ise 5.6 kat artış tespit edilmiştir. *Papaver brekteatum* bitkisinde ise 10 dk sıcaklık uygulamasında % 56,2 oranında artış, 30 dk sıcaklık uygulamasında % 65 oranında azalma olduğu gözlenmiştir.

Tablo 3.3. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde peroksidaz (Podt) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

Uygulamalar		<i>Papaver pseudo-orientale</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Papaver bracteatum</i>
Peroksidaz aktivitesi (EU/g)	Kontrol	1.1035 b	0.4100 a	2.0120 b
	10 dk 40°C	1.7045 c	3.2400 c	3.1465 c
	30 dk 40°C	0.7430 a	2.3000 b	1.3060 a





Şekil 3.3. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde katalaz (Cat) aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

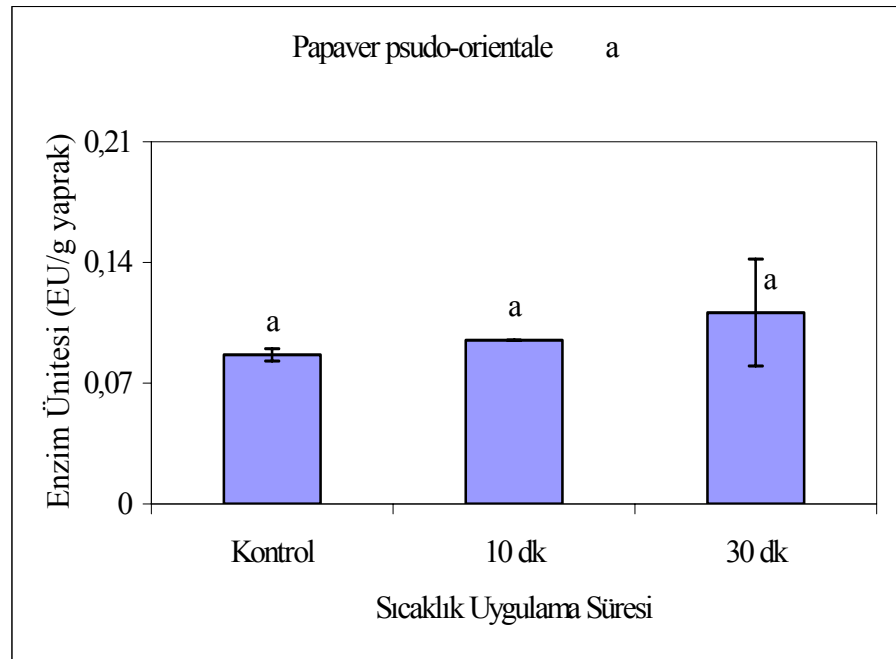
3.4 Isı Şoku Uygulamalarının Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

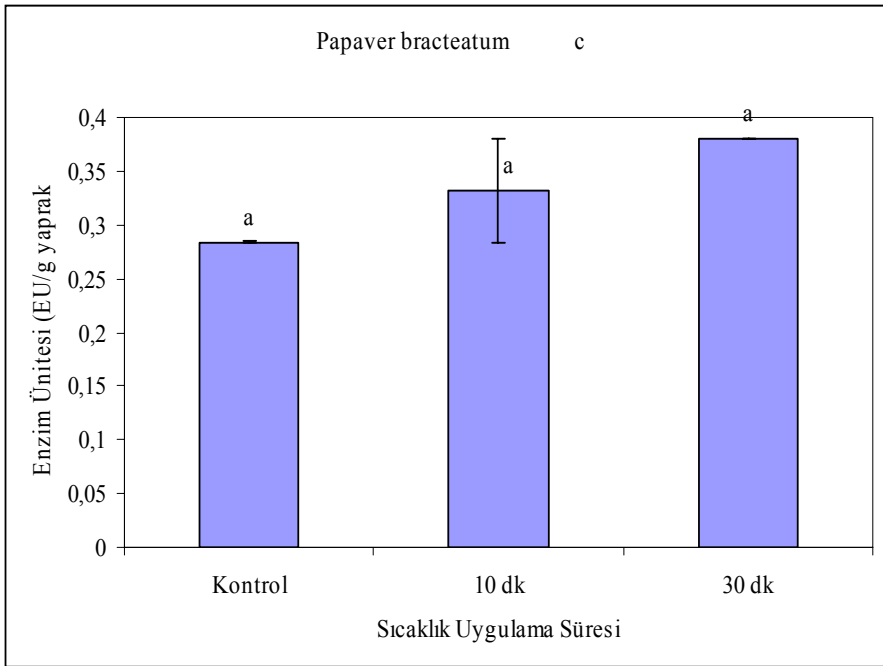
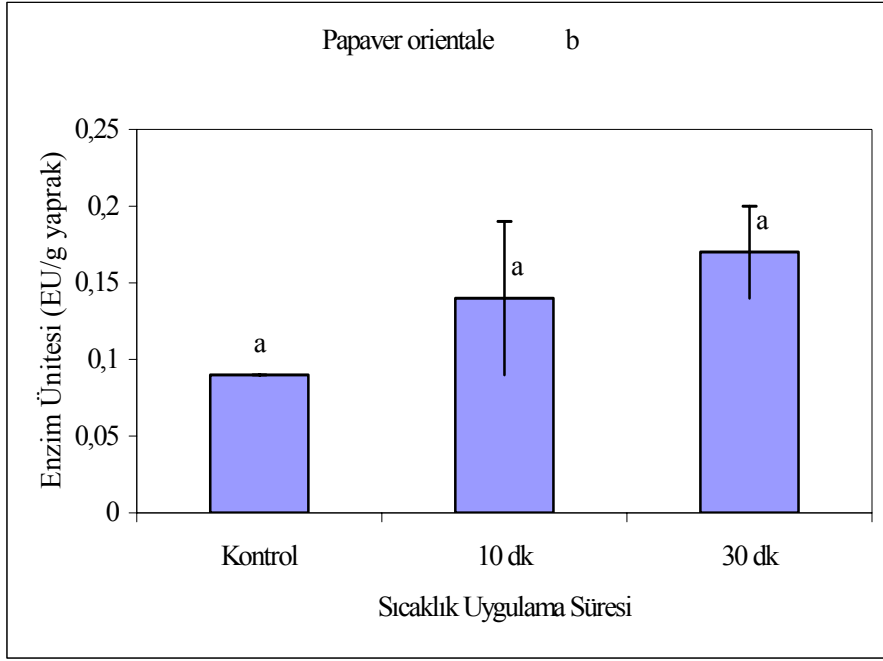
Papaver cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C’de yapılan ısı şoku uygulamalarının askorbat peroksidaz (Apx) aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Tablo 3.4. ve Şekil 3.4 a,b ve c’de gösterilmiştir.

Sıcaklık uygulamasına bağlı olarak askorbat peroksidaz aktivitesi; *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum*’da 10 ve 30 dk sıcaklık uygulamalarında kontrolle kıyaslandığında artış göstermiştir. Ancak bu artış, istatistiki anlamda önemli bulunmamıştır. Her üç türe ait fidelerde kısa ve nisbeten uzun ısı şoku uygulamasının askorbat peroksidaz aktivitesi üzerinde benzer tepkiye neden olduğu ve aktivitenin stabil kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 3.4. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

Uygulamalar		<i>Papaver pseudo-orientale</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Papaver bracteatum</i>
Askorbat peroksidaz aktivitesi (EU/g yaprak)	Kontrol	0.0865 a	0.0900 a	0.2840 a
	10 dk 40°C	0.0950 a	.1400 a	0.3315 a
	30 dk 40°C	0.1110 a	0.1700 a	0.3800 a





Şekil 3.4. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

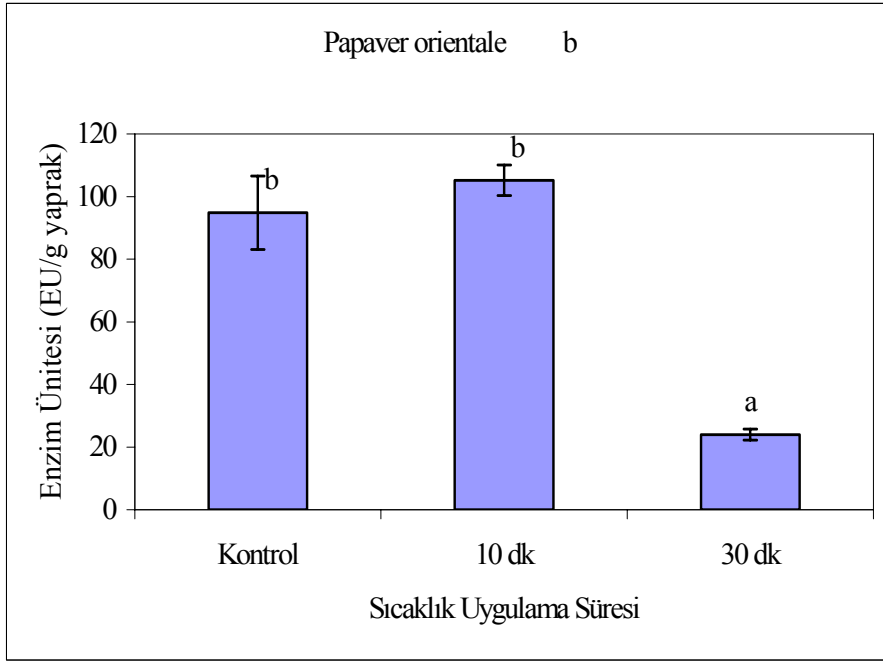
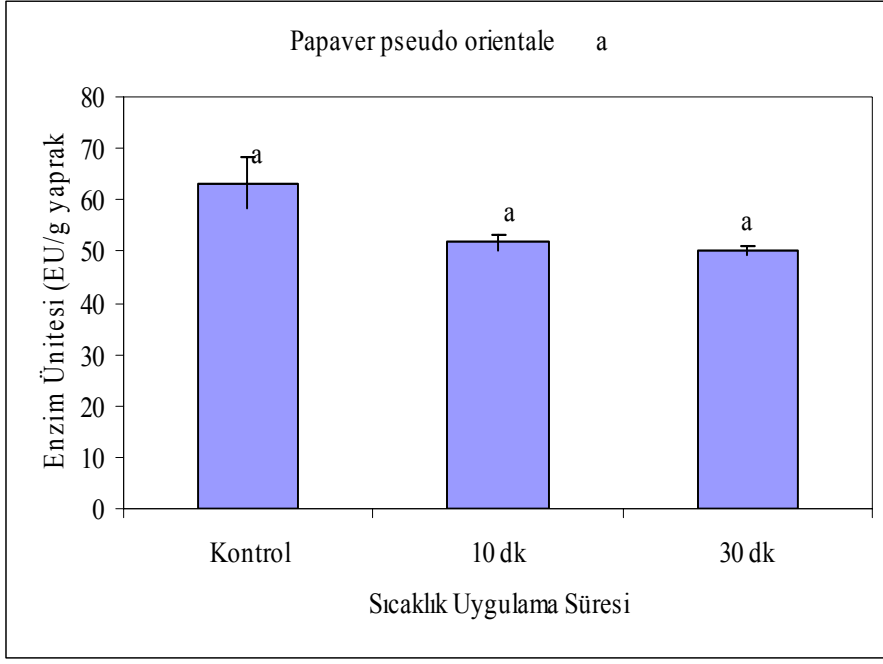
3.5 Isı Şoku Uygulamalarının Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

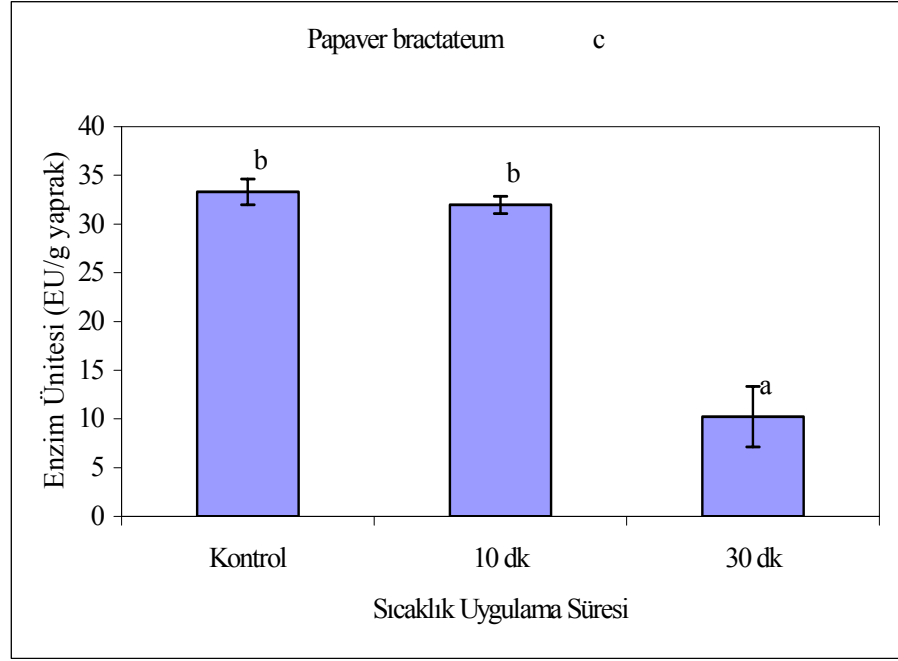
Çalışmamızda, *Papaver* cinsi, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C’de yapılan ısı şoku uygulamalarının polifenol oksidaz (Pfo) aktivitesi üzerindeki etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgular Tablo 3.5. ve Şekil 3.5 a,b ve c’de gösterilmiştir.

Isı şoku uygulamaları, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* bitkilerinde polifenol oksidaz aktivitesinde farklı şekilde etkili olmuştur. *Papaver pseudo-orientale* bitkisinde 40°C’de 10 dk sıcaklık uygulamasında Pfo aktivitesinde kontrole göre % 22,2 oranında azalma, 30 dk uygulamasında ise % 19,3 oranında azalma belirlenmesine karşın bu değerler istatistiksel olarak kontrole göre önemli fark oluşturmamıştır. Kısa süreli sıcaklık uygulaması yalnız *Papaver orientale*’de Pfo aktivitesini artırmıştır (% 10,5). Ancak çalışılan bitkilerin hepsinde uzun süreli sıcaklık uygulaması Pfo aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. Pfo aktivitesindeki azalma *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinde istatistik olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. *Papaver orientale* bitkisinde 30 dk sıcaklık uygulamasında % 74,8 oranında azalma, *Papaver bracteatum* ise 10 dk sıcaklık uygulamasında % 4,3 oranında, 30 dk sıcaklık uygulamasında ise % 69,6 oranında azalma tespit edilmiştir.

Tablo 3.5. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde polifenol oksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

Uygulamalar		<i>Papaver pseudo-orientale</i>	<i>Papaver orientale</i>	<i>Papaver bracteatum</i>
Polifenol oksidaz aktivitesi (EU/g)	Kontrol	63.2700 a	94.7900 b	33.3000 b
	10 dk 40°C	51.7260 a	105.2250 b	31.9680 b
	30 dk 40°C	50.0750 a	23.9750 a	10.2120 a





Şekil 3.5. 10 dk. ve 30 dk. ısı şoku uygulamasının, *Papaver pseudo-orientale* (a), *Papaver orientale* (b) ve *Papaver bracteatum* (c) türlerinin 3 aylık fidelerinde polifenol oksidaz aktivitesi (EU/g yaprak) üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Bitkiler, günlük veya mevsimsel olarak geniş çapta sıcaklık dalgalanmalarına maruz kalmaktadırlar. Bitkilerin bu değişken sıcaklıklarda hücrel aktivitelelerini sürdürmelerini mümkün kılan mekanizmalar henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Patterson ve Graham, 1987). Bitkilerin canlı kalabildiği üst sınır, ılıman bölge bitkileri için, ve sıcaklığa maruz kalma süresine bağlı olmak koşuluyla, 40 °C ila 55 °C arasında değişmekte (Klueva vd., 2001) ve bu sınır, bitkilerin dağılımını ve tarımsal amaçlı kullanımlarını da etkilemektedir.

Ilıman bölge bitkileri akut sıcaklık stresi sırasında hayatta kalmalarını sağlayan indüklenebilir termotolerans özelliğine sahiptir. Yüksek sıcaklıkların neden olduğu sıcaklık stresinde ortaya çıkan ve bitkinin kısa süreli sıcaklıklara maruz kalmasıyla tetiklenen yüksek sıcaklık toleransı yani “kazanılmış termotolerans” (Kotak et al. 2007) kapsamında yer alan metabolik süreçler ısı şoku proteinleri yanı sıra antioksidant metabolizmanın da bileşenlerini içermektedir. Laboratuvar koşullarında bitkilere termotolerans kazandırılması, kısa süreli ön sıcaklık uygulamalarıyla (2 saat veya daha az) öldürücü sıcaklıklara yakın sıcaklıklarda sağlanabilmektedir (Hong & Vierling, 2000).

Ülkemizde yayılış gösteren Papaver cinsinin önemli türlerinden *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C’de yapılan ısı şoku uygulamaları ile bitkide oluşturulan kazanılmış termotolerans parametreleri oksidatif ve antioksidant metabolizma açısından araştırılmıştır.

Bitkilerdeki önemli reaktif oksijen türlerini yok etme mekanizmaları, süperoksit dizmutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidant enzimleri içermektedir. SOD ve APX veya CAT aktiviteleri arasındaki denge, süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksidin kontrol edilmesi için çok önemlidir. Bitkide CAT, POD ve APX gibi enzimlerin yakın ilişkisi vardır. Sıcaklık stresinin bitkilerde sekonder oksidatif hasar oluşturduğu bilinmektedir (Larkindale & Knight, 2002). Hücrenin antioksidant kapasitesini değiştiren kimyasallarla ön uygulama yapılması da bitkilerin sonraki sıcaklık

stresini tolere etme yeteneğini etkilediği bildirilmiştir (Dat et al., 1998a, 1998b; Gong et al., 1998). Buna göre bitkiye farklı derecelerde sıcaklık uygulaması bitkiyi strese sokar ve enzim aktivitelerini etkiler. Bu çalışmada da çalışılan 3 türe ait 10 dk sıcaklık uygulamaları kontrole göre CAT ve aktivitelerini önemli ölçüde artırırken ($p < 0.05$), 30 dk uygulaması 10 dk uygulamasından daha düşük düzeyde kalmıştır (Tablo 3.2. ve Şekil 3.2). Sıcaklık uygulamaları CAT aktivitesini önemli ölçüde tetiklemiştir. Katalaz aktivitesi, kısa süreli ısı şoku uygulaması ile en fazla olarak, nemli ve taban suyu bulunan ortamlarda yayılış gösteren *Papaver pseudo-orientale* türünde, bunu takiben de *Papaver orientale* türünde indüklenmiştir. Diğer türlere göre nispeten daha kuru ve açık alanlarda yayılış gösteren *Papaver bracteatum* türünde ise artış oranı daha düşük gerçekleşmiş ve 30 dk ısı şoku ise kontrole göre fark oluşturmamıştır.

Isı şokunu takiben bazı kilit antioksidant enzimlerin (süperoksit dismutaz ve katalaz) aktivitelerinde azalma olduğunu bildiren çok sayıda yayın vardır. Isı şokunun antioksidant savunma mekanizmalarını bozduğu ve oksidan konsantrasyonlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Matters and Scandalios, 1986; Feierabend et al., 1992; Streb et al., 1993; Willekens et al., 1995; Foyer et al., 1997; Polle, 1997). Isı şokunun yeni enzim sentezini engellediği ve katalazın inaktivasyonunu artırdığını bildiren raporlar (Hertwig et al., 1992; Feierabend and Dehne, 1996), elde ettiğimiz bulgularla örtüşmemektedir. Buna karşın bulgularımız bitki antioksidant sisteminin bir parçası olan katalaz ve peroksidazların, sıcaklığın neden olduğu oksidatif strese tepki olarak hızlı bir şekilde aktive edildiğini bildiren verilerle uyumludur (Mathew and Morimoto, 1998; Mathew et al., 1998).

Kısa süreli sıcaklık uygulamaları POD aktivitesini artırırken, uzun süreli sıcaklık uygulaması POD aktivitesinin azalmasına neden olmuştur (Tablo 3.3. ve Şekil 3.3). Bu veriler, peroksidazların sıcaklığın neden olduğu oksidatif strese tepki olarak hızlı aktive edildiğini (Mathew and Morimoto, 1998; Mathew et al., 1998) ve mısır bitkisinde sıcaklık stresi altında CAT ve POD aktivitesinin arttığını bildiren raporlarla bağdaşmaktadır (Gong et al., 1998). Her üç türde 10 dakika ısı şoku uygulanması ile meydana gelen total çözülebilir protein artışı (3.1 ve Şekil 3.1), ısı şoku stres tepkisinin ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla hücrel

olarak proteomların yıkım ve kontrolünün düzenlenmesi ile ilişkili görünmektedir (Mathew and Morimoto, 1998; Mathew et al., 1998).

Çalışılan 3 türde de gerek 10 dk gerekse 30 dk ısı şoku uygulamaları APX aktivitesinde kontrole göre önemli farklılık ortaya koymamıştır (Tablo 3.4. ve Şekil 3.4). Kontrolde en yüksek APX oranları yine diğer 2 türe göre nispeten daha kuru ve açık alanlarda yayılış gösteren *Papaver bracteatum* türünde belirlenmiştir. Panchuk et al. (2002), akut sıcaklık stresine tepki olarak APX aktivitesinin azaldığını bildirmiştir. Yang Ju vd., (2009) tüm hatlarda ısı stresine tepki olarak benzer şekilde APX aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Çalışılan türlerde APX aktivitesindeki stabilite katalaz aktivitesindeki çarpıcı indüklenme ile bağlantılı olabilir. APX üretimi baskılanmış bitkilerin SOD, CAT ve GR üretiminin, APX üretimindeki kaybı karşılamak amacıyla indüklendiği ve CAT üretimi baskılanmış bitkilerde ise, APX, GPX indüklendiği bildirilmiştir (Larkindale & Huang, 2004).

30 dk ısı şoku uygulanan *Papaver pseudo-orientale* türünde polifenol oksidaz aktivitesi önemli oranda artmasına rağmen diğer türlerde önemli azalmaya neden olmuştur (Tablo 3.5. ve Şekil 3.5). *Papaver pseudo-orientale* türü diğer 2 türe göre en fazla nemli bölgelerde yayılış gösteren dolayısıyla stres koşullarına en duyarlı türdür. Polifenol oksidaz ile son yapılan çalışmalar bu enzimin sekonder metabolitlerde fenilpropanoid yolunun anahtar enzimlerinden birisi olması yanı sıra biyotik ve abiyotik stres koşullarında önemli rol oynadığını göstermektedir. Polifenol oksidaz enzimi baskılanan transgenik domates bitkileri ile yapılan çalışmalarda su stresinin oksidatif zararlarından korunmada ve fotoinhibisyon ve fotooksidatif hasar oluşumunda iyileşme görüldüğü belirlenmiştir (Thipyapong et al., 2007).

Bu tez çalışmasında, ülkemizde yayılış gösteren *Papaver* cinsinin önemli türlerinden *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum* türlerinin 3 aylık fidelerinde 10 ve 30 dakika 40 °C'de yapılan ısı şoku uygulamaları ile ilişkili olarak katalaz aktivitesinin çarpıcı biçimde arttığı belirlenmiştir. Buna karşın, bitkisel materyalimizdeki katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin 10 dk ve 30 dk sıcaklık uygulamalarından farklı şekilde etkilendiği, askorbat peroksidaz aktivitelerinde ise bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Sonuç

olarak, bu üç tür içinde sıcaklık stresiyle ilişkili olarak, antioksidant enzim metabolizmasında katalazın etkin olduğu ve *Papaver pseudo-orientale* türünde belirlediğimiz polifoenol oksidaz aktivitesindeki artış nedeniyle, bu bitkinin, ısı şoku uygulamasının sekonder sonucu olarak daha fazla oksidatif strese maruz kaldığı ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S. & Grover, A.** 2002, Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. *Plant Science*, 163, 397–405.
- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D. R. & Grover, A.** 2001, *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress & Chaperones*, 6, 219–224.
- Alvim, F. C., Carolin, S. M., Cascarado, J. C., Nunes, C. C., Martinez, C. A., Otoni, W. C. & Fontes, E. P.** 2001, Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 126, 1042–1054.
- Asada, K.** 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Atalay I.** Turkey Vegetation Geography. Ege University Press, Izmir, 1994.
- Bergmeyer N. In:** Methoden der enzymatischen Analyse 1, Akademie Verlag, Berlin (1970), pp. 636–647.
- Bernacchi, C. J., Portis, A. R., Nakano, H., von Caemmerer, S. & 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*, 130(4), 1992–1998.
- Blum, A.** 1986, Breeding crop varieties for stress environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-237.
- Boissier, E.** 1867-1888. *Flora Orientalis*. 6 vols. H. Georg, GenJ ve.
- Boissier, E.** 1888. *Flora Orientalis Supplementum*. R. Buser, Geneva, Basel, Lyon.

- Borrelli, M. J., Stafford, D. M., Karczewski, L. A., Rausch, C. M., Lee, Y. J. & Corry, P. M.** 1996, Thermotolerance expression in mitotic CHO cells without increased translation of heat shock proteins. *Journal of Cell Physiology*, 169(3), 420–428.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V. & Vierling, E.** 1996, Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 32(1–2), 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. *Anal. Biochem.* 72 (1976), pp. 248–254.
- Chen, Q., Lauzon, L. M., DeRocher, A. E. & Vierling, E.** 1990, Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *Journal of Cell Biology*, 110, 1873–1883.
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. and Bähler, J.** 2003, Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* 14, 213 -229.
- Commuri, P. D. & Jones, R. J.** 2001, High temperatures during endosperm cell division in maize: a genotypic comparison under in vitro and field conditions. *Crop Science*, 41, 1122–1130.
- Cross, R. H., McKay, S. A. B., McHughen, A. G. & Bonham-Smith, P. C.** 2003, Heat-stress effects on reproduction and seed set in *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant Cell and Environment*, 26, 1013–1020.
- Cullen, J.**, 1965. *Papaver* L., Ref.: Davis, P.H. (ed.): *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 1; 219–236, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Çelik S.** *Centaurea* L. Cinsi *psephelloidea* (Boiss) sosn. seksiyonuna ait türlerin ekolojik özellikleri. Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2003.

- Dat, J. F., Foyer, C. H. & Scott, I. M.** 1998, Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 118(4), 1455–1461.
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H. & Scott, I. M.** 1998, Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116(4), 1351–1357.
- Davis PH, Mill RR, Tan K.** *Flora of Turkey and the East Aegean Islands.* Edinburg Univ. Press, Edinburg, 1988.
- Deaton, J., Sun, J., Holzenburg, A., Struck, D. K., Berry, J. & Young, R.** 2004, Functional bacteriorhodopsin is efficiently solubilized and delivered to membranes by the chaperonin GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2281–2286.
- Demir, Y., Öztürk, L.,** 2003. Influence of ethephon and 2,5-norbornadiene on antioxidative enzymes and proline content in salt-stressed spinach leaves. *Biologia Plantarum*, 47 (4) 609-612.
- DeRocher, A. E., Helm, K. W., Lauzon, L. M. & Vierling, E.** 1991, Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiology*, 96, 1038–1047.
- Duncan, B. D.,** 1955. Multiple Range and Multiple F-tests. *Biometrics*. P.1-42.
- Fedde, F.** 1909. *Papaver L.* Ref.: Engler, A.: *Das Pflanzenreich*, 40 (IV,104); 288-344, Weinheim.
- Feierabend J, Dehne, S.** 1996, Fate of the porphyrin cofactors during the light-dependent turnover of catalase and of the photosystem II reaction-center protein D1 in mature rye leaves. *Planta* 198: 413–422.

- Feierabend J, Schaan C, Hertwig B.** 1992, Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*;100:1554–1561.
- Fernie AR, Geigenberger P, Stitt M.** 2005, Flux an important, but neglected, component of functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* 8: 174–182.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM.** 1997, Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100: 241–254.
- Giese, K. & Vierling, E.** 2002, Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46310–46318.
- Goldblatt P.** Biosystematic studies in *Papaver* section *Oxytona*. *Annals Miss Bot Garden* 61: 264-296, 1974.
- Gong, M., Li, Y. J. & Chen, S. Z.** 1998, Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Journal of Plant Physiology*, 153(3–4), 488–496.
- Guy CL.** 1990, Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 187–223.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C.** (eds). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. v: 11. Edinburgh: Edinburgh University Press. 2000.
- Hall, A. E.** 2001, *Crop Responses to the Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hershko, D. D., Robb, B. W., Luo, G. J., Paxton, J. H. & Hasselgren, P. O.** 2003, Interleukin-6 induces thermotolerance in cultured Caco-2 cells independent of the heat shock response. *Cytokine*, 21(1), 1–9.

- Hertwig B, Streb P, Feierabend J.** 1992, Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* 100: 1547–1553.
- Herzog V. and H. Fahimi,** Determination of the activity of peroxidase. *Anal. Biochem.* **55** (1973), pp. 554–562.
- Hill, J. E. & Hemmingsen, S. M.** 2001, *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress & Chaperones*, 6, 190–200.
- Hong, S.W. & Vierling, E.** 2000, Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4392–4397.
- Hong, S. W. & Vierling, E.** 2001, Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant Journal*, 27, 25–35.
- Hong, S. W., Lee, U. & Vierling, E.** 2003, *Arabidopsis* hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiology*, 132(2), 757–767.
- Hurkman, W. J., McCue, K. F., Altenbach, S. B., Korn, A., Tanaka, C. K., Kotathari, K. M., Johnson, E. L., Bechtel, D. B., Wilson, J. D., Anderson, O. D. & DuPont, F. M.** 2003, Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. *Plant Science*, 164, 873–881.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Nakai, M. & Asahi, T.** 2003, Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the *Arabidopsis* lesion initiation 1 mutant. *Plant and Cell Physiology*, 44(3), 255–261.
- Jemal F, Didier-jean L, Ghrir R, Ghorbal MH, Burkard G.** 1998, Characterization of cadmium binding peptides from pepper (*Capsicum*

annum). Plant Sci. 137, 143–154 Jenks, Matthew A. & Hasegawa. 2005, Plant Abiotic Stress. Oxford: Blackwell, 102.

Jiang, Y. & Huang, B. 2001, Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. Journal of Experimental Botany, 52(355), 341–349.

Kadereit, J.W. 1993. *Papaveraceae*. The families and genera of vascular plants, eds. Vol. II. pp. 20–33. K. Kubitzki, J.G. Rohwer, and V. Bittrich. Heidelberg: Springer-Verlag.

Karabal, E., M. Yücel, H. A. Öktem, 2003, Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity, Plant Science, 164, 925-933.

Kapoor LD. Opium Poppy: botany, chemistry and pharmacology. Food Products Press, New York, 1997.

Keeler, S. J., Boettger, C. M., Haynes, J. G., Kuches, K. A., Johnson, M. M., Thureen, D. L., Keeler, C. L. & Kitto, S. L. 2000, Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. Plant Physiology, 123, 1121–1132.

Kim, S. Y., Hong, C. B. & Lee, I. 2001, Heat shock causes stage-specific male sterility in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Research, 114, 301–307.

Klueva, N. Y., Maestri, E., Marmioli, N. & 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, New York, 177–217.

Kobata, T. & Uemuki, N. 2004, High temperatures during the grain-filling period do not reduce the potential grain dry matter increase of rice. Agronomy Journal, 96, 406–414.

- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD.** 2007, Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10: 310–316.
- Krishna, P. & Gloor, G.** 2001, The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones* 6, 238–246.
- Kubien DS, von Caemmerer S, Furbank RT, Sage RF.** 2003, C4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of rubisco. *Plant Physiol* 132: 1577–1585.
- Külz D.** 2003, Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, 206, 3119–3124.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E.** 2005, Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138: 882–888.
- Larkindale, J. & Huang, B.** 2004, Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology*, 161(4), 405–413.
- Larkindale, J. & Knight, M. R.** 2002, Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology*, 128(2), 682–695.
- Lee, J. H. & 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*. *Molecular and General Genetics*, 252(1–2), 11–19.

- Lee, S. M. & Park, J. W.** 1998, Thermosensitive phenotype of yeast mutant lacking thioredoxin peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 359(1), 99–106.
- Levitt J.** 1972, *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press, New York.
- Lin, B.-L., Wang, J.-S., Liu, H.-C., Chen, R.-W., Meyer, Y., Bakarat, A. & Delseny, M.** 2001, Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, 6, 201–208.
- Lin CY, Roberts JK, Key JL.** 1984, Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol* 74: 152–160.
- Mahan, J. R., McMichael, B. L. & Wanjura, D. F.** 1995, Methods for reducing the adverse effects of temperature stress on plants: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 35, 251–258.
- Martinez, M.V., and Whitaker, J.R.,** 1995. The Biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Tech.*, (12), 195-200.
- Mathew A, Mathur SK, Morimoto RI.** 1998, Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin–proteasome pathway. *Molecular and Cellular Biology* 18: 5091–5098.
- Mathew A, Morimoto RI.** 1998, Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Stress of Life* 851: 99–111.
- Matters GL, Scandalios JG.** 1986, Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (Sod) genes in maize. *Biochim Biophys Acta* 882: 29-38.
- Mercan, U.,** 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *YYÜ Vet. Fak. Derg.*, 15 (1-2), 91-96.

- Nakano, Y. and Asada K.**, 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, pp. 867–880.
- Odabaşoğlu, F.**,1998. Ispanak bitkisinde pestisitler ve bitkisel hormonlar ilemuamelenin bazı enzim aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Öztürk, L.**, 2002. Normal şartlarda büyütölen ıspanak (*S. Oleracea* cv. *Gladiator*) bitkisinde etafon ve poliamin uygulamalarının oksidatif enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, s, 28-29.
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A. & Schöfl, F.** 2002, Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 838–853.
- Patterson, B. D. & Graham, D.** 1987, Temperature and metabolism. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 12. Academic Press, New York, 153–199.
- Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M. & Mittler, R.** 2003, Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 34(2), 187–203.
- Polle A.** 1997, Defense against photooxidative damage in plants. In J Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 785–813.
- Prasad, T. K. & Stewart, C. R.** 1992, cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Molecular Biology*, 873–885.

- Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E. & Lindquist, S.** 2000, Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12(4), 479–492.
- Salvucci, M. E. & Crafts-Brandner, S. J.** 2004, Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120, 179–186.
- Sato, S., Peet, M. M. & Thomas, J. F.** 2002, Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. Exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1187–1195.
- Scharf, K.-D., Siddique, M. & Vierling, E.** 2001, The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 225–237.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L.ve Leblebici, E.,** 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematiği (Ders Kitabı). 4. baskı . Ege Üniv. Fen Fak. Ders Kitapları Serisi No: 116. İzmir
- Shi, W. M., Muramoto, Y., Ueda, A.&Takabe, T.** 2001, Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 273(1), 23–27.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S.** 1996, HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 289–296.
- Schirmer, E. C., Lindquist, S. & Vierling, E.** 1994, An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell*, 6, 1899–1909.

- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A. & Beck, C. F.** 1999, A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 11(6), 1165–1178.
- Schwender J, Ohlrogge J, Shachar-Hill Y.** 2004, Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr Opin Plant Biol* 7: 309–317
- Smith, B. J. & Yaffe, M. P.** 1991, Uncoupling thermotolerance from the induction of heat shock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11091–11094.
- Storozhenko, S., De Pauw, P., Van Montagu, M., Inze, D. & Kushnir, S.** 1998, The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter. *Plant Physiology*, 118(3), 1005–1014.
- Streb P, Michael-Knauf A, Feierabend J.** 1993, Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol Plant* 88: 590–598
- Sung, D.-Y., Vierling, E. & Guy, C. L.** 2001, Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* hsp70 gene family. *Plant Physiology*, 126, 789–800.
- Swan, T. M. & Watson, K.** 1999, Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(6), 472–479.
- Thipyapong, P., M. J. Stout and Attajarusit J.** 2007. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. *Molecules*, 12, 1569-1595.

- Török, Z., Goloubinoff, P., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H. & Vigh, L.** 2001, HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 3098–3103.
- Trent, J. D., Kagawa, H. K., Paavola, C. D., McMillan, R. A., Howard, J., Jahnke, L., Lavin, C., Embaye, T. & Henze, C. E.** 2003, Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a membrane-related function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15589–15594.
- Vamos-Vigyara, L.**, 1981. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev. Food Sci. Nutr.*(15), 49-127.
- Vierling, E.** 1991, The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 579–620.
- Vigh, L., Maresca, B. & Harwood, J. L.** 1998, Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 369–374.
- Wang, W., Vincour, B., Shoseyov, O. & Altman, A.** 2004, Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 244–252.
- Waters, E. R., Lee, G. J. & Vierling, E.** 1996, Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47, 325–338.
- Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W.** 1995, Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207–228.
- Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M. & Sharkey, T. D.** 2004, Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima

cotton plants at high temperature. *Plant Cell and Environment*, 27(6), 717–724.

Yang Ju Im, Mikyoung Ji, Alice Lee, Rushyannah Killens, Amy M. Grunden and Wendy F. Boss. 2009, Expression of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase in *Arabidopsis* enhances heat tolerance. *Plant Physiology* 151:893-904.

Yeh, C. H., Chang, P. L., Yeh, K.-W., Lin, W.-C., Chen, Y.-M. & Lin, C.-Y. 1997, Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 10967–10972.

Young, L. W., Wilen, R. W. & Bonham-Smith, P. C. 2004, High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 485–495.

Zabaleta, E., Oropeza, A., Assad, N., Mandel, A., Salerno, G. & Herrera-Estrella, L. 1994, Antisense expression of chaperonin 60 in transgenic tobacco plants leads to abnormal phenotypes and altered distribution of photoassimilates. *Plant Journal*, 6, 425–432.

Zahedi, M., Sharma, R. & Jenner, C. F. 2003, Effects of high temperature on grain growth and on the metabolites and enzymes in the starch-synthesis pathway in the grains of two wheat cultivars differing in their responses to temperature. *Functional Plant Biology*, 30, 291–300.

Zatsepina, O. G., Velikodvorskaia, V. V., Molodtsov, V. B., Garbuz, D., Lerman, D. N., Bettencourt, B. R., Feder, M. E. & Evgenyev, M. B. 2001, A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. *Journal of Experimental Biology*, 204(Pt 11), 1869–1881.

