

Yüksek Sıcaklık Stresinin Taze Fasulye Genotiplerinde Isı Şoku Proteinlerine Etkileri

Tuğba Biçer

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Nisan 2021

Effects of High Temperature Stress on Heat Shock Proteins in Common Bean Genotypes

Tuğba Biçer

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

April 2021

Yüksek Sıcaklık Stresinin Taze Fasulye Genotiplerinde Isı Şoku Proteinlerine Etkileri

Tuğba Biçer

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ece Turhan

Bu tez ESOGÜ BAP tarafından 201923A117 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Nisan 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ece Turhan danışmanlığında hazırlamış olduğum “Yüksek Sıcaklık Stresinin Taze Fasulye Genotiplerinde Isı Şoku Proteinlerine Etkileri” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.26/04/2021

Tuğba Biçer

İmza

ÖZET

Yüksek sıcaklık stresinin süresi ve derecesinin, protein ve ısı şoku proteinleri (HSP) nin sentezine etkisi ile birlikte genotipler arasındaki farklılıkların araştırıldığı bu çalışmada Balkız ve Yerel Genotip olmak üzere iki farklı taze fasulye genotipi kullanılmıştır. Genotiplere ait olan fideler torf:perlit:bahçe toprağı (1:1:1) içeren saksılarda 15/30°C (gece/gündüz) sıcaklıkta, ~%65 nemde 5-6 yapraklı oluncaya kadar yetiştirilmiştir. Ardından bitkiler büyüme kabine alınarak kabin sıcaklığı 30°C'den başlayarak saatte 2°C artacak şekilde 40°C'e yükseltilmiştir. Bu sıcaklıkta 2 saat sonunda bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Aynı uygulama 44 ve 48°C'lik yüksek sıcaklıklar için de yapılmıştır. Uygulamaların sonunda yaprak dokularında hücre membran zararlanması, yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK) hesaplanmıştır. Yaprak dokularındaki protein profilleri SDS-PAGE yöntemiyle toplam çözünebilir protein (TÇP) miktarları ve prolin analizi spektrofometrik yöntemlerle, yüksek sıcaklık sonucu oluşan spesifik proteinlerin değişimi Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamalarının artışına bağlı olarak iyon sızıntısı ve TK artmış, YOSK ise azalmıştır. İyon sızıntısı ve TK'nın Balkız genotipinde daha yüksek olduğu görülürken, YOSK değerinin Yerel Genotip'te yüksek olduğu görülmüştür. Genotiplerin LT₅₀ değerleri belirlenmiş ve Balkız genotipinin 45,3°C değeriyle Yerel Genotip'in 46,2°C değerinden daha düşük yüksek sıcaklık toleransına sahip olduğu saptanmıştır. SDS-PAGE ve TÇP analizi sonuçlarında stres etkisiyle bazı proteinlerin yıkılırken yeni proteinlerin sentezlendiği gösterilmiştir. Yine artan sıcaklıkla beraber prolin miktarının da arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, Balkız ve Yerel Genotip'te 40°C'de HSP23 proteininin yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada ilişkili olabileceği bulunurken daha yüksek sıcaklıklarda bir ilişki bulunamamıştır. Yerel Genotip'te HSP60 proteininin yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada ilişkisinin olduğu bulunurken Balkız genotipinde 48°C'de yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HSP60, HSP23, *Phaseolus vulgaris* L., prolin stres.

SUMMARY

Two different fresh bean genotypes, Balkız and Local Genotype, were used in this study, to investigate the effects of the duration and degree of high temperature stress on protein expression, the ability of plants to synthesize heat shock proteins (HSPs), and the differences between genotypes. Seedlings belonging to the genotypes were grown in pots containing peat:perlite:garden soil (1:1:1) at a temperature of 15/30°C (day/night) and a humidity of ~ 65% until they had 5-6 leaves. Later, the plants were taken to the growth chamber and the temperature of the cabin was increased from 30°C to 40°C, increasing by 2°C per hour. Leaf samples were taken from the plants after 2 hours at this temperature. The same application was made for high temperatures of 44 and 48°C. Cell membrane damage in leaf tissues, leaf proportional water content and turgor loss were calculated at the end of the applications. Protein profiles in the leaf tissues were determined by SDS-PAGE method, total soluble protein (TSP) amounts and proline analysis by spectrophometric methods, and the change of specific proteins resulting from high temperature by Western Blot method. Due to the increase in high temperature applications, ion leakage and turgor loss increased, while RWC decreased. While ion leakage and loss of turgor were higher in Balkız genotype, RWC value was found to be higher in Local Genotype. The LT_{50} values of the genotypes were determined that the Balkız genotype had a lower temperature tolerance with 45.3°C value than the 46.2°C value of the Local Genotype. In the results of SDS-PAGE and TSP analysis, it has been shown that while some proteins are degraded under the effect of stress, new proteins are synthesized. It has also been shown that the amount of proline increases with increasing temperature. Besides, it was found that the HSP23 protein at 40°C in Balkız and the Local Genotype may be associated with tolerance to high temperatures, but no relationship was found at higher temperatures. In the local genotype, HSP60 protein has been found to be associated with tolerance to high temperature, while it has no effect on tolerating high temperature at 48°C in the Balkız genotype.

Key Words: HSP60, HSP23, *Phaseolus vulgaris* L., proline, stress.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 Materyal	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Denemenin Kuruluşu.....	17
3.2.2. Yüksek sıcaklık uygulamaları	18
3.2.3. İncelenen parametreler	20
<u>3.2.3.1. Hücre membran zararlanma oranı</u>	20
<u>3.2.3.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK)</u>	21
<u>3.2.3.3 Prolin analizi</u>	21
<u>3.2.3.4 Toplam çözünebilir protein (TÇP) analizi</u>	22
<u>3.2.3.5 SDS-PAGE analizi</u>	22
<u>3.2.3.6 İmmünblot (Western Blot) analizi</u>	25
3.3. İstatiksel Analizler.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Hücre Membran Zararlanma Oranı ve Yüksek Sıcaklığa Tolerans (LT ₅₀)	28
4.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK).....	30
4.4. Prolin.....	34
4.5. Toplam çözünebilir protein (TÇP) miktarı.....	36
4.6. SDS-PAGE.....	38

4.7. İmmünblot (Western Blot)	40
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR DİZİNİ	46
EK AÇIKLAMALAR LİSTESİ	62
EK AÇIKLAMALAR	63
Ek Açıklama-A: Hücre Membran Zararlanma Oranı.....	63
Ek Açıklama-B: Yüksek Sıcaklık Tolerans Derecesi (LT ₅₀) İnteraksiyon Tablosu.....	64
Ek Açıklama-C: Yaprak Oransal Su Kapsamı İnteraksiyon Tablosu	65
Ek Açıklama-D: Turgor Kaybı İnteraksiyon Tablosu.....	66
Ek Açıklama-E: Prolin İnteraksiyon Tablosu	67
Ek Açıklama-F: Toplam Çözünebilir Protein İnteraksiyon Tablosu.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Taze fasulye bitkilerinin genel görünümü	18
3.2. Yüksek sıcaklık uygulamaları esnasında bitkilerin kabin içerisindeki görünümü.	19
3.3. Taze fasulye bitkilerinin yüksek sıcaklık uygulamaları sonunda görünümü	19
3.4. Polimerize olan jellerin tank içerisine yerleştirilmesi ve örnek yükleme.....	24
3.5. Hazırlanan sandviçin cihaza alınması ve cihazdan çıkarılması.....	26
4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin yüksek sıcaklık tolerans değeri.....	28
4.2. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin yaprak oransal su kapsamındaki (YOSK) değişim.....	32
4.3. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin turgor kaybındaki (TK) değişim.	33
4.4. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerindeki prolin miktarı.	35
4.5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin TÇP miktarı.	37
4.6. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde toplam protein profilleri	39
4.7. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde HSP60 proteininin görünümü (a) ve HSP60 proteinin bant yoğunluğu (b).	40
4.8. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde HSP23 proteininin görünümü (a) ve HSP23 proteinin bant yoğunluğu (b).	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

3.1. Araştırmada kullanılan taze fasulye genotiplerinin orijinleri.....	17
4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki hücre membran zararlanması.....	29
4.2. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki yaprak oransal su kapsamı (YOSK).....	32
4.3. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki turgor kaybı (TK).....	33
4.4. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki prolin miktarı.....	36
4.5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki TÇP miktarı.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C

µg

µl

cm

mL

Açıklama

Santigrat derece

Mikrogram

Mikrolitre

Santimetre

Mililitre

Kısaltmalar

BSA

CAT

DTT

EC

EDTA

GPOX

HSP

HSFs

IPCC

PMSF

PVPP

ROS

rpm

SDS

SDS-PAGE

SOD

TBS

TBST

TK

YOSK

Açıklama

Bovine Serum Albümin

Katalaz

1,4 dithiothreitol

Elektiriksel iletkenlik

Etilen diamin tetra asetik asit

Guaiacol peroksidaz

Heat şok protein

Heat şok faktörleri

Intergovernmental Panel on Climate Change

Phenylmethanesulfonyl fluoride

PolyVinyIPolyPyrrolidone

Reaktif Oksijen türleri

Dakikadaki dönme sayısı

Sodyum dodesil sülfat

Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi

Superoksit dismütaz

Tris Buffer Saline

Tris Buffer Saline Tween-20

Turgor kaybı

Yaprak oransal su kapsamı

1.GİRİŞ

Stres; bitkilerde metabolik iç dengeyi bozan ve genellikle alıştırma (aklimasyon) olarak bilinen süreçte metabolik yolların düzenlenmesini gerektiren büyüme koşullarındaki herhangi bir değişiklik olarak tanımlanabilir (Shulaev vd., 2008). Bitkiler sesil yaşam tarzları sebebiyle sürekli olarak geniş bir çevresel stresle karşı karşıya kalmaktadırlar (Suzuki vd., 2014). Tarımsal faaliyetleri sekteye uğratan, çevre dengesinin bozulmasına sebep olan kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklıklar ve kimyasal toksisite gibi abiyotik stresler (Wang vd., 2003), her yıl ürün kalitesi ve veriminde de büyük kayıplara sebebiyet vermektedir (Inze vd., 1995).

Dünyanın birçok yerinde sıcaklık stresi büyük bir sorundur. Sıcaklıkta geçici bir yükselme veya sıcaklığın ortalamasının 10-15°C üzerinde olması, sıcaklık şoku veya sıcaklık stresi olarak kabul edilir (Wahid ve Close, 2007). Yüksek sıcaklığın kısa süreli veya sürekli olarak devam etmesi, bitkilerin yaşam döngülerini olumsuz etkileyen ve önemli verim kayıplarıyla sonuçlanan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere sebep olur (Akarken, 2016; Firmansyah ve Argosubekti., 2020). Yüksek sıcaklık; fotosentez, solunum, su ilişkileri ve membran stabilitesi gibi hayati fizyolojik süreçlerle hormon, primer ve sekonder metabolit seviyelerini de olumsuz etkileyebilir (Hemantaranjan vd., 2014). Diğer taraftan yüksek sıcaklığın sebep olduğu yanlış protein katlanmaları otofajinin oluşumunu uyarmaktadır (Huo vd., 2020). Yüksek sıcaklığın protein denatürasyonuna sebep olması ve membran akışkanlığını değiştirmesinin yanında, metabolik süreçlerin genel işleyişini bozarak oksidatif strese de neden olabildiği bilinmektedir (Hong vd., 2003).

Bitkilerin oksidatif strese girmesiyle birlikte hücre içerisindeki reaktif oksijen türleri (ROS) nin miktarı artmakta ve bitkinin sahip olduğu antioksidan sistemlerle ROS üretimi arasındaki değer bozulmaktadır (Yanık vd., 2018). Reaktif oksijen türleri konsantrasyonları belirli bir eşiğe ulaştığında ise, hücreler programlanmış bir hücre ölümü yanıtını başlatmaktadırlar (Jambunathan, 2010). Reaktif oksijen türleri, bitki biyolojisinde hem farklı stres koşulları esnasında hücrelerde biriken aerobik metabolizmanın toksik bir yan ürünü (Miller vd., 2008), hem de ısı şoku transkripsiyon faktörlerini (HSFs) aktive

eden önemli bir sinyal iletim molekülüdür (Soltani vd., 2019). Bu duruma ek olarak ısı HSFs'leri ve ısı şoku proteinlerini (HSP'ler) içeren sıcaklık stres tepkisi sinyal iletim yollarının ve çeşitli savunma mekanizmalarının ROS ile yakından ilişkili olduğu ve stres toleransı sağlayarak bitkilerde savunma mekanizmalarına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Awasthi vd., 2015).

Bitkinin strese yanıtı, stres derecesi ve stres süresiyle ilişkili dinamik bir süreçtir (Kosova vd., 2011). Bitkilerin yüksek sıcaklık stresinde bazı özel proteinler sentezledikleri son çalışmalarla kanıtlanmıştır (Haliloğlu, 2015; Ergin vd., 2016). Hücrelerde ilk kez yüksek sıcaklıkla ilgili olduğu keşfedilen bir grup protein ailesi olan HSP'ler (Aşkar vd., 2007), sıcaklık şokunun temel yanıtıdır (Sanmiya vd., 2004; Büyük vd., 2012).

Canlı organizmaların çoğunda farklı HSP türleri tanımlanmıştır. Isı şoku proteinleri 5 ana sınıfa ayrılıp; HSP70 (DnaK), HSP60 (GroEL ve Şaperoninler), HSP90, HSP100 ve küçük ısı şoku proteinleri (sHSP) şeklinde sınıflandırılmaktadırlar (Wang vd., 2004). Isı şoku proteinleri ilk olarak sıcaklık ve diğer streslerin indüklediği gen ürünleri olarak tanınmışlardır. Stressiz hücrelerde bile, başarılı katlama, montaj, hücre içi lokalizasyon, sekresyon, düzenleme ve diğer proteinlerin bozulmasında çeşitli roller oynadığı ortaya çıkmış olup, son yıllardaki keşiflerle moleküler şaperon olarak rolleri de önemsenmeye başlamıştır (Feder, 1999; Krishna, 2003). Isı şoku proteini sentezi, hem transkripsiyonel hem de translasyonel kontrolü içeren karmaşık bir yanıtıdır (Howarth, 1989). Ayrıca bazı sHSP'ler membran ile birleşerek sıcaklık stresi sırasında zarları erken stabilize edebilen ısı şok lipidleri oluşturur (Bita ve Gerats, 2013). Isı şoku proteinlerinin molekül ağırlıkları 10-200 kilodalton (kDa) arasında olup, sıcaklık stresinde sinyal indüksiyonunda görevli şaperonlar olarak bilinmektedirler (Al-Whaibi, 2011). Isı şok proteinlerinin sentezi ortalama yetişme sıcaklığının 8-10°C üzerinde artmaktadır (Kimpel ve Key, 1985). Isı şoku proteinleri sitoplazma, çekirdek, mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum gibi organellerde bulunabilir (Wang vd., 2004).

HSP60 ve HSP70 ailelerine ait ısı şoku proteinleri gibi bitki HSP'lerinin çeşitli rolleri hakkında birçok çalışma yapılmıştır (Banerjee ve Roychoudhury, 2018). HSP70 ve HSP60, ısı stresi toleransında önemli bir rol oynar ve bitki türleri boyunca yüksek oranda

korunur (Tiwari vd.,2020). Şaperoninler olarak bilinen HSP60 sınıfı prokaryotlarda bulunduğu gibi ökaryotların mitokondri ve plastitlerinde de bulunur. Şaperoninler, katlanmamış veya kısmen katlanmış polipeptidleri stabilize ederek agregasyonlarını önler (Hartl ve Martin, 1995). Ayrıca Rubisco gibi plastid proteinlerine katılırlar (Hendrick ve Hartl, 1993; Nakamoto ve Hiyama, 1999; Wang vd., 2004). Bununla birlikte sHSP'ler 15-40 kDa büyüklüğünde olan, çekirdek ve sitoplazmada bulunan ve aynı zamanda apoptosis, farklılaşma vb. gibi normal hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesini sağlayan, antioksidan özelliği de bulunan proteinlerdir (Aşkar vd., 2007). Bazı çalışmalar sHSP'lerin yüksek sıcaklığa karşı proteinlerin agregasyonlarını önleyen şaperonlar olduğunu göstermiştir (Veinger vd., 1998; Diamant vd., 2001).

Taze fasulye içerdiği vitamin (A, B1, B2 ve C vitaminleri), mineral ve protein bakımından hayati bir besin niteliğinde olup hayvancılıkta ise yem olarak kullanılabilir, ayrıca azot fiksasyonu sayesinde toprağın verimliliğinin artırılmasına katkıda bulunur (Darkwa vd., 2016). Kazık kökleri sayesinde fasulye toprağa derinlemesine nüfuz etmekte ve toprağın alt tabakasında biriken besinleri kullanılabilir seviyeye yükselterek toprağın zenginleşmesini sağlamaktadır (Tanrıseven, 2020). 19. yüzyılın sonlarına doğru yapılan arkeolojik çalışmalara dayanarak taze fasulyenin gen merkezinin Güney ve Orta Amerika olduğuna ulaşılmıştır (Marotti vd., 2006). Elli Phaseolus cinsi içerisinde bulunan 5 önemli tür olan *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* ve *P. poliantus* ticari açıdan değeri yüksek olanlar olarak bilinmektedirler. Bu türler içinde *P. vulgaris*' in dünyada yetiştirilen baklagillerin %75'ini kapsadığı ve en fazla yetiştirilen tür olduğu bildirilmektedir (Broughton vd., 2003).

Fasulye dünyanın en büyük ekim alanına sahip baklagil bitkisi olup yabancı kökenine rağmen adaptasyon sağlayabilmiş ve özellikle Karadeniz bölgesinde geniş çeşitlilik göstermiştir (Bozoğlu ve Sözen, 2007). Ülkemizde 75 ilimizde fasulye yetiştiriciliği yapılmaktadır (Ton vd., 2014). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2019 verilerine göre dünyada 26,9 milyon ton taze fasulye üretimi yapılmıştır (FAO, 2021). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2019 verilerine göre ülkemizde 596.074 ton taze fasulye üretimi yapılmıştır (TÜİK, 2021). Taze fasulyenin çimlenmesi için optimum sıcaklık 20-30°C aralığındadır (Hucl, 1993) ancak iklim değişikliğiyle beraber

yüksek sıcaklıklardaki artış baklagil mahsul veriminde sıcaklık stresine bağlı bir azalma meydana getirir. Bu zarar; üreme dokularının büyümesi ve gelişmesi esnasındaki sıcaklık değişimlerine karşı bitki hassas olduğu için özellikle meyve-tohum oluşumunda daha fazladır (Ozga vd., 2017).

Örtüaltı fasulye yetiştiriciliğinde ürün verimini ve kalitesini negatif yönde etkileyen abiyotik stres faktörlerinin en önemlisi yüksek sıcaklıktır (Kabay, 2018). Ayrıca, küresel iklim değişikliğinden de kaynaklanan yüksek sıcaklık açıkta taze fasulye yetiştiriciliğinde ve buna bağlı olarak veriminde de önemli bir kısıtlama olarak karşımıza çıkmaktadır (Porch, 2006). Bitkilerde yüksek sıcaklık stresine tolerans kazanılmasında etkili olan HSP'lerin taze fasulye bitkisindeki rolünün araştırılması ve genotipler arasındaki farklılığın ortaya konması yüksek sıcaklığa toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma, ileride HSP'lerin amino asit dizisinin tespit edilmesi ve bunun sonucunda taze fasulyede yüksek sıcaklık stresinde etkili olan gen bölgelerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalara temel olacaktır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Bitki büyüme ve gelişmesini etkileyen en önemli çevre faktörlerinden birisi yüksek sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıkların; tarımsal verimlilik, çiftlik gelirleri ve gıda güvenliği açısından önemli sonuçları olabileceği düşünülmektedir (Battisti ve Naylor, 2009). Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC)'nin raporuna göre, 2016 ve 2035 yılları arasında küresel olarak 0,3-0,7°C'lik ve bu yüzyılın sonuna kadar ise 0,3-4,8°C'lik sıcaklık artışı beklenmektedir (IPCC, 2014).

Yüksek sıcaklık stresi bitki metabolizmasında fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler bazı değişikliklere neden olur (Levitt, 1980). Örnek verilmesi gerekirse, yüksek sıcaklık stresinin bitki tilakoid sisteminin yapısında değişiklikler ve düzensizlikler meydana getirdiği bilinmektedir (Semenova, 2004). Sıcaklık stresi aynı zamanda hücre iskeleti yapısını da etkilemektedir (Parrotta vd., 2016). Yüksek sıcaklık, morfolojik olarak büyüme ve kuru ağırlıkta önemli azalmaya neden olurken anatomik açıdan hücre boyutunun küçültülmesi, stomaların kapanması gibi değişikliklere neden olabilmektedir (Sailaja vd., 2014).

Yüksek sıcaklık bitkinin yaşam evrelerini kısaltmakta, karbon asimilasyonu ile ilişkili süreçleri değiştirmektedir. Örneğin solunumu artırmak için daha fazla karbon fiksasyonuna ihtiyaç vardır fakat yüksek sıcaklıklar Rubisco aktivitesiyle beraber fotosentez işlemlerinin ısıya en duyarlı bileşeni olan fotosistem-II'nin kloroplast içerisindeki etkinliğini azaltmaktadır bu sebeple de fotosentez azalmaktadır (Masouleh ve Sassine, 2020). Yüksek sıcaklık stresi çiçeklerde bulunan stigma yapılarını etkileyerek stigma polen etkileşimini ve etkileşim süresini azaltır bu durumda başarılı bir fertilizasyon şansını azaltabilir (Hedhly vd., 2005). Meyve olgunlaşması gibi gelişimsel olayların oranı büyük ölçüde sıcaklıkla belirlendiğinden sıcaklıkta meydana gelen dalgalanmalar mahsul verimini etkileyebilir ileri aşamada ise ani sıcaklıklar meyve oluşmasını tamamen engelleyebilir (Adams vd., 2001). Ayrıca bitkilerin patojenlere olan duyarlılığı yüksek sıcaklık ile artmaktadır (Kiraly vd., 2008).

Bitkilerde yüksek sıcaklıklara uyum sağlama sırasında ortaya çıkan değişikliklerin birçoğu geri dönüşümlüdür. Ancak, eğer stresin şiddeti çok büyük ise geri dönüşümü olmayan ve bitkinin ölümüne neden olan değişiklikler ortaya çıkabilir. Diğer taraftan, sıcaklık stresi, sıcaklığın yoğunluğuna (derece sıcaklık), süresine ve sıcaklık artış oranına bağlı karmaşık bir olaydır yani, uzun süreli daha az sıcaklık, kısa süreli yüksek sıcaklık kadar çok zarara yol açabilmektedir (Larcher, 1995). Yapılan çalışmalar, sıcağa alıştırılmış bir bitkinin yüksek sıcaklığa maruz kaldığı zaman yaşamını devam ettirebilirken, alıştırılmamış bir bitkinin devam ettiremediğini göstermektedir. Bu durum kazanılmış termotolerans olarak tanımlanmaktadır (Hasanuzzaman vd., 2013).

Bitkilerin normal büyüme sıcaklıklarının üzerindeki sıcaklıklara maruz kalması hücre zarı yapısında geri dönüşümsüz değişikliklere ve kararsızlıklara neden olmaktadır. Hücre membranı zararlanmasının ölçülmesinde kullanılan iyon sızıntısı direkt sıcaklık zararının bir göstergesidir (Arora vd., 1998). Ayrıca, diğer abiyotik stres faktörlerinde olduğu gibi yüksek sıcaklık stresinde bitki bünyesinde pek çok metabolik olayın etkilendiği bir gerçektir. Örneğin, yüksek sıcaklık stresi koşullarının delice ve çayır otu bitkilerinde yaprak oransal su kapsamını (YOSK) azalttığı, iyon sızıntısını ise arttırdığı tespit edilmiştir (Jiang ve Huang, 2001; Xu vd., 2006). Bununla birlikte YOSK'daki azalma ön sıcaklık alıştırması uygulanmayan bitkilerde daha fazla olmuştur. Gulen ve Eris (2003, 2004) ise, "Camarosa" çilek çeşidinde sıcaklığın kademeli olarak arttırıldığı yüksek sıcaklık uygulamalarında iyon sızıntısının şok sıcaklık stresine maruz kalan bitkilere oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar çilek bitkisinde yüksek sıcaklık uygulamalarının YOSK'nı azalttığı, turgor kaybını (TK) arttırdığını bildirmektedirler (Gulen ve Eris, 2003; 2004, Gülen vd., 2007; Kesici, 2009; Kesici vd., 2013). Benzer sonuçlar 'Gemlik' zeytin çeşidinde de elde edilmiştir (Cansev, 2012).

Aydoğan ve Turhan (2013) ise 'Keklik' barbunya çeşidinde yüksek sıcaklık uygulamalarının YOSK oranını azalttığını, buna karşılık TK'nı ise arttırdığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde bakla genotiplerinde de yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak YOSK'nın azaldığı belirlenmiştir (Siddiqui vd., 2015). Yüksek sıcaklıklar transpirasyon oranında artışa neden olarak YOSK'nı azaltmakta, TK'nı ise arttırmaktadır (Yamasaki ve Dillenburg, 1999; Farouk, 2011).

İki buğday çeşitleri olan Katya (tolerant) ve Sadovo (hassas)'da yapılan kuraklık ve sıcaklık stresi uygulamalarının birlikte ve ayrı ayrı olarak etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre YOSK hem ayrı ayrı hem de birlikte uygulanan stres koşullarında azalmış, iyon sızıntısı ise artmıştır (Grigorova vd., 2011).

Buğday fidelerinin artan gece/gündüz sıcaklığına maruz bırakıldığı çalışmada [25/20°C (kontrol), 30/25°C ve 35/30°C] YOSK'nın 30/25°C'de fazla etkilenmediği ancak 35/30°C'de kontrole kıyasla önemli bir düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca prolin içeriği 30/25°C'de 1,5 kat, 35/30°C'de ise 2,2 kat artış göstermiştir (Amirjani, 2012). Omea vd. (2005)'nin fasulye bitkisinde yapmış oldukları araştırmada, YOSK'nın daha iyi fotosentetik koşullar oluşturması açısından önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca, yapraktaki su potansiyelinin azalmasının sıcaklık stresine karşı verilmiş bir tepki olabileceğine dikkat çekilmiştir. Yine, çavdarda (*Lolium perenne* L.) yüksek sıcaklığa hassas ve tolerant olduğu bilinen çeşitlerle yapılan çalışmada bitkiler 36°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış iyon sızıntısının hassas olan çeşitte daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Soliman vd., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada ise 10 saat süreyle üç farklı sıcaklık stresine maruz bırakılmış (37°C, 42°C, 47°C) zambak (*Lilium longiflorum* L.) yapraklarında kontrole kıyasla 37°C ve 42°C de hafif, 47°C'de önemli ölçüde iyon sızıntısında artış görülmüştür (Yin vd., 2008). Benzer şekilde, (*Agrostis palustris* Huds.) çim bitkilerinin hassas Penncross ve tolerant L-93 çeşitlerinde yapılan çalışmada 22°C/16°C (kontrol) yetiştirilen bitkilerin yarısı 35°C/25°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Yapılan analiz sonucu iyon sızıntısının her iki çeşitte de arttığı fakat bu artışın Penncross'da daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Liu ve Huang., 2000).

Prolin, proteinlerin yapısını stabilize eden moleküler şaperon görevi gören önemli bir ozmolit olarak kabul edilir (Szekely vd., 2008). Kuraklık, tuz stresi, yüksek sıcaklık, yüksek ışık ve UV, ağır metaller gibi abiyotik stresler ve biyotik streste prolin miktarının arttığı ve prolin birikiminin, bazı olumsuz çevresel koşulların toleransı için önemli olduğu vurgulanmıştır (Szabados ve Savoure, 2010). Prolin, osmo-koruyucu bir madde olarak hareket etmenin yanı sıra, bir hidroksil radikal temizleyici aynı zamanda bir azot ve enerji

kaynağı (Claussen, 2005; Mostajeran ve Rahimi-Eichi, 2009; Abraham vd., 2010), ve metal şelatlayıcı olarak görev yapmaktadır (Kaur ve Asthir, 2015).

Prolin sürgünlerin apikal meristemleri gibi hızlı bölünmeye maruz kalan dokularla ilişkilendirilmiş, çiçeklenme ve embriyo oluşumuna da katkıları olduğu belirtilmiştir. Ayrıca polen ve tohumlarda dehidrasyon meydana gelmesi durumunda hücresel yapıları korumada görev yaptığı rapor edilmiştir (Lehman vd., 2010). Prolin birikimi sitosolde meydana gelir. Ayrıca prolinin yüksek sıcaklık ve kuraklık stresinin meydana getirdiği hasarın giderilmesinde tuzluluk stresi sonucunda oluşan hasara oranla daha etkili olduğu öne sürülmüştür (Babu ve Deveraj, 2008). Prolin ve hücrenin bölünme esnasındaki uzaması arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş olup; bu durumun hidroksiprolin bakımından zengin glikoproteinlerin hücre duvarının yapısal bileşeni olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Trovato vd., 2008).

Prolin biyosentezindeki eksiklik, anormal bitkilere ve hücre duvarı kusurlarına yol açar ve dolayısıyla prolinin yapısal proteinler içerisindeki rolü yadsınamayacak kadar çoktur (Kavi Kishor vd., 2015). Aynı zamanda prolin strese yanıt verecek olan genlerin düzenlenmesinde yardımcı olan sinyal iletim yollarının da aktif bir bileşenidir (Rani ve Tokas, 2020). Bu özelliklere ek olarak prolinin mitokondriyal elektron taşıma kompleksini, membranları ve Rubisco'yu koruduğu bilinmektedir (Hayat vd., 2012).

Yüksek sıcaklık stresine maruz kalma sürelerinin etkilerini incelemek amacıyla 4 taze fasulye genotipinde (Cerinza, Bachue, Bacata, Bianca) iki ayrı deneme yapılmıştır. İlk denemede 'Cerinza' genotipi çimlenmeye başladıktan 45 gün sonra yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Bitkilerin bir kısmı kontrol sıcaklığı olan 25/20°C'de tutulurken, kalan bitkiler 5, 10 ve 20 gün süresince 40°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Belirtilen süreler boyunca hergün 5 saat 40/25°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. İkinci denemede ise 4 fasulye genotipi çimlenmeye başladıktan 45 gün sonrasında 20 gün boyunca dört farklı gündüz sıcaklığına [kontrol(25/20°C), 30°C, 35°C, 40°C] maruz bırakılmıştır. Bu süre içerisinde geceleri ise bitkiler serada kontrol sıcaklıklarına geri döndürülmüştür. İlk denemede prolin içeriğinin arttığı görülmüştür. İkinci denemede ise prolin miktarı, Cerinza, Bachua, Bacata'da 40°C'de artmıştır. Araştırmacılar, Cerinza,

Bachua, Bacata genotiplerinin uzun sıcaklık stresine orta derece toleranslı olduğunu öne sürmüşlerdir (Chavez ve Arias, 2018). Diğer taraftan yüksek sıcaklık stresine 24 ve 48 saat boyunca (42°C) maruz bırakılan Maş fasulyesinin prolin içeriğinin önemli miktarda arttığı bildirilmiştir (Nahar vd., 2015). Siddiqui vd., (2015) yaptıkları çalışmada *Vicia faba* çeşitleri içerisinde sıcaklık stresine tolerant olarak belirledikleri çeşidin iyi bir antioksidan enzim içeriğine ve yüksek prolin birikimine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Yüksek sıcaklığa maruz bırakılan *Lactuca sativa* L. fidelerinde de prolin ve çözülmüş şeker içeriğinde artış gözlemlenmiştir (Han vd., 2013).

Harsh vd., (2016) yaptıkları çalışmada *Vigna aconitifolia*'nın 37 genotipinde kısa süreli sıcaklık stresinin etkilerini incelemek amacıyla 7 günlük fideler 1 saat süreyle 42°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Sıcaklık stresi altındaki genotiplerin çoğunda toplam şeker ve prolin üzerinde önemli miktarda artış ve katalaz (CAT), guakiol peroksidaz (GPOX) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Rizhsky vd., (2004) yaptıkları çalışmada 38°C'de 6 saat yüksek sıcaklığa ve kuraklığa maruz bıraktıkları *Arabidopsis* de prolin birikmediği bunun yerine sukrozun osmoprotektan olarak öne çıktığını belirtmişlerdir.

Rivero vd., (2004) domateste yaptıkları çalışmada domatesleri iki gruba ayırarak bir gruba NH_4^+ diğer gruba NO_3^- ile muamele etmişler ve sırasıyla 10°C, 25°C ve 35°C sıcaklıklara maruz bırakmışlardır. Çalışmaları sonucunda 35°C derecede prolin birikimin arttığını gözlemlenmişlerdir. Tütün bitkisinde sıcaklık stresinde prolin ve poliaminin etkilerinin incelendiği çalışmada yabani tip (*Nicotiana tabacum* L. cv. M51) ve transgenik (35S:P5CSF129A) tütün bitkileri 2 saat ve 6 saat boyunca 40°C sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ilk sıcaklık uygulamasında yani 40°C'de 2 saatte yabani tipin üst yaprakları ve köklerindeki prolin miktarı kontrole oranla artmış, yabani tipin aksine transgenik tütün bitkilerinin üst yapraklarında ise prolin miktarı kontrole oranla azalmıştır. İkinci uygulama olan yani 6 saatlik 40°C sıcaklık uygulamasında ise hem yabani tip hem de transgenik tütün bitkilerinin alt yapraklarında prolin artışı gözlemlenmiştir (Cvikrová vd., 2012).

Serada kontrollü koşullarda yetiştirilen hıyar fidelerinde sağlıklı ve tüylü küf hastalığı bulunan (*Pseudoperonospora cubensis*) yapraklar ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Belirlenen tarihte saat 09.30 sıcaklık 33°C'den saat 10.00'da 45°C'ye aniden yükseltilmiş ardından saat 12.00'da 48°C maksimum sıcaklığa getirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda hem sağlıklı yapraklar hem de tüylü küfle enfekte olmuş yapraklar için stomatal iletkenlik, transpirasyon hızı, antioksidan enzim aktiviteleri, toplam çözünür şeker içeriği, sukroz içeriği, çözünür protein içeriği ve prolin içeriğinin arttığı görülmüştür (Ding vd., 2016).

Yedi günlük mısır fideleri, farklı zaman aralıklarında (1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat) ısı şokuna maruz bırakılmış ardından normal büyüme koşullarında 5 gün büyütülmüştür. Elde edilen sonuçlarda prolin içeriğinde önemli bir artış görülmüş ve ısı stresinde prolin miktarının artışının önemli bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Hussain vd., 2016).

Gosavi vd., (2014) yaptıkları çalışmada yüksek sıcaklık stresi altındaki sorgum genotiplerinde prolin birikiminin ve HSP sentezinin arttığını bildirmişlerdir. Isı şokuna maruz bırakılan *Vigna radiata* (L.) fidelerinde 40°C, 50°C ve 60°C'de prolin miktarında artış gözlemlenmiş şeker içeriğindeki artışın ise yüksek sıcaklık stresi etkisiyle nişasta parçalayıcı enzimlerin aktivasyonu ile olabileceği bildirilmiştir (Amutha vd., 2007).

Brassica juncea'nın 50 genotipinde yapılan çalışmada dört günlük fideler 4,5 saat 45°C yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış ve iyon sızıntısının hassas genotiplerde daha yüksek olduğu bulunurken, prolin miktarının tolerant genotiplerde daha yüksek olduğu görülmüştür (Wilson vd., 2014). Yine, arpa (*Hordeum vulgare*) ve turp (*Raphanus sativus*) yapraklarında, prolin içeriğinin 41°C yüksek sıcaklık altında hafif bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Chu vd., 1974). Börülcede (*Vigna unguiculata*) yapılan çalışmada ise sıcaklığın 26°C'den 42°C'ye yükseltilmesi ile prolin sentezinin 2,7 kat arttığı gözlemlenmiştir (Mayer vd., 1990).

Yüksek sıcaklığa adapte olamayan bitkiler proteinlerindeki yapısal veya fonksiyonel değişimlerini tamamlayamamaktadırlar (Gulen ve Eris, 2004). Stres proteinlerinin pek çoğu suda çözünür olduğu için, hücresel yapıların stres toleransına muhtemelen hidrasyon yoluyla katkıda bulunurlar (Wahid ve Close, 2007). Stres

koşullarında protein yapılarının ve fonksiyonlarının korunması hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından çok önemlidir (Wang vd., 2004). Sıcaklık stresi, protein yapısı ve aktivitesi üzerinde de negatif bir etkiye sahiptir (Wery vd., 1993). Stres koşullarında protein yapılarının ve fonksiyonlarının korunması hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından çok önemlidir (Wang vd., 2004).

Abiyotik stresle başa çıkma yollarından biri stres proteinlerinin sentezlenmesidir (Wahid ve Close, 2007). Sıcaklık stresi sırasında özel bazı proteinlerin sentezlendiği bilinmektedir ve bu proteinler HSP'ler olarak belirlenmiştir (Nakamoto ve Hiyama, 1999). Isı şoku proteinleri ilk olarak 1960'larda *Drosophila*'da keşfedilmiştir. Stres proteinleri olarak da bilinen HSP'ler tüm bitki ve hayvanlarda yüksek oranda korunmuş olarak bulunmaktadır (Vierling, 1991).

Bitkiler yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında normal hücresel proteinlerde azalma olduğu, buna karşılık HSP'lerde ise artış olduğu belirlenmiştir (Gülen ve Eriş 2004). Isı şoku proteinleri, normal hücresel süreçte protein katlanması, montaj, translokasyon ve yıkımından sorumlu iken, stres koşullarında ise proteinlerin yeniden katlanmalarını ve denatürasyonlarını önlerler (Hartl, 1996; Boston vd., 1996; Wang vd., 2004). Isı şoku proteinlerinin, fotosentetik elektron taşıma sistemini korumada da görevli olduğu bilinmektedir (Maestri vd., 2002). Abiyotik stres koşullarına bitkilerin verdiği tepkiler ve abiyotik stres toleransları konusunda sHSP ailesi dışında, diğer HSP'lerin rolüne nispeten daha az odaklanılmıştır ve bu konudaki çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır (Wang vd., 2003; Burke vd., 2000; Burke, 2001; Hong ve Vierling, 2000, 2001; Hong vd., 2003).

Yüksek sıcaklık stresi altında bazı sHSP'ler, toplam yaprak veya kök hücre proteinlerinin %1'ine kadar ulaşabilmektedir ve proteinlerin agregasyonu önlediği, doğru protein katlanmasını teşvik ettiği düşünülmektedir. HSP60'ın aksine sHSP'lerin etkinliği adenosin trifosfattan (ATP) bağımsızdır (Sun vd., 2002). HSP20'ler bitkilerde en bol bulunan sHSP grubudur. Bitkilerde sHSP'ler, 90 amino asitlik korunmuş α -kristalin bölgesi içermektedir. Bu bölgenin, şaperon rolü olduğu öne sürülmektedir (Scharf vd., 2001). Yüksek sıcaklık uygulaması ardından sentezlenen sHSP'lerin yarı ömür sürelerinin

30-50 saat olduğu ve bu durumun iyileşmede önemli olabileceği belirtilmektedir (Sun vd., 2002). Yan vd. (2017), *Panicum virgatum*'da, sıcağa ve diğer abiyotik stres türlerine duyarlı olan 63 adet HSP20 tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu proteinler ayrıca strese duyarlı üreme organlarında da koruma sağlamıştır. Literatürde yer alan bir diğer çalışmada, soya fasulyesinde düşük molekül ağırlıklı HSP grubuna (15-18 kDa) odaklanılmasının sebebinin bu proteinlerin açık ara farkla çok sentezlenmesi ve bitkinin evrimi süresince korunması ile olduğu ifade edilmektedir (Schoffl vd., 1987).

Soya fasulyesi (*Glycine max*)'nde yapılan çalışmada, 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulamalarının normal protein sentezini azalttığı, buna karşılık HSP sentezini artırdığı bildirilmiştir (Lin vd., 1984). Lin vd (2001)'de yayımladıkları çalışmada *Arabidopsis thaliana* da yüksek sıcaklığın HSP sentezini artırdığını bildirmişlerdir. Çeltikte N22 çeşidi yüksek sıcaklığa tolerant bir çeşit olarak bilinmektedir. Kontrol sıcaklığından (29°C), 38°C sıcaklığa yükseltip 6 saat tutulan N22 çeşidi bitkilerinde yapılan analizler sonucunda HSP'nin yüksek oranda sentezlendiği tespit edilmiştir (Jagadish vd., 2010).

Vierling ve Nguyen (1990), 37°C'ye maruz bırakılan *Triticum monococcum*' da 17, 18, 22, 27, 70, 84 ve 93 kDa büyüklüğünde ısı şoku proteinleri gözlemlemişlerdir. Majoul vd (2003) e göre 18°C/10°C kontrol sıcaklığında yetiştirilen buğdaylar ve 34°C/10°C sıcaklığında yetiştirilen buğdaylardaki sonuçlarına göre kontrol sıcaklığında da HSP'lerin bulunduğu ancak 34°C yetiştirilen buğdaylarda bu miktarın arttığını belirlemişlerdir. Tahıllarda yapılan çalışmada (*Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Desf., *Hordeum vulgare* L., *Secale cereale* L. ve *Secale triticale*) 40°C'lik sıcaklık uygulamasından sonra kontrol sıcaklığında görülen bazı protein bantlarına ilaveten 13 farklı protein bandı saptanmıştır (Necchi vd., 1987).

Bezelyede (*Pisum sativum*) 34, 36, 38 ve 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda sıcaklık derecesi arttıkça yapraklarda HSP21 ve HSP70 proteinin arttığı saptanmıştır (Chen vd., 1990). Key vd (1981)' e göre soya fasulyesi büyüme sıcaklığı 28°C'den 40°C'e yükseltildiğinde normal protein sentezinin azaldığı bununla birlikte HSP sentezinin arttığı bildirilmiştir (Key vd., 1981). Soya fasulyesinde, yüksek sıcaklığa maruz kalmanın ilk 30 dakikası boyunca ubiquitin ve konjuge ubiquitin biyosentezi, yüksek

sıcaklığa toleransın en önemli mekanizması olarak bildirilmiştir (Ortiz ve Cardemil, 2001). Mısırdaki (*Zea mays* L.) 42°C'de 4 saatlik yüksek sıcaklık uygulamasından sonra HSP70 proteininin sentezinde bir artış olmadığı, buna karşılık HSP22 proteininin sentezinde önemli derecede bir artış olduğu bildirilmiştir (Lund vd., 1998).

Çeltikte 87 kDa'luk HSP'nin ısı şokunun (40°C) ilk 2 saati içerisinde geçici olarak sentezlendiği uzun süreli yüksek sıcaklık stres koşullarında veya 4 saatlik ısı şokunun ardından dahi korunduğu ifade edilmiştir (Pareek vd., 1998).

Fender ve O'Connell (1989)'e göre yüksek sıcaklığa tolerant *Gossypium hirsutum* ve hassas *Gossypium barbadense* ile yapılan çalışmada HSP sentezinin indüklendiği sıcaklık 37°C olarak ve HSP sentezinin maksimum sentezlendiği sıcaklık 45°C olarak ifade etmiştir. Ayrıca her iki bitki materyalinde de benzer moleküler ağırlığa sahip HSP'lerin varlığı bildirilmiştir (97, 92, 86, 78 ~ 67, 26, 24, 19 ve 18 kDa). Üç günlük mısır fidelerinin köklerinde yapılan çalışmada sıcaklık 25°C'den 40°C'ye yükseltilmiş 25°C'de gözlemlenen proteinlerin sentezinin 40°C'de de gözlemlendiği belirtilmiştir. Ancak sıcaklık geçişinin ilk 20 dakika sonrasında yeni HSP'lerin indüklendiği gözlemlenmiş ve bu HSP'lerin moleküler ağırlıkları 87, 85, 79, 78, 77, 72, 70, 27, 22 ve 18 kDa şeklinde bildirilmiştir. Sıcaklığın 25°C'den 45°C'ye kaydırılması durumunda ise normal protein sentezi devam ederken moleküler ağırlıkları 83, 81, 68 ve 65 kDa olan proteinlerin sentezlendiği gözlemlenmiştir (Cooper ve Ho, 1983).

Keeler vd., (2000) lima fasulyesinde (*Phaseolus lunatus*) yaptıkları çalışmada 37°C'lik yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerde HSP 100/ClpB protein sentezinin arttığını belirlemişlerdir. Yüksek sıcaklık uygulamalarının ardından Arabidopsis'te HSP'lerin ve ısı stresi ile ilişkili 32 kDa protein ifadesinin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (Chang vd., 2006). Ayçiçeği (*Helianthus annuus*) bitkilerine değişen sürelerle (1, 2 ve 3 saat) 49, 50, 51 ve 52°C'lik yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda bitkilerde HSP90 ve HSP104 proteinlerinin yüksek miktarlarda sentezlendiği tespit edilmiştir (Kumar vd., 2003).

Uzun süreli yüksek sıcaklık uygulamalarının çilekteki (*Fragaria x ananassa* cv. *Camarosa*) etkisinin araştırıldığı çalışmada, toplam protein ve DNA içeriklerinin sıcaklık

stresi uygulamaları ve sıcaklık artışı ile önemli değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Gülen ve Eriş 2003). Ledesma vd. (2004), 'Nyoho' ve 'Toyonaka' çilek (*Fragaria x ananassa Duch.*) çeşitlerine 4 saatlik 20, 23 ve 42°C'lik sıcaklıklar uygulamışlardır. Yapılan bu çalışmada yaprak ve çiçek dokularında her iki çeşitte de sıcaklık stresiyle birlikte pek çok protein içeriğinin azaldığı, buna karşılık sıcaklık stresine tepki olarak bazı yeni proteinlerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu proteinlerin yapraklarda 19-29 kDa aralığında çiçeklerde ise 16-26 kDa aralığında HSP'ler olduğu tespit edilmiştir.

Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) tolerant (HD2285) ve hassas (WH542) çeşitlerde yapılan çalışmada bitkiler 2'şer saat 15, 25, 35 ve 45°C'lik sıcaklıklara maruz bırakılmışlardır. Tolerant çeşidin HSP 100 içeriği bütün sıcaklık derecelerinde hassas çeşide göre daha yüksek bulunmuştur (Sumesh vd., 2008). Gündüz / gece sıcaklık döngüsünün 20/30°C'den 40/50°C'ye değiştirildiği *Agave deserti*, *Carnegieia gigantean* ve *Ferocactus acanthodes*'te on günlük uygulamanın sonunda her üç türünde 25-27 kDa moleküler ağırlığa sahip protein biriktirdiği bildirilmiştir (Kee ve Nobel., 1986).

Çilek bitkisinde yüksek sıcaklık stresi koşullarında toplam protein miktarının azaldığı ve bu azalışın proteinlerin denaturasyonundan kaynaklanabileceği (Gülen ve Eris, 2004) ve bununla birlikte toplam genomik DNA üretiminin de önemli bir oranda olumsuz bir şekilde etkilendiği bildirilmiştir (Gülen ve Eris, 2003) . Çilek bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise 23 kDa HSP, çilek yaprak dokularının yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkilendirilmiştir (Ergin, 2012; Ergin vd., 2016).

Yüksek sıcaklık stresinin dut yapraklarında da toplam protein miktarını azalttığı, toplam amino asit miktarını ve prolin birikimini ise, arttırdığı saptanmıştır (Chaitanya vd., 2001). Benzer şekilde Turhan vd. (2015) tarafından biber bitkisinde yapılan çalışmada da yüksek sıcaklık uygulamalarının toplam protein miktarını belli sıcaklık derecelerine kadar azalttığı belirlenmiştir. Domateste yapılan bir çalışmada ise bitkiler 25/18°C gündüz/gece sıcaklığında yetiştirildikten sonra sıcaklık kademeli olarak 2 saatte bir 1°C arttırılarak 42°C'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta bitkiler 6 saat tutulmuştur. Daha sonra sıcaklık tekrar kademeli olarak düşürülerek normal koşullara getirilmiştir. Sıcaklık stresinin,

kloroplastlarda küçük molekül ağırlıklı HSP'lerin sentezini arttırdığı belirlenmiştir (Heckathorn vd., 1998).

Literatürde yer alan bir diğer bilgi ise HSP lerin, enzimleri ve nükleik asitleri denaturasyondan koruyarak sıcaklık toleransında rolü olduğudur (Salisbury ve Ross, 1992). Bitkilerde yüksek sıcaklığa tolerans ve HSP arasında korelasyon olduğu belirlenmekle birlikte (Lee ve Vierling, 2000), sıcaklığa toleransı sağlayan HSP nin fonksiyonları ile ilgili direkt bir kanıt mevcut değildir. Yüksek sıcaklık stresi sırasında ve sonrasında bitki solunumunda elektron transportu olumsuz etkilenmektedir. Stres durumlarında elektron transportunun devam etmesi için sHSP'lerin önemli olduğu belirtilmiştir. Mitokondrilerin termal toleransı, mitokondriyal HSP birikimini de etkilemektedir. Yüksek sıcaklık stresi proteinlerin yapısal değişimine yol açar. Böylece proteinler denatüre olur, proteolitik enzimler duyarlı hale gelir. Yüksek sıcaklığa adaptasyonun gelişmesi belli amino asitlerin birbirine göre yer değiştirmesi ile sağlanmaktadır. Proteinlerin denatürasyonu genellikle farklı hücrel çözeltiler (şekerler, organik asitler) tarafından korunmaktadır (Levitt, 1980).

Bölümümüzde daha önce taze fasulye ile yüksek sıcaklık stresi koşullarında yapılan çalışmalarda; Balkız, Ferasetsiz ve Yerel Genotip taze fasulye genotiplerinde toplam protein profilleri gösterilmiştir. Genotiplerin profilleri incelendiğinde; 27-157 kDa arası molekül ağırlığına sahip bantlar olduğu belirlenmiştir. Balkız genotipinde Ferasetsiz ve Yerel Genotipten farklı olarak 45, 65 ve 78 kDa'luk, Yerel Genotipten farklı olarak ise 34 kDa'luk protein bantları belirlenmiştir. Bantların yoğunluğu her üç genotipte de artan sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak azalmış, bu azalış özellikle 50°C'de belirgin olmuştur. 58 kDa büyüklüğündeki protein bandı her üç genotipte de en yoğun gözlenen protein bandı olmuştur. 58 kDa'luk protein bandının muhtemelen yapısal proteinlerden oluşan baskın bir bant olduğu ve bu bandın 50°C'de tüm genotiplerde azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan bazı protein bantlarının 50°C'de tamamen kaybolduğu görülmüştür. Ayrıca Balkız genotipinde 40°C'de 45 kDa'luk protein bandının sentezlendiği ve 45-50°C'de bu bantın tekrar kaybolduğu belirlenmiştir. Protein bantlarında yüksek sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen bu azalmanın, artan sıcaklıklarda protein yapısının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tokyol, 2016; Tokyol ve Turhan, 2019).

Literatürde konu ile ilgili yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Yüksek sıcaklığa tepki olarak yeni proteinlerin sentezlendiği ve yüksek sıcaklıklara bağlı olarak protein bantlarında azalmalar ve neredeyse tamamen kaybolmaların olduğu bildirilmektedir (Ergin, 2012). Ayrıca, domateste sHSP'lerin (Heckathorn, 1998; Turhan vd., 2014) ve çilekte 26 kDa'luk bir sHSP proteininin yüksek sıcaklıklarda tespit edilmesi yüksek sıcaklığa bir tepki olarak gösterilmektedir (Ledesma, 2004) Öte yandan Ergin (2012) kademeli ve şok yüksek sıcaklık uygulamalarında çilek yapraklarında 23 kDa'luk HSP60 proteininin yüksek sıcaklıklarda (46°C'den itibaren) biriktiğini belirlemiştir. Benzer şekilde Turhan vd. (2015) yüksek sıcaklık stresi koşullarında biber bitkisinde 7-54 kDa arası büyüklükte değişen bantlar tespit etmişler ve 40 kDa büyüklüğünde HSP proteininin yüksek sıcaklığa toleransla ilişkili olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma; 2019-2020 yıllarında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü sera ve laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Denemede 2 farklı taze fasulye genotipi olan Balkız ve Yerel Genotip kullanılmıştır. Kullanılan genotiplerin adları ve orijinleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Araştırmada kullanılan taze fasulye genotiplerinin orijinleri.

GENOTİP	ORİJİNİ
Balkız	Samsun-Bafra
Yerel Genotip	Mersin

3.2. Yöntem

3.2.1. Denemenin Kuruluşu

Denemede torf, perlit ve toprak (1:1:1) karışımı yetiştirme ortamı olarak kullanılmıştır. 14x12 cm ebatlarındaki saksılara hazırlanan karışım doldurulmuştur. Tohum ekimi her saksıda 1 bitki olacak şekilde yapılmıştır. Fideler 5-6 yapraklı döneme gelinceye kadar ortalama 4 hafta boyunca, ~%65 oransal nemde, 15–30°C (gece-gündüz) sıcaklıkta kontrollü serada yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).



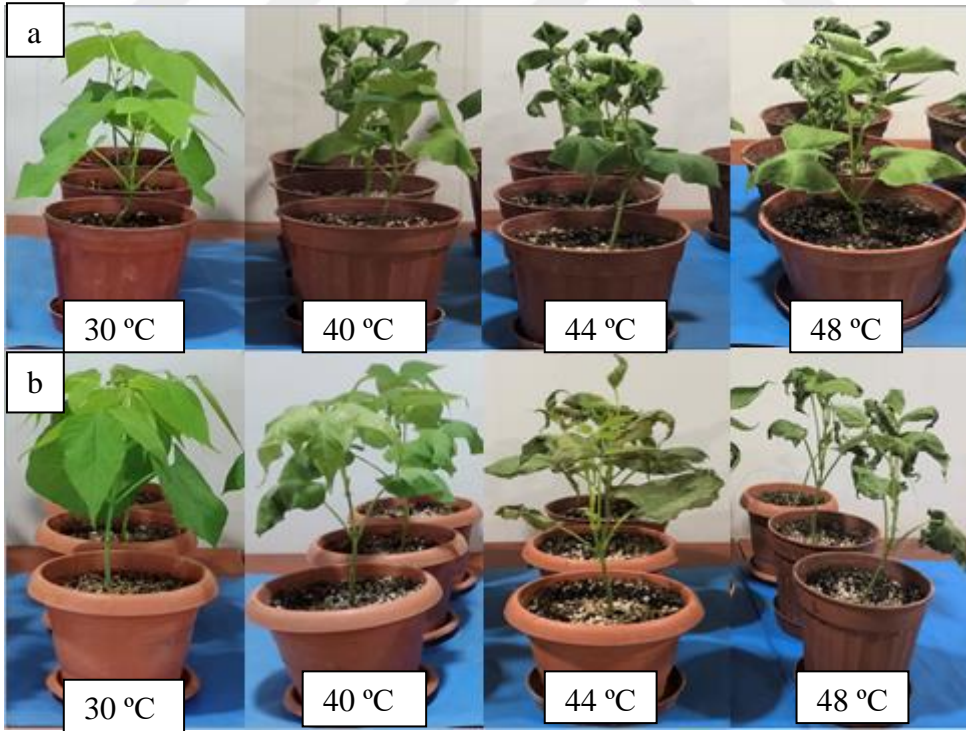
Şekil 3. 1.Taze fasulye bitkilerinin genel görünümü

3.2.2. Yüksek sıcaklık uygulamaları

Yüksek sıcaklık uygulamaları için serada kontrollü koşullarda yetiştirilen saksılı fasulye bitkileri laboratuvarındaki iklimlendirme kabine (DAIHAN WGC-1000, South Korea) yerleştirilmiştir. % 65 nem ve $450 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinin uygulandığı (Tokyo ve Turhan, 2019) kabinin sıcaklığı 30°C ' den başlayarak saatte 2°C artırılarak 40°C ' ye kadar yükseltilmiştir. Aynı uygulama 44 ve 48°C 'lik sıcaklık dereceleri için de yapılmıştır (Şekil 3.2). Her sıcaklıkta, 2 saatlik süreler sonunda örnek alınmıştır. Her uygulama sonunda genotiplerin görünümü Şekil 3.3'te verilmiştir. Deneme 3 tekrarlamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Her sıcaklık kademesinde bitkilerden alınan genç yaprak örneklerinin bir kısmı hücre membran zararlanma oranının belirlendiği iyon sızıntısı testi, YOSK ve TK ölçümlerinde kullanılırken diğer kısmı ise sıvı azot içerisinde dondurularak toplam çözünebilir protein (TÇP), prolin, SDS PAGE ve Western blot analizleri için -80°C ' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 2. Yüksek sıcaklık uygulamaları esnasında bitkilerin kabin içerisindeki görünümü.



Şekil 3. 3. Taze fasulye bitkilerinin yüksek sıcaklık uygulamaları sonunda görünümü a) Balkız Genotipi, b) Yerel Genotip

3.2.3. İncelenen parametreler

3.2.3.1. Hücre membran zararlanma oranı

Hücre membran zararlanmasının tespiti için Arora vd. (1998)' nin yöntemi esas alınmıştır. Genç yapraklar yüksek sıcaklık stresine daha duyarlı oldukları için iyon sızıntısı ölçümünde kullanılmıştır (Rehman vd., 2016). Hücre membran zararlanma oranının belirlenmesi için yapılan çalışmada; her bir fasulye genotipinin kontrol ve yüksek sıcaklık uygulanmış örneklerinden 5'er tekerrür olmak üzere 1,5 cm' lik yaprak diskleri alınmıştır. Alınan diskler önce saf suda yıkanıp ardından, havlu peçetelerde zarar vermeden kurulanmış ve deney tüplerine aktarılmıştır (her tüpe 1 yaprak diski aktarımı yapılmıştır). Yaprak disklerine 10 mL saf su eklenmiştir. Örnekler 4 saatlik süre boyunca orbital çalkalayıcıda (Thermo SCIENTIFIC,4334,USA) inkübasyona bırakılmıştır. Meydana gelen iyon sızıntısı örneklerin elektriksel iletkenliği EC metre (Mettler-Toledo, SevenCompact Conductivity S230, Switzerland) ile ölçülerek belirlenmiştir. Daha sonra örnekler otoklavda (ALP, CLG-32L, Japan) 121 °C'de 15 dakika tutularak dokuların öldürülmesi sağlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra örnekler 4 saat süre ile orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmış ve sonra yine EC metre ile ikinci okuma yapılmıştır. İyon sızıntısı değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$3.1: \% \text{ İyon sızıntısı} = (O.D_1/O.D_2) \times 100$$

Denklemden, O.D₁ = 1. Okuma Değeri, O.D₂= 2. Okuma Değeri temsil etmektedir.

$$3.2: \% \text{ Zararlanma} = [(\text{İyon sız. (U.)} - \% \text{ İyon sız. (K} / 100 - \% \text{ İyon sız. (K.)}] \times 100$$

Denklemden, U= Uygulama, K= Kontrol uygulamalarını temsil etmektedir.

Bu yöntemle genotiplerin hücre membran zararlanma oranları (%) belirlenerek yüksek sıcaklık toleransları saptanmıştır. Ayrıca LT₅₀ (Lethal temperature: bir popülasyondaki bireylerin %50'sinin yüksek zarara maruz kaldığı veya öldüğü sıcaklık derecesi) değeri hesaplanmıştır.

3.2.3.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK)

Yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan bitkilerde YOSK ve TK Barr ve Weatherley (1962)'e göre belirlenmiştir. Alınan yaprak örneklerinden 1,5 cm çaplı 3' er disk çıkartılmış; disklerin öncelikle taze ağırlıkları, 4 saat saf suda bekletildikten sonra turgor ağırlıkları ve 70°C' deki etüvde 24 saat tutulduktan sonra kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Elde edilen verilere göre YOSK ve TK değerleri hesaplanarak değerler % olarak ifade edilmiştir.

$$3.2: YOSK = (Y. A. - K. A.) / (T. A. - K. A.)$$

$$3.3: TK = (T.A. - Y.A.) / T.A. \times 100$$

Denklemden, Y. A. = Yaş Ağırlık, K. A. = Kuru Ağırlık, T. A. = Turgor Ağırlığı değerlerini temsil etmektedir.

3.2.3.3 Prolin analizi

Prolin ekstraksiyonu ve prolin miktarının belirlenmesinde Bates vd. (1973)'nin geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Reaksiyonun temeli prolin aminoasidinin ninhidrinle renk tepkimesi vermesi sonucu pembe (menekşe mor) renkli bileşik oluşturmasıdır. Örneklerin ekstraksiyonu için gereken %3'lük sülfosalisilik asit ile prolin miktarının belirlenmesi için gereken ninhidrin reaktifi bir gün önceden hazırlanarak 4 °C de dinlenmeye bırakılmıştır. Ninhidrin reaktifinin hazırlanması aşağıdaki kimyasalların hot plate de çözdürülmesi ile oluşturulmuştur;

- 1,25 g ninhidrin,
- 30 mL asetik asit
- 20 mL 6M fosforik asit.

Prolin analizi için, -80 °C'de tutulan bitki materyalinden 200 mg alınarak 1 mL %3'lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiş ve 1,5 mL lik tüplere aktararak 5000g ve 4 °C' de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan 200 µL süpernatant 2 mL lik test tüplerine aktarılmıştır. 200 µL süpernatant, 400 µL ninhidrin reaktifi, 400 µL asetik asit ve 200 µL

sülfosalisilik asit iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım su banyosunda 100 °C de 1 saat tutulmuştur. Ardından örnekler buza alınmış 2 mL toluen eklenerek 4000g de 20 saniye santrifüjlenmiştir. Tüm süpernatantın cam küvete çıkarılmasıyla birlikte 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede prolin miktarı ölçümü yapılmıştır. Kör örnek olarak 1 mL toluen kullanılmıştır. Prolin miktarının hesaplanmasında 0, 5, 10, 20, 40, 80 µg prolin içeren standartlar kullanılmıştır.

3.2.3.4 Toplam çözünebilir protein (TCP) analizi

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu Shen vd.'nin (2003) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam çözünebilir protein analizi için öncelikle 50 mL ekstraksiyon çözeltisi hazırlanmış ve pH değeri 2-Morfolinoetansülfonik asit monohidrat (MES) kullanılarak 7,8'e ayarlanmıştır. Ekstraksiyon çözeltisinin bileşenleri aşağıda verilmiştir:

- 25mM Tris base 0,151g
- 275mM Sakkaroz 4,705g
- 2mM EDTA 1mL (0,1M stok EDTA çözeltisinden)
- 10mM DTT 0,0771g
- 0,5mM PMSF 0,25mL (0,1M stok PMSF çözeltisinden)
- %1 PVPP 0,5g

Ekstraksiyon için ~ 250 mg bitki materyali 1 mL ekstraksiyon çözeltisi ile birlikte bir havana alınmış ve homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 10000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra oluşan üstteki sıvı fazdan 5-10 µL alınarak TCP miktarı 595 nm dalga boyunda Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Standart olarak 0, 4, 8, 10,20 40,60 µg/µL'lik Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltileri kullanılmıştır.

3.2.3.5 SDS-PAGE analizi

Yaprak dokularında protein profilleri SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiştir. SDS-PAGE analizinin yapılabilmesi amacıyla her bir örnek için 10 µg protein içerecek şekilde

hesaplama yapılmıştır. Toplam hacmin 1/6'sı kadar 6XSample Buffer örneklerin üzerine eklenerek, örneklerin hacmi eşitlenecek kadar ultra saf su ilave edilmiştir. Proteinlerin denatürasyonunu gerçekleştirmek için örnekler 3 dakika 100 °C suda tutulmuştur. Kısa süreli vortekslenen örnekler 5 saniyelik santrifüj uygulanmasının ardından SDS-PAGE analizi için yüklenmeye uygun hale getirilmiştir (Shen vd., 2003). Mini PROTEAN Tetra (Bio-Rad) elektroforez sistemi SDS-PAGE analizinin yapılmasında kullanılmıştır. SDS-PAGE jeli, %12,5'lük ayırma jeli ve %4'lük yükleme jelinden oluşmaktadır. Jel kalınlığının 0,75 mm olmasını sağlayan jel kasetleri kullanılmıştır.

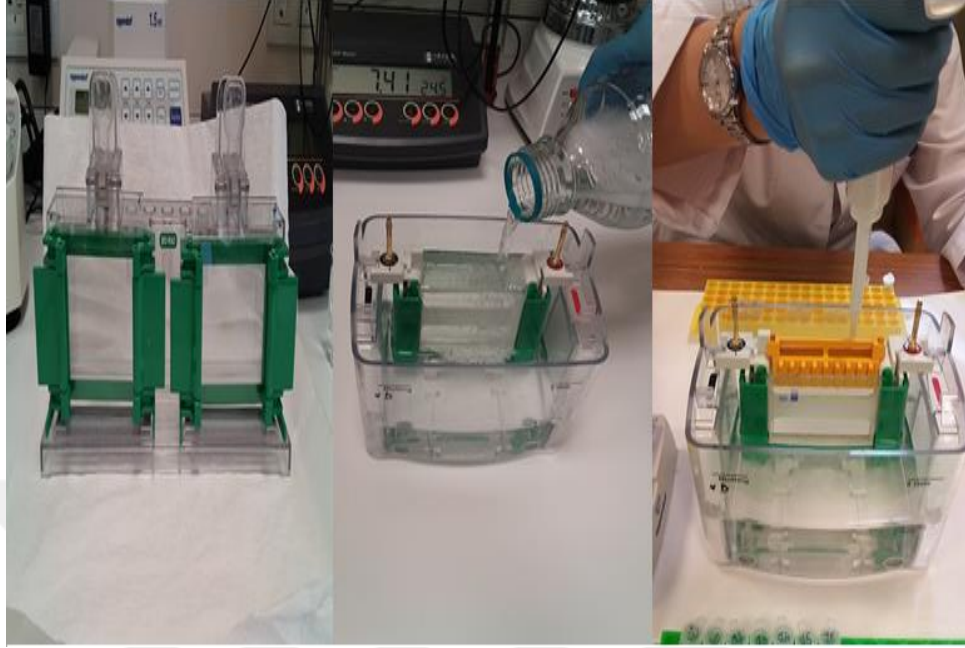
% 12,5 ayırma jeli bileşenleri:

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

Yukarıda verilen ayırma jeli bileşenlerinin karıştırılmasının hemen ardından mikro pipet aracılığıyla jel kaseti içerisine 3,5 mL dökülmüştür. Jelde bir sızıntı olup olmadığı kontrol edilmiş ve jelin havayla temasının önlenmesi amacıyla 200 µL saf su eklenerek 40-45 dakika boyunca jelin polimerleşmesi sağlanmıştır.

% 4 örnek yükleme jeli bileşenleri:

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



Şekil 3. 4. Polimerize olan jellerin tank içerisine yerleştirilmesi ve örnek yükleme.

Polimerize olmuş ayırma jeli üzerindeki ultra saf suyun kaba filtre kâğıdı ile alınmasının ardından yükleme jeli mikro pipet aracılığıyla 1 mL olacak şekilde dökülmüştür. Tarakların yerleştirilmesinin ardından jelin polimerizasyonu için 40-45 dk beklenmiştir. Sürenin tamamlanmasının ardından jel kasetleri tank içerisine yerleştirilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4). Elektroforezde kullanılacak olan yürütme tamponunun hazırlanması için aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır (1L, 10X). Hazırlanan çözelti kullanım esnasında 1X'e seyreltilmiştir.

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

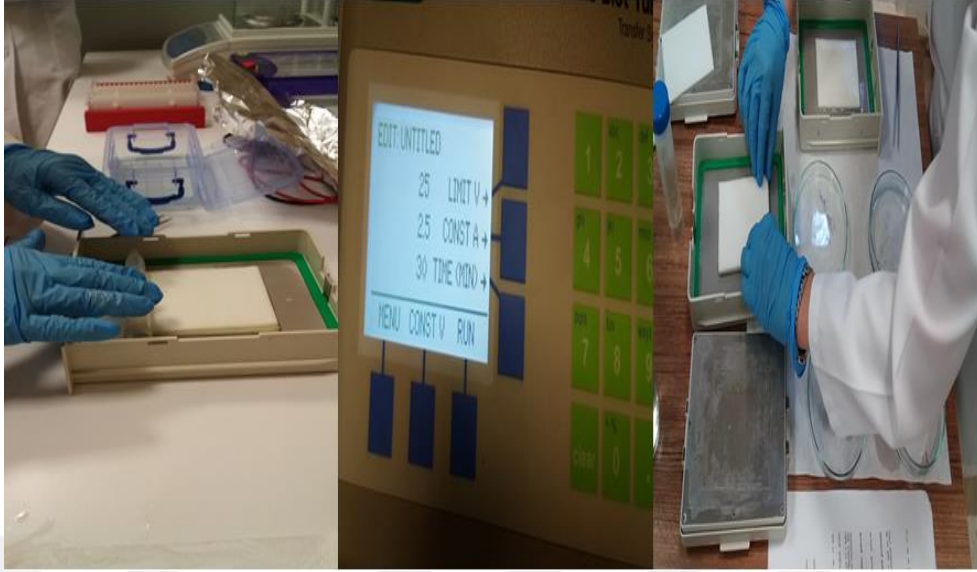
Bio-Rad PowerPac™ Basic güç kaynağı ile jelle 150 V ve 40 mA'lık elektrik akımı sağlanarak örneklerin jelde yürütülmesi 1 saat 20 dk sonunda tamamlanmıştır. Elektroforez işlemi oda sıcaklığında yapılmıştır. Jeldeki toplam protein bantlarının görüntülenmesi "Coomassie Brilliant Blue G-250" (1:4, metanol: boya solüsyonu) çözeltisi ile sağlanmıştır. Gece boyunca çalkalayıcıda bırakılan jellerin boya ile boyanması sağlanmıştır. Koyu mavi renk ile boyanan jellerdeki fazla boyanın uzaklaştırılması için öncelikle 3 kez saf su ile

yıkama işlemi yapılmış daha sonra % 25'lik metanolde 5 dk bekletilmiştir. Ardından yine 3 kez saf su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlemin ardından protein bantları görüntüleme sistemine (Vilber, Quantum ST4 Gel Imaging System, Fransa) alınarak incelenmiştir. Örneklerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi için elektroforez sırasında SDS-PAGE molekül ağırlık standardı (BioRad, Precision Plus Protein Unstained Standart) kullanılmış ve bu sayede molekül ağırlıkları bilinen bantlar temel alınarak örneklere ait protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.3.6 İmmünblot (Western Blot) analizi

HSP'lerin western blot tekniği ile belirlenmesinde Arora ve Wisniewski (1994)'nin uyguladığı yöntem Ergin (2012)'in modifikasyonlarıyla kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda toplam protein ekstraksiyonundan elde edilen protein örnekleri kullanılmış olup, proteinler SDS-PAGE'de yürütülmüştür.

Elektroforezin tamamlanmasının ardından kasetlerden jeller çıkarılmış ve blotlama aşamasına geçilmiştir. Bio-Rad Western blot yarı kuru blotlama ünitesi bu aşamada kullanılmıştır. Sandviç sistemini oluşturmak için yeni kasetlere jeller yerleştirilmiştir. Sandviç oluşturmak için süngerler ve filtre kâğıtları daha önceden transfer tamponu içerisinde ıslatılmışlardır. Ardından sünger-filtre kâğıdı-jel-membran-filtre kâğıdı-sünger şeklinde ve hava boşluğunun kalmaması amacıyla bir silindir aracılığıyla hafif basınç uygulanarak sandviç hazırlanmış, kasetlere yerleştirilmiştir. Cihazın blotlama ünitesine yerleştirilen kasetler 25 V, 1,0 A'lik akım uygulanarak 30 dk boyunca proteinlerin nitroselüloz membranlara aktarılması sağlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Hazırlanan sandviçin cihaza alınması ve cihazdan çıkarılması.

Transfer tampon çözeltisi bileşenleri (1 L):

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

Membranlar % 5'lik BSA içeren TBS (Tris Buffer Saline) içerisinde gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş, membran ile antikor arasındaki non-spesifik etkileşim alanının blokajı sağlanmıştır. Blokaj işleminin ardından membranlar, tris buffer saline tween-20 (TBST) çözeltisi içerisinde 2'şer kez 2'şer dk çalkalayıcı üstünde yıkanmıştır.

TBS çözeltisi bileşenleri (1 L)

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

TBST çözeltisi bileşenleri (1 L)

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

Primer antikor için 1:1500 oranında HSP 60 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 60 Clone LK-2 (mouse)], %1 BSA içeren TBST’de çözünmesi sağlanarak elde edilmiştir. Ardından membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmış ve çalkalayıcı üzerinde TBST’de 2’şer kez 10’ar dakika yıkanmıştır. Aynı işlem HSP 23 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 23 (rabbit)] antikoruna için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yıkama aşamasının ardından membranlar, TBST’de çözdürülerek hazırlanan ve %1 BSA içeren, 1:5000 oranındaki sekonder antikorda [HSP60 için; Anti mouse IgG (Fc) AP Conjugate, HSP23 için; Anti rabbit IgG (Fc) AP Conjugate] oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından membranlar çalkalayıcı üzerinde TBST’de 4’er kez 10’ar dk yıkanmıştır. Yıkama işlemiyle birlikte membran substrat (alkalin fosfataz enzimi) içerisinde bantlar görünür hale gelene kadar (yaklaşık 10-15 dakika) tutulmuştur. Daha sonra substrattan alınan membranlar saf su ile yıkanıp, kuruması sağlanmıştır. Değerlendirme aşamasına kadar membranlar saklanmıştır.

Membranlar üzerinde ortaya çıkan bant görüntüleri bir tarayıcı yardımıyla dijital ortama aktarılmıştır. Bantların densitometrik analizleri ise Amerikan Sağlık Enstitüsü’nün yayınladığı “Image J” programı (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) yardımıyla yapılmıştır.

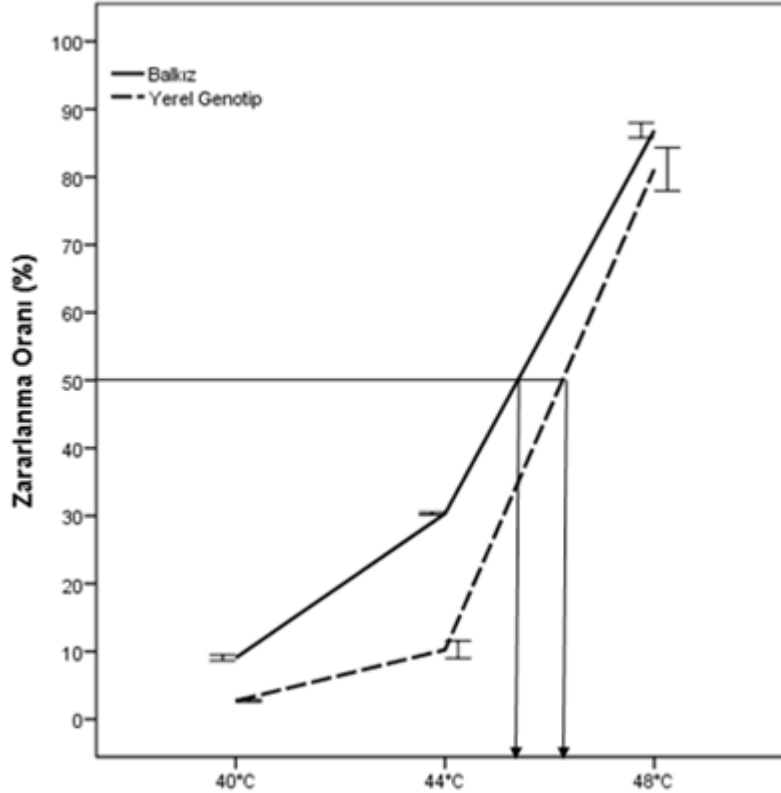
3.3. İstatiksel Analizler

Sonuçlar “SPSS Statistics for Windows 22” istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılık “Duncan” testi ile 0,05 önem seviyesinde ortaya konulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Membran Zararlanma Oranı ve Yüksek Sıcaklığa Tolerans (LT_{50})

Yüksek sıcaklık stresine bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin hücre membran zararlanma oranlarındaki değişimler ve hesaplanan stres tolerans noktası (LT_{50}) değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Genotipler ve uygulamalara göre ortalama hücre membran zararlanma oranları değerlendirildiğinde; Balkız genotipinde bu değer (%42,09) Yerel Genotipteki hücre membran zararlanma oranı değerinden (%31,36) daha yüksek olduğu görülmüştür. Uygulamalar karşılaştırıldığında ise, sıcaklık artışına paralel olarak hücre membran zararlanma oranının arttığı, bu artışın 48°C uygulamasında çarpıcı olduğu belirlenmiştir. 40°C’de %5,89 olan bu değer, 44°C’de %20,29 iken 48°C’de %84,00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Buna göre, genotipler, uygulamalar ve genotip ve sıcaklık uygulamaları arasındaki interaksiyon, %5 seviyesinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-A).



Şekil 4. 1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin yüksek sıcaklık tolerans değeri. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm SS$ larını göstermektedir.

Çizelge 4. 1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki hücre membran zararlanması. \pm SH' ları göstermektedir.

Genotip	Zararlanma Oranı (%)
Balkız	42,09 \pm 0,860
Yerel Genotip	31,36 \pm 0,860
Uygulamalar	
40°C	5,89 \pm 1,054
44°C	20,29 \pm 1,054
48°C	84,00 \pm 1,054
ANOVA	
Genotip	*
Uygulama	*
Genotip x Uygulama	*

*0,05 seviyesinde önemli

Diğer taraftan hücre membran zararlanma değerleri kullanılarak hesaplanan LT_{50} değerleri Balkız genotipinin (45,3°C) Yerel Genotipten (46,2°C) daha düşük yüksek sıcaklık toleransına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). Buna göre genotipler arasındaki farklılık %5 seviyesinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-B).

Balkız genotipi ile Yerel Genotip arasındaki yüksek sıcaklık tolerans derecesi farkı 0.86°C olarak belirlenmiştir. Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC)'nin raporuna göre dünyada 2035 yılına kadar yaklaşık olarak 0,3-0,7°C'lik sıcaklık artışı beklenmektedir. Ayrıca, bu yüzyılın sonuna kadar sıcaklık artışının 0,3-4,8°C'ye ulaşması öngörülmektedir (IPCC, 2014). Ortiz ve Cardemil (2001), LT_{50} değerini hücrelerde %50 membran zararının gerçekleştiği sıcaklıklar olarak tanımlamışlardır. Xy vd (2012) sekiz farklı kamelya çeşidinde yaptıkları çalışmada yüksek sıcaklık stresi altında LT_{50} değerinin 50°C ile 57°C arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Yüksek sıcaklığa maruz bırakılan iki farklı yaban mersini çeşidinde membran zararlanmasına bağlı olarak tolerans noktası değerinin yüksek sıcaklığa tolerant olarak belirlenen çeşitte 48,3°C iken hassas olarak belirlenen çeşitte 47,3°C olduğu belirlemiştir (Yu vd., 2016).

Yüksek sıcaklık stresi, biyomoleküllerin kinetik enerjisini ve hareketini artırır bu durum kimyasal bağların gevşemesine sebep olur. Sonucunda ise membran zararlanması meydana gelir (Zhao vd., 2021). Yüksek sıcaklık stresi, membran proteinlerinin yapısını etkileyerek, hücre membran sisteminin bütünlüğünü ve işlevini bozar. Yüksek sıcaklık stresinin bir tepkisi olarak meydana gelen hücre membran zararlanmasının en iyi göstergelerinden biri iyon sızıntısı ölçümüdür (Nijabat vd., 2020).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde Ergin (2012), çilek bitkisinde yüksek sıcaklık uygulamalarında, sıcaklık artışına paralel şekilde hücre membran zararlanma oranında artış meydana geldiğini belirtmiştir. Yine, yirmi beş hıyar genotipinin 30 gün boyunca kontrol (28°C/22°C) sıcaklığında büyütülmesinin ardından her gün 2°C sıcaklık artışı sağlanarak yedi gün sonunda sıcaklığın 40°C/32°C ulaşması sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tolerant olarak bilinen genotiplerde hücre membran zararlanması daha düşük, hassas olan genotiplerde zararlanma daha yüksek olarak belirlenmiştir (Ali vd., 2019).

Tokyol (2016), 3 farklı taze fasulye genotipinde yaptığı çalışmada yüksek sıcaklık tolerans derecesini Balkız genotipinde 45,5°C, Ferasesiz genotipinde 50,8°C, Yerel Genotipte ise 49,9°C olarak tespit etmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan genotiplerle aynı olan Yerel Genotipte yüksek sıcaklık stresi tolerans noktasının farklı hesaplanmasının sebebinin çalışılan materyalin genotip olmasının yanısıra yüksek sıcaklık toleransının belirlenmesi için uygulanan yöntemin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Söz konusu çalışmada, alınan yaprak diskleri su banyosuna yerleştirilerek sıcaklık uygulamasına maruz bırakılarak LT₅₀ değerleri hesaplanırken, bu tez çalışmasında ise tüm bitkiye sıcaklık uygulaması yapılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bu durumun hesaplanan stres tolerans noktaları değerlerinin farklı olmasına neden olduğu tahmin edilmektedir.

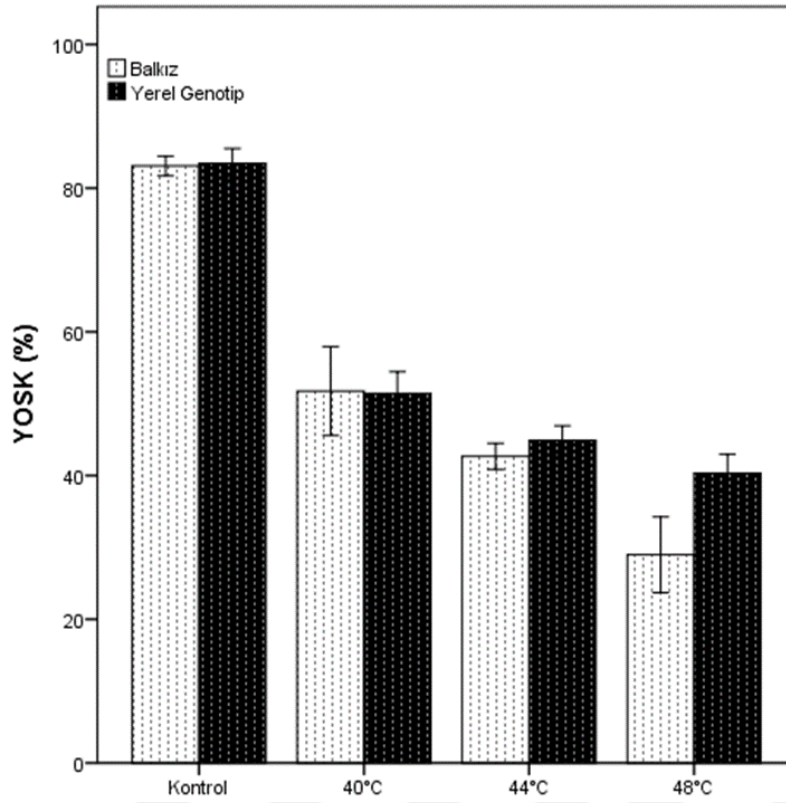
4.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK)

Yüksek sıcaklık stresine bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin YOSK değerlerindeki değişimler Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Genotipler ve uygulamalara göre ortalama YOSK oranları değerlendirildiğinde; Balkız genotipinde bu değer %51,62 iken Yerel Genotipte %55,03 olduğu görülmüştür. Uygulamalar

karşılaştırıldığında ise; kontrolde %83,27 olan YOSK değeri, 40°C'de %51,59, 44°C'de %43,78, 48°C'de ise %34,64 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Buna göre genotipler arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmazken uygulamalar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-C).

Yüksek sıcaklık uygulamalarının taze fasulye genotiplerinin yapraklarındaki TK değerlerindeki değişimleri Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir. Genotipler ve uygulamalara göre ortalama TK oranları değerlendirildiğinde; Balkız genotipinde bu değer %46,86 iken Yerel Genotipte %40,78 olduğu belirlenmiştir. Uygulamalar kıyaslandığında, kontrolde %15,38 olan TK değeri, 40°C'de %44,32, 44°C'de %51,63, 48°C'de ise %63,96 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Buna göre genotipler arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmazken uygulamalar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-D).

Yaprak oransal su kapsamı (YOSK), bitkilerin su durumunu değerlendirmek için kullanılır (Yamasaki ve Dillenburg, 1999). Yaprakta bulunan su ile transpirasyon hızı arasındaki dengeyi yakından yansıtmakta olup (Dhanda ve Sethi, 2002), bitkinin stres koşullarına uyumluluğunun değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Liu vd., 2008). Kumar vd. (2011), Maş fasulyesinde yüksek sıcaklık uygulamaları ile YOSK değerlerinde bir azalış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Turhan vd. (2014) farklı domates çeşitlerinde yaptıkları çalışmada sıcaklık artışına paralel olarak TK'da bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Kuo vd. (1988) tarafından yapılan çalışmada, Çin lahanasının tolerant olarak belirlenen çeşitlerinde TK'nın daha düşük olduğu gösterilmiştir.



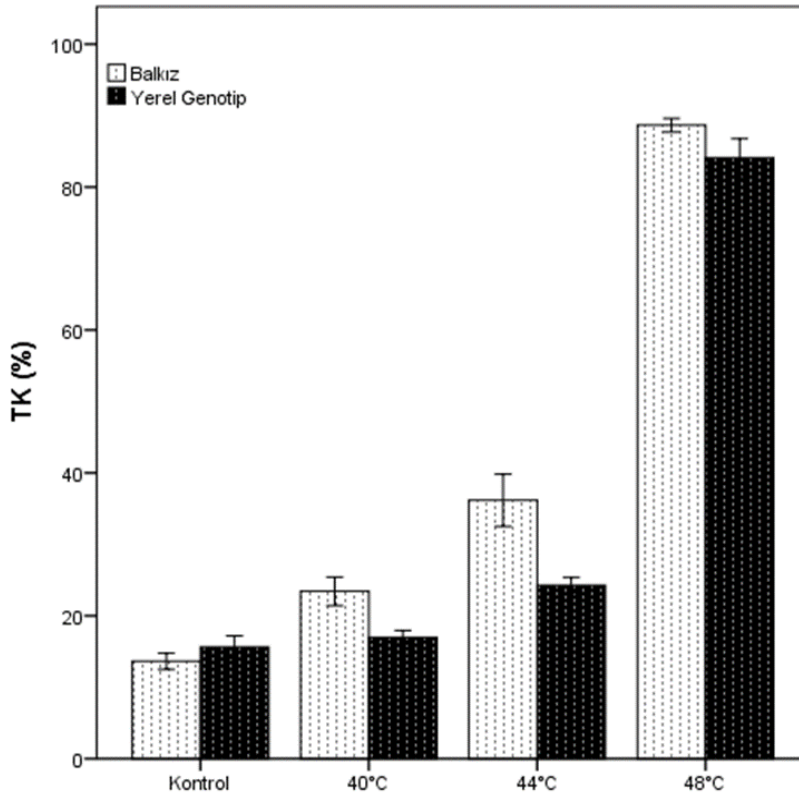
Şekil 4. 2. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin yaprak oransal su kapsamındaki (YOSK) değişim. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Çizelge 4. 2. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki yaprak oransal su kapsamı (YOSK). \pm SH' ları göstermektedir.

Genotip	YOSK (%)
Balkız	51,62 \pm 1,706
Yerel Genotip	55,03 \pm 1,706
Uygulamalar	
Kontrol	83,27 \pm 2,275
40°C	51,60 \pm 2,275
44°C	43,79 \pm 2,275
48°C	34,65 \pm 2,786
ANOVA	
Genotip	öd
Uygulama	*
Genotip x Uygulama	öd

*0,05 seviyesinde önemli

öd= önemli değil



Şekil 4. 3. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin turgor kaybındaki (TK) değişim. Dikey barlar tekrerrlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Çizelge 4. 3. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki turgor kaybı (TK). \pm SH' ları göstermektedir.

Genotip	TK (%)
Balkız	46,87 \pm 2,139
Yerel Genotip	40,78 \pm 2,268
Uygulamalar	
Kontrol	15,38 \pm 3,024
40°C	44,32 \pm 3,024
44°C	51,64 \pm 3,024
48°C	63,97 \pm 3,381
ANOVA	
Genotip	öd
Uygulama	*
Genotip x Uygulama	öd

*0,05 seviyesinde önemli

öd= önemli değil

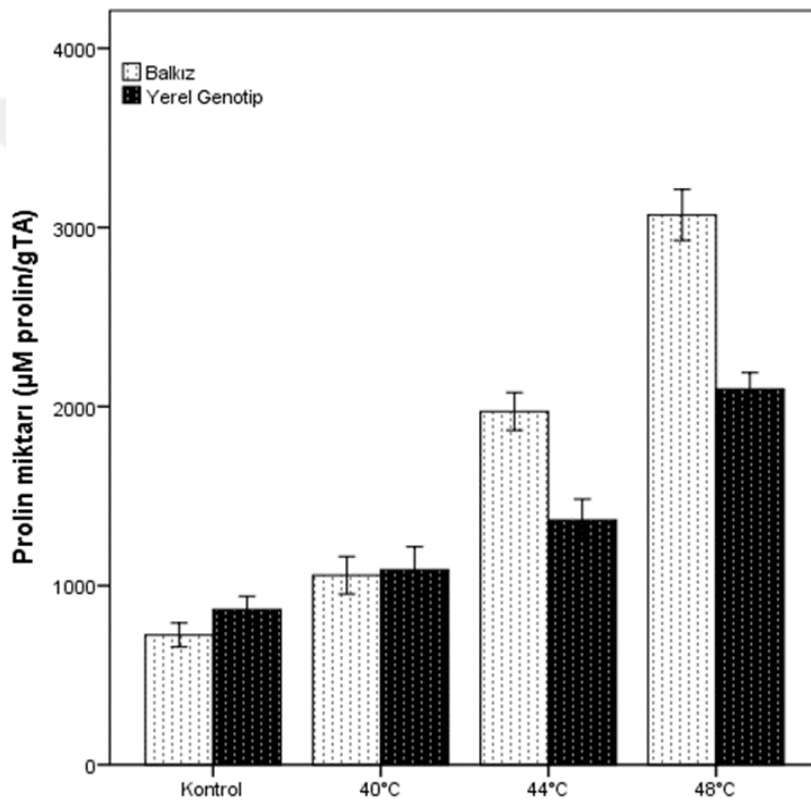
4.4. Prolin

Yüksek sıcaklık stresinin taze fasulye bitkilerindeki prolin miktarları üzerindeki etkileri Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4' de verilmiştir. Genotiplerin ortalama prolin miktarı kıyaslandığında; Balkız genotipindeki 1706 $\mu\text{M/gTA}$ prolin değerinin, Yerel Genotipteki 1354 $\mu\text{M/gTA}$ değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Uygulamaların ortalama prolin değerleri kıyaslandığında, kontrol sıcaklığında 794 $\mu\text{M/gTA}$ olan prolin değeri, 40°C'de 1073 $\mu\text{M/gTA}$ ve 44°C'de 1669 $\mu\text{M/gTA}$, 48°C'de ise 2584 $\mu\text{M/gTA}$ olarak belirlenmiştir. Sonuçlar prolin miktarının yüksek sıcaklık uygulamalarıyla sürekli arttığını göstermektedir. Buna göre, genotipler, uygulamalar ve genotip ve sıcaklık uygulamaları arasındaki interaksiyon, %5 seviyesinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-E).

Prolin stres kaynaklı bir hasarın sonucu olarak birikmekte, hücrelerde ozmoregülatör ve ozmoprotektan olarak görev yapmaktadır (Öztürk ve Demir, 2002). Prolin birikimi ile bitki stres toleransı arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmekte (Dar vd., 2016), strese toleranslı olarak bilinen çoğu bitki çeşidinde, hassas olan çeşitlere oranla daha yüksek seviyede biriktiği bildirilmektedir (Kılıç, 2020). Prolin birikimi bitki türüne özgü olup yüksek sıcaklık stresi altında domates ve tütünde önemli derecede artarken, nohut ve arpada bu değişimin daha düşük seviyelerde olduğu bildirilmiştir (Bokszczanin, 2013). Bu durumun aksine, Stoneville-453 pamuk çeşidinde yapılan çalışmada, bitkiler 30°C (kontrol), 38°C ve 45°C'ye farklı sürelerle maruz bırakılmıştır. Uygulamaların ardından prolin sonuçları incelendiğinde; kontrole kıyasla 38°C ve 45°C'de prolin miktarı ciddi bir düşüş göstermiştir (Gür vd., 2010). Beş günlük lablab fasulyesi (*Dolichos labla*) fidelerine ön sıcaklık alıştırmaları (2 saat-35°C) uygulanmış, ardından 5 saat 45°C'de sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Ön sıcaklık alıştırmaları uygulanan bitkilerdeki prolin içeriği oranının ön sıcaklık alıştırmaları uygulanmayan bitkilere oranla daha düşük olduğu gösterilmiştir (D'souza ve Devaraj, 2013).

Kumar vd., 2012 mısır ve çeltik genotiplerinde yaptıkları çalışmada, bitkileri 30/25°C'de (kontrol) yetiştirmişler ve bitkileri 35/30°C, 40/35°C, 45/40°C sıcaklıklara maruz bırakmışlardır. Genotiplerin prolin içeriğinde 45/40°C'de bir düşüş gözlemlenmiştir. Ayrıca, mısır genotiplerindeki prolin içeriğinin çeltik genotiplerindeki prolin içeriğinden

%62 daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek sıcaklık stresinin *Aloe vera* ve *Bryophyllum pinnatum* yapraklarındaki serbest amino asit profilleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kontrol bitkileri $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan bitkiler $38-43^{\circ}\text{C}$ olmak üzere iki farklı koşulda yetiştirilmiştir. Araştırmacılar, yüksek sıcaklık stresine tepki olarak her iki bitki türünde de prolin ve serin birikirken, alanin ve glisin konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir (Kumari ve Kumar, 2019).



Şekil 4. 4. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerindeki prolin miktarı ($\mu\text{M/g TA}$). Dikey barlar tekerrürlerin $\pm SS$ 'lerini göstermektedir.

Çizelge 4. 4. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki prolin miktarı. \pm SH' ları göstermektedir.

Genotip	Prolin miktarı (μM prolin/ gTA)
Balkız	1706 \pm 54,935
Yerel Genotip	1354 \pm 53,589
Uygulamalar	
Kontrol	794 \pm 72,505
40°C	1074 \pm 88,250
44°C	1669 \pm 68,358
48°C	2584 \pm 76,426
ANOVA	
Genotip	*
Uygulama	*
Genotip x Uygulama	*

*0,05 seviyesinde önemli
öd= önemli değil

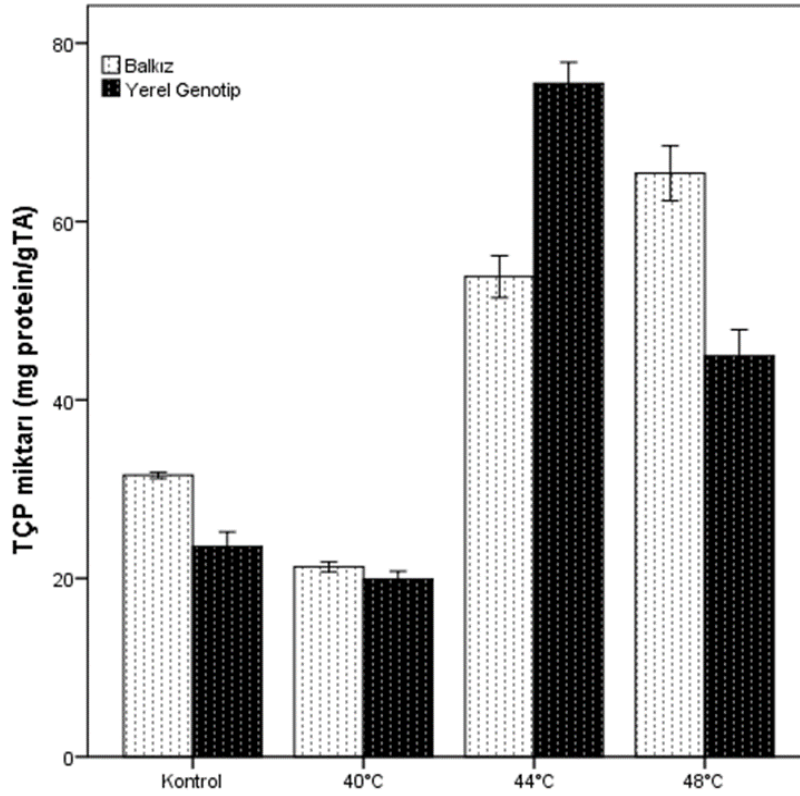
4.5. Toplam çözünebilir protein (TÇP) miktarı

Şekil 4.5. ve Çizelge 4.5.'de TÇP miktarının yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerindeki değişimi görülmektedir. Buna göre Balkız genotipinde TÇP miktarı (43,02 mg protein/gTA) Yerel Genotipin TÇP miktarından (40,98 mg protein/gTA) daha yüksek bulunmuştur. Uygulamalar kıyaslandığında 40°C'de 20,60 mg protein/gTA ile TÇP miktarının kontrol uygulamasına göre bir azalış olduğu 44°C'de ise 64,65 mg protein/gTA miktarıyla önemli bir artış olduğu görülürken, 48°C'de 55,17 mg protein/gTA ile genotiplerin TÇP miktarlarında 44°C'ye göre tekrar azalış olduğu görülmüştür. Buna göre genotip, uygulama ve genotipler ile uygulamalar arasındaki interaksiyonun TÇP miktarına etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Ek Açıklama-F).

Yüksek sıcaklıkların proteinlerin yanlış katlanmasına sebep olarak denatüre etmesinin yanı sıra enzim yapılarını da etkileyerek enzim aktivitelerinin azalmasına sebep olduğu bilinmektedir (Riezman, 2004; Khan vd., 2019). Strese maruz kalan bitkilerde yeni proteinlerin sentezlenmesi veya sentezinin azalması, var olan proteinlerin yıkılması strese

karşı bir savunma mekanizması olarak gösterilmektedir (Baykal ve Öncel., 2006). Toplam çözünebilir proteinler stres koşulları altında en çok değişiklik gösteren bileşiklerdendir (Turfan, 2016). Yüksek sıcaklık stresinin dut (*Morus alba* L. cv. BC2-59) yapraklarındaki enzim ve proteinler üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada bitkiler 2, 4 ve 6 saat sürelerle 40°C'e sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Dut yapraklarında, toplam TÇP içeriği azalırken, toplam amino asit ve prolin içeriğinin arttığı belirtilmiştir (Chaitanya vd., 2001).

Bir çim türü olan (*Festuca trachyphylla*)'nın tolerant çeşidi Reliant IV ve hassas çeşidi Predator 21/18°C'de optimum sıcaklıkta büyütülmüş ve farklı sürelerle 38/33°C'de sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Sıcaklık stresine yanıt olarak Reliant IV ve Predator'de kontrole oranla, TÇP içeriği sırasıyla %76 ve %66 seviyesine düşmüştür. Ayrıca yedi temel amino asit içeriği (histidin, glutamin, glutamat, prolin, treonin, aspartat ve triptofan) artmıştır, bu artış Reliant IV'de daha fazla olmuştur (Wang vd., 2018).



Şekil 4. 5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinin TÇP miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Çizelge 4. 5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye yapraklarındaki TÇP miktarı. \pm SH' ları göstermektedir.

Genotip	TÇP miktarı (mg protein/ gTA)
Balkız	43,02 \pm 1,016
Yerel Genotip	40,98 \pm 1,016
Uygulamalar	
Kontrol	27,56 \pm 1,437
40°C	20,60 \pm 1,437
44°C	64,65 \pm 1,437
48°C	55,18 \pm 1,437
ANOVA	
Genotip	öd
Uygulama	*
Genotip x Uygulama	*

*0,05 seviyesinde önemli
öd= önemli değil

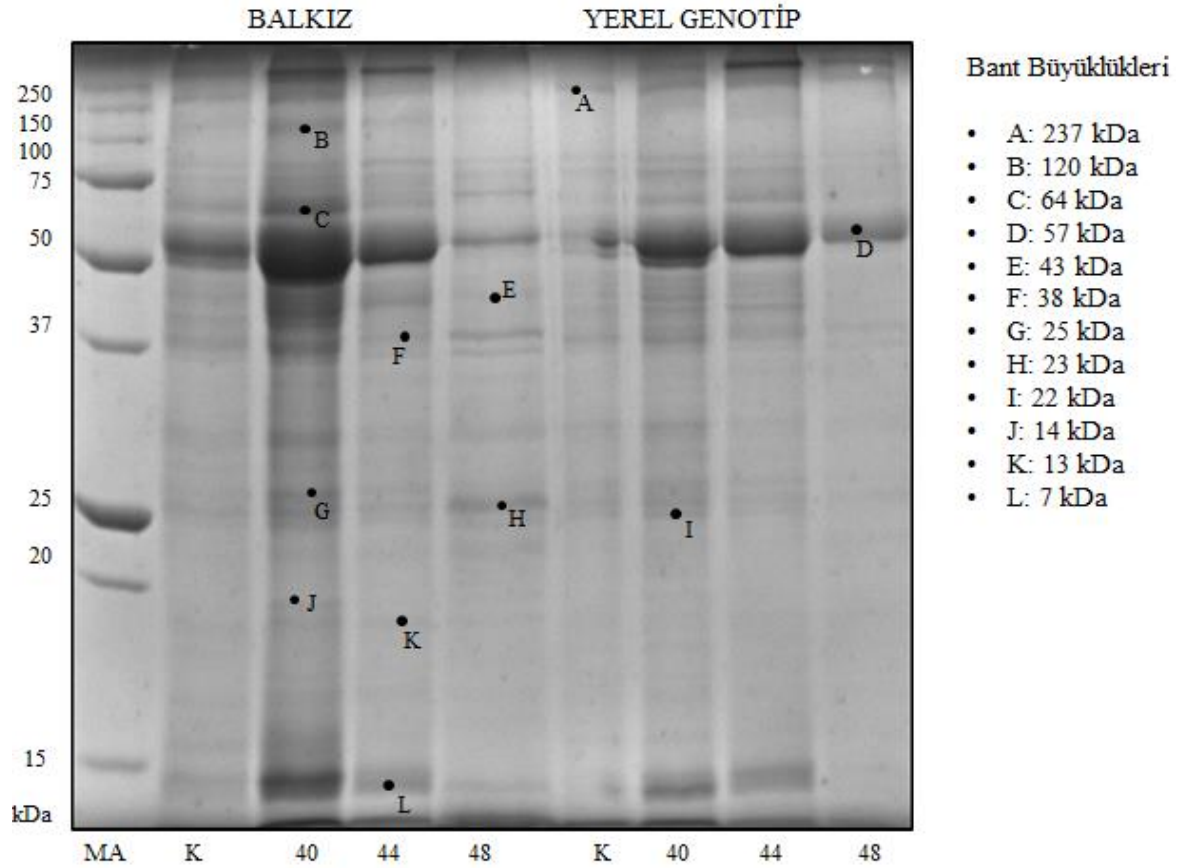
4.6. SDS-PAGE

Balkız ve Yerel Genotip taze fasulye genotiplerine ait toplam protein profilleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Balkız genotipinde ve Yerel Genotipte 40°C'de 43, 64 ve 120 kDa büyüklüğünde bantların yoğunluğunda artış görülürken 44 ve 48°C'de bu bantların azaldığı görülmüştür. Yine 13 ve 14 kDa'luk protein bantlarının Yerel Genotipten farklı olarak Balkız genotipinde 40°C ve 44°C'de arttığı belirlenmiştir. Balkız ve Yerel Genotipte 22 kDa, 25 kDa ve 38 kDa'luk proteinler kontrole oranla artan sıcaklıklarla daha yoğun bir şekilde gözlemlenmiştir. Balkız genotipinde 48°C'de 23 kDa'luk protein bandında artış gözlemlenmiştir. Muhtemelen yapısal protein bandı olduğu düşünülen 57 kDa'luk protein bandı her iki genotipte de yoğun olarak gözlemlenmiştir. Balkız ve Yerel Genotipte artan sıcaklık uygulamalarıyla genellikle bantların yoğunluğunda azalış görülmüş, bu azalış 48°C'de daha belirgin hale gelmiştir.

He ve Huang (2007), 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulamalarında (*Poa pratensis* L.)'in üç çeşidinde kontrol sıcaklığında (20°C) bulunan 150 ve 66 kDa'luk bandın 40°C'de kaybolduğunu tespit etmişlerdir. Dut yapraklarında 2, 4 ve 6 saat 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda 68 ve 85 kDa büyüklüklerinde iki yeni protein bandı sentezlendiği

belirlenmiştir (Chaitanya vd., 2001). Rani vd., (2016) hardalda 45°C'lik sıcaklık uygulaması sonucunda 25.8 ve 30.7 kDa büyüklüğünde iki protein bandı belirlemiştir.

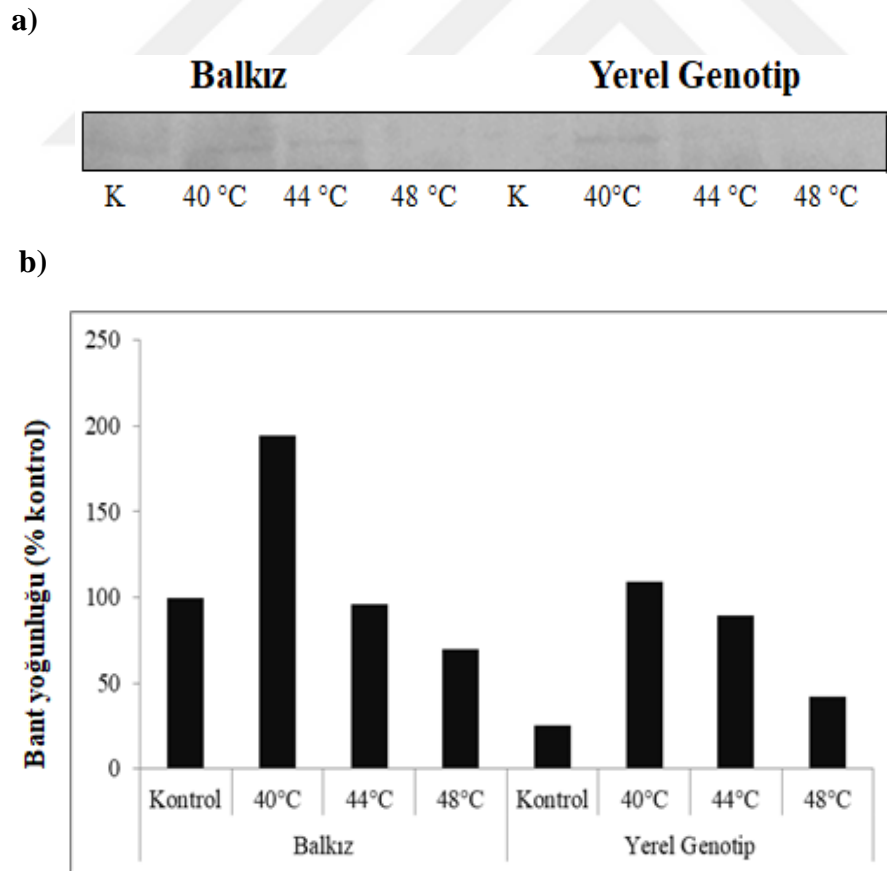
Mısır, çavdar ve buğday bitkileri 42°C'de 3 saat sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Mısırdaki 28, 23, 22, 20 ve 19 kDa proteinleri belirlenirken buğday ve çavdarda 20 kDa protein belirlenmiştir. Buğday ve çavdara oranla mısırın yüksek sıcaklıklara daha yüksek toleransa sahip olmasının sebebinin çeşitli proteinleri daha fazla sentezlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Korotaeva vd., 2001). Maş fasulyesinde 2 saat 42°C yüksek sıcaklık uygulaması sonucunda moleküler ağırlığı 20, 21.5, 23, 29, 34, 38, 55, 62, 70 ve 85 kDa olan bantlar belirlenmiştir (Wu ve Laidman, 1997).



Şekil 4. 6. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde toplam protein profilleri (MA: Moleküler Ağırlık Standardı, K: Kontrol, kDa: Kilodalton)

4.7. İmmünblot (Western Blot)

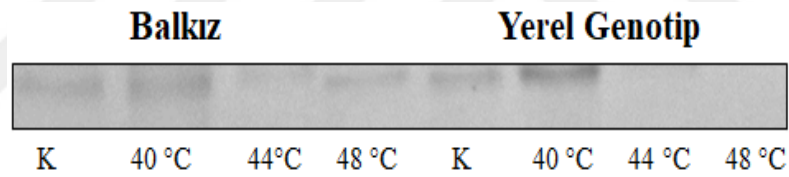
İmmünoblot analizleri sonucunda, kullanılan HSP60 antikoru ile taze fasulye yaprak dokularında yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak belirlenen 64 kDa'luk HSP'nin durumu Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Buna göre, Balkız genotipinde 40°C sıcaklıkta HSP60 proteini kontrolün hemen hemen iki katı kadar artış göstermiştir. Fakat 44°C'de tekrar kontrole yakın düzeye gerilemiştir. Sıcaklığın 48°C'ye ulaşması ile HSP60 proteini kontrole oranla düşüş göstermiştir. Balkız genotipinde 48°C'de HSP60 proteinin tolerans sağlamada bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Yerel Genotipte ise kontrol uygulamasında minimum seviyede olan HSP60 proteini 40°C'de artış göstermiştir. Sıcaklığın 44°C'ye ulaşmasıyla HSP60 proteininde yine kontrole oranla bir artış meydana gelirken bu artış 48°C'de daha düşük düzeyde olmuştur. Yerel Genotipte HSP60 proteinin yüksek sıcaklıklarda tolerans sağlamada ilişkili bulunmuştur.



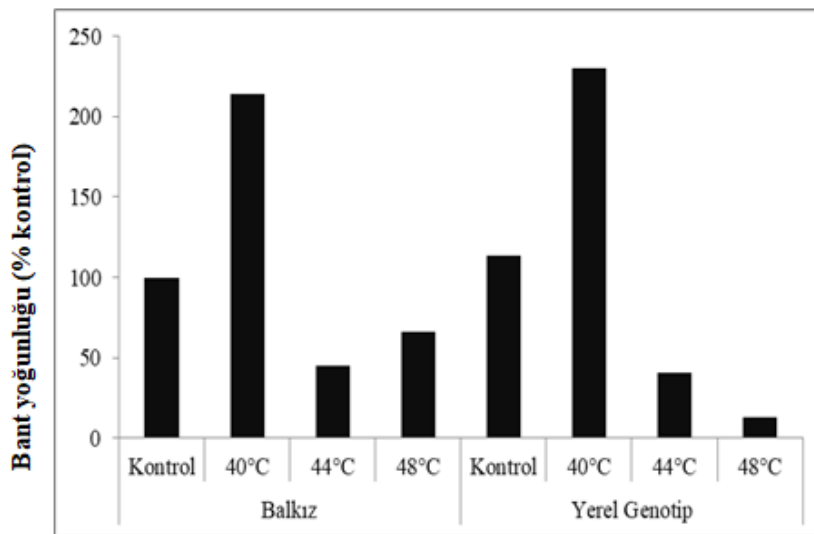
Şekil 4. 7. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde HSP60 proteininin görünümü (a) ve HSP60 proteinin bant yoğunluğu (b). (K: Kontrol)

Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak HSP23 antikoruna ile yoğunluğu değişen 23 kDa'luk HSP'nin durumu Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Buna göre, Balkız genotipinde 40°C'de maksimum seviyede olan HSP23 proteininin 44°C sıcaklıkta azaldığı görülmektedir. Sıcaklığın 48 °C'ye gelmesiyle HSP23 proteininin kontrole oranla tekrar düşüşe geçtiği görülmektedir. Balkız genotipinde 40°C'de HSP23 proteininin yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada etkili olduğu bulunurken 44°C'de ve 48 °C'de bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yerel Genotipte kontrole oranla 40°C'de ciddi bir artış görülmektedir. Sıcaklığın 44°C'ye gelmesiyle azalma görülürken bu azalma 48°C'de maksimum seviyeye çıkmıştır. Yerel Genotip'teki HSP23 bant yoğunluğu ve artışının Balkız genotipinden yüksek olduğu görülmektedir. Yerel Genotipte 40°C'de HSP23 yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada etkili iken 44°C ve 48°C sıcaklık uygulamalarında yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada bir ilişki bulunamamıştır.

a)



b)



Şekil 4. 8. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak taze fasulye genotiplerinde HSP23 proteininin görünümü (a) ve HSP23 proteininin bant yoğunluğu (b). (K: Kontrol)

Isı şoku proteinleri stresten zarar görmüş proteinlerin renatürasyonunu sağlayan, moleküler şaperon işlevlerine sahip yüksek oranda korunmuş proteinlerdir (Zhang vd., 2013). Literatürde yüksek sıcaklık tepkisi esnasında hücrel protein sentezinin azaldığı buna karşılık HSP sentezinde bir artış olduğu belirtilmektedir (Sun vd., 2002; Gülen ve Eriş 2004; Efeoğlu, 2009). Örneğin, soya fasulyesinde yapılan bir çalışmada 28°C'den (kontrol), 40°C'ye artan sıcaklık uygulaması durumunda normal protein sentezinin azaldığı, HSP sentezinin arttığı bildirilmektedir (Lin vd., 1984). Ledesma vd., (2004) yaptıkları çalışmada yüksek sıcaklık altında sHSP sentezinin bitkide termotoleransla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Maş fasulyesinde 2 saat 42°C sıcaklık uygulamasının ardından HSP29 proteininin termotolerans ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Wu ve Laidman, 1997). Xu vd., (2011) yaptıkları çalışmada kademeli ve şok sıcaklık stresine maruz bırakılan çim bitkilerinde HSP23, HSP36 ve HSP66 proteinlerini termotoleransla ilişkilendirmişlerdir.

Western blot tekniği, proteinlerin immünolojik tespiti için kullanılan en yaygın kullanılan tekniktir (Kim, 2017). Üç çeltik çeşidi olan Nipponbare, Azucena (hassas) ve Co39 (tolerant) 12 ve 24 saat 42°C sıcaklık uygulamasına maruz bırakılmıştır. Tüm çeşitlerde HSP26,7, HSP23,2 ile 17,9 kDa class I ısı şoku proteini (HSP17,9A), HSP17,4 ve 16,9 kDa class I ısı şoku proteini (HSP16,9A) sentezinin arttığı ve tolerant çeşitte daha yüksek olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu beş sHSP grubunun çeltikte biyomarkör olarak kullanılabileceğini belirtmektedir (Chen vd., 2014). Yine, sıcaklık stresinin 12 ve 24 saat 42°C olarak uygulandığı Dongjin çeşidi çeltik bitkisinde, HSP60, HSP70, HSP100 ve sHSP'ler dahil olmak üzere 18 adet HSP belirlenmiştir. Araştırmacılar belirlenen HSP'lerin çeltikte stres-cevap mekanizmasının iyi anlaşılmasına katkı sağladığını belirtmektedir (Lee vd., 2007). He ve Huang (2007), 40°C sıcaklık uygulamalarında (*Poa pratensis L.*)'in hücre mebranında 39 kDa ve 45 kDa'luk HSP'lerin sitoplazmada ise 64, 78 ve 85 kDa'luk HSP'lerin tespit edildiği göstermişlerdir.

Domateste 40°C sıcaklık uygulamasının ardından, HSP23,8 proteininin 40°C'de bol miktarda biriktiği belirtilmiştir (Liu ve Shono, 1999). He vd (2005) yaptıkları çalışmada, *Agrostis palustris*'in Penncross çeşidinde ani ve kademeli yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda, HSP23, HSP36 ve HSP66 proteinlerinin her iki uygulama sonucunda da arttığı

belirlenmiştir. Güvercin bezelyesinin (*Cajanus cajari*) kök kısımlarında bulunan mitokondrilerde yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda 18 kDa ve 60 kDa büyüklüğünde HSP proteinleri belirlenmiştir (Kishore ve Upadhyaya, 1988). Farklı sıcaklık derecelerine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* hücre kültürlerinde sıcaklığın artması ile HSP60 sentezinde artış olduğu görülürken sıcaklığın 50°C'ye gelmesi ile HSP60 seviyesi düşüş göstermiştir (Rikhvanov cd., 2007). Domateste yüksek sıcaklık uygulamaları (42°C) sonucunda kloroplastlarda HSP60 sentezinin artması ile yüksek sıcaklığa tolerans arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir (Preczewski vd., 2000).

Yüksek sıcaklığa tolerant (R. Hope) ve hassas (CG3) olduğu bilinen iki çilek çeşidinde yapılan çalışmada bitkiler kademeli ve şok sıcaklık uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Western blot analizleri sonucunda, yüksek sıcaklıklarda her iki çilek çeşidinde de 23 kDa HSP'nin yoğunluğunun arttığı ve bu artışın, R. Hope'da daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, çilek bitkisinde 23 kDa HSP yüksek sıcaklığa tolerans ile ilişkilendirilmiştir (Ergin, 2012). Balkız ve Yerel Genotip'in Western blot analizleri sonucunda, her iki genotipte de HSP23 ve HSP60 proteinlerinin özellikle 40°C' de arttığı belirlenmiştir. Yüksek sıcaklığa tolerant olduğu bilinen Yerel Genotip'teki HSP60 ve HSP23 proteinlerinin yoğunluğu ve artışının Balkız genotipinden daha fazla olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bitkiler stres faktörü olarak algıladıkları yüksek sıcaklıklara karşı fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevaplar geliştirerek uyum sağlayabilmektedirler. Yüksek sıcaklık stresine karşı oluşturulan tepkiler, stresin süresi ve şiddetiyle, bitki türüyle alakalı karmaşık bir yanıttır. Taze fasulye bitkisi zengin besin içeriği, çeşitli kullanım alanları, yetiştirme kolaylığı gibi pek çok özelliği sebebiyle avantaj sağlayan önemli bir bitkidir. Bu çalışmada araştırılan taze fasulye genotiplerinde yüksek sıcaklık stresininin sebep olduğu zararlanma ve fizyolojik değişim hücre membran zararlanma oranı, YOSK ve TK parametreleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklıklara bağlı olarak prolin, TÇP ve HSP60 ile HSP23 antikoru kullanılarak HSP'lerdeki değişim belirlenmiştir.

Taze fasulye bitkisinde yüksek sıcaklık stresine toleransta genotipsel farklılığa sebep olan bulgular aşağıda özet olarak belirtilmiştir:

- Balkız genotipinde hücre membran zararlanma oranı Yerel Genotip'ten daha yüksek bulunmuştur. Her iki genotipte de sıcaklık artışına paralel olarak hücre membran zararlanma oranı artmış bu oran 48°C'de en yüksek seviyede olmuştur. Balkız ve Yerel Genotip'in YOSK ve TK değerleri incelendiğinde; her iki genotipte YOSK değeri en yüksek düzeydeyken artan sıcaklıklarla birlikte azalmış özellikle 48°C'de en düşük düzeye inmiştir. Yerel Genotipteki YOSK değerinin Balkız genotipinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, Balkız genotipinde TK miktarı Yerel Genotipten yüksek bulunmuştur. Sıcaklık artışıyla birlikte TK miktarlarında bir artış görülmüş bu artış 48°C'de en yüksek seviyeye ulaşmıştır.
- Taze fasulye genotiplerinin yüksek sıcaklığa tolerans sıcaklıkları (LT₅₀) Balkız genotipinde 45,3°C, Yerel Genotipte ise 46,2°C olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Yerel Genotipin Balkız genotipine göre yüksek sıcaklığa daha toleranslı olduğunu göstermiştir.
- Balkız ve Yerel Genotipte yüksek sıcaklık stresiyle prolin birikimi sürekli artış göstermiştir ve artan sıcaklık dereceleriyle TÇP içeriğinde 48°C'de belirgin bir

azalış olmuştur. Protein profilleri incelendiğinde; bazı protein bantlarının azalmasına karşın yeni sentezlenen proteinlerde belirlenmiştir. Her iki genotipte de 64 kDa'luk bant 40°C'de bir artış göstermiştir. Ayrıca, Balkız genotipinde 48°C'de 23 kDa'luk protein bandında artış belirlenmiştir.

- İmmünblot analizi sonuçları ile yüksek sıcaklık stresi sonucunda oluşan spesifik proteinlerin belirlenmesi sağlanmıştır. Her iki çeşitte de HSP60 ve HSP23 proteini 40°C'de en yüksek seviyede birikmiştir. Balkız genotipindeki HSP60 ve HSP23 proteini yoğunluğunun Yerel Genotipten daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HSP23 proteini Balkız ve Yerel Genotipte 40°C'de yüksek sıcaklığa tolerans sağlamada etkiliyken daha yüksek sıcaklıklarda etkili değildir. Yerel Genotip'te HSP60 proteini yüksek sıcaklıklarda tolerans sağlamada etkiliyken, Balkız genotipinde 48°C'de HSP60 proteinin yüksek sıcaklıklara tolerans sağlamada bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre taze fasulye bitkisinde yüksek sıcaklık stresinin ve cevap mekanizmasının daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. Bu sayede, ileride yüksek sıcaklık stresinden sorumlu gen bölgelerinin belirlenmesi ve tolerant çeşitlerin geliştirilmesi gibi adımların temel basamağı bu çalışma ile oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., Szabados, L., 2010, Methods for Determination of Proline in Plants, *Methods Mol Biology*, 639, 317-331.
- Adams, S. R., Cockshull, K. E., Cave, C. R. J., 2001, Effect of Temperature on the Growth and Development of Tomato Fruits, *Annals of Botany*, 88, 869-877.
- Akarken, N., 2016, Bazı Mısır Genotiplerinin Yüksek Sıcaklığa Tolerans Faktörleri Bakımından Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 148 s.
- Ali, M., Ayyub, C. M., Amjad, M., Ahmad, R., 2019, Evaluation of thermo-tolerance potential in cucumber genotypes under heat stress, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(1), 53-61.
- Amirjani, M., 2012, Estimation of wheat responses to "high" heat stress, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 6(4), 222-233.
- Amutha, R., Muthulaksmi, S., Baby Rani, W., Indira, K., Mareeswari, P., 2007, Studies on Biochemical Basis of Heat Tolerance in Sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(4), 234-238.
- Al-Wahaibi, M.F., 2011, Plant heat-shock proteins: A mini review, *Journal of King Saud University –Science*, 23, 139–150.
- Arora, R., Pitchay, D.S., Bearce, B.C., 1998, Water stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissues: A possible linkage through stress proteins, *Physiologica Plantarum*, 103, 24-34.
- Aşkar T. K., Ergün N., Turunç, V., 2007, Isı Şok Proteinler ve Fizyolojik Rollerini, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13 (1), 109-114.
- Aydoğan, Ç., Turhan, E., 2013, Yüksek Sıcaklık Uygulamasının Keklik Barbunya Çeşidinin Bazı Fizyolojik Özelliklerine Etkisi" İç Anadolu Bölgesi 1. Tarım ve Gıda Kongresi, Bildiriler, Cilt I, Bitkisel Üretim, 278-283.
- Awasti, R., Bhandari, K., Nayyar, H., 2015, Temperature Stress and Redox Homeostasis in Agricultural Crops, *Frontier in Enviromental Science*, 3, 11.
- Babu, N. R., Devaraj, V. R., 2008, High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*), *Australian Journal of Crop Science*, 2(2), 40-48.
- Banerjee, A., Roychoudhury A., 2018, Small Heat Shock Proteins: Structural Assembly and Functional Responses Against Heat Stress in Plants, *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 1, 367-374.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barr, H.D., Weatherley, P.E., 1962, A Re-examination of the Relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves, Australian Journal of Biological Sciences, 15, 413-428.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies, Plant Soil, 39:205-207.
- Battisti, D.S., Naylor, R.L., 2009, Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat, Science, 323, 240-244.
- Baykal, Ş., Öncel, I., 2006, Buğday fidelerinin bor toksisitesine toleransında çözümlü fenolik ve çözümlü protein miktarındaki değişimler. Fen Bilimleri Dergisi, 27(1), 13-27.
- Bitá, C. E., Gerats, T., 2013, Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific Fundamentals and production of heat stress-tolerant crops, Frontier in Environmental Science, 4, 1-18.
- Bokszczanin, K. L., Fragkostefanakis, S., Bostan, H., Bovy, A., Chaturvedi, P., Chiusano, M. L., Winter, P., 2013, Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance, Frontiers in Plant Science, 4, 315.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., Vierling, E., 1996, Molecular chaperones and protein folding in plants, Plant Molecular Biology, 32, 191-222.
- Bozoğlu, H., Sözen,Ö., 2007, Some Agronomic Properties of the Local Population of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) of Artvin Province, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31, 327-334.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., vd., 2003, Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes, Plant and Soil, 252, 55–128.
- Burke, J.J., 2001, Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance, Physiologia Plantarum, 112, 167-170.
- Burke, J.J., O'Mahony, P.J., Oliver, M.J., 2000, Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance, Plant Physiology, 123, 575-587.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., 2012, Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(2), 97 – 110.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cansev, A., 2012, Physiological effects of high temperature treatments on leaves of olive cv. Gemlik, *Plant Archives*, 12(1), 521-525.
- Chaitanya, K.V., Sundar, D., Masilamani, S., Ramachandra Reddy, A., 2001, Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars, *Plant Growth Regulation*, 00, 1-6.
- Chang, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Hsu, F. C., Ko, S. S., vd., 2006, Arabidopsis Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation, *Plant Physiology*, 140(4), 1297-1305.
- Chavez-Arias, C. C., Ligarreto-Moreno, G. A., Restrepo-Diaz, H., 2018, Evaluation of heat stress period duration and the interaction of daytime temperature and cultivar on common bean, *Environmental and experimental botany*, 155, 600-608.
- Chen, Q., Lauzon, L.M., DeRocher, A. E., Vierling, E., 1990, Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein, *The Journal of Cell Biology*, 110, 1873-1883.
- Chen, X., Lin, S., Liu, Q., Huang, J., Zhang, W., Lin, J., ... & He, H., 2014, Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(4), 818-828.
- Chu, T. M., Aspinall, D., Paleg, L. G., 1974, Stress Metabolism. VI. Temperature Stress and the Accumulation of Proline in Barley and Radish, *Functional Plant Biology*, 1(1), 87-97.
- Claussen, W., 2005, Proline as a measure of stress in tomato plants, *Plant Science*, 168, 241-248.
- Cooper, P., Ho, T. H. D., 1983, Heat shock proteins in maize, *Plant Physiology*, 71(2), 215-222.
- Cvikrova, M., Gemperlova G., Dobra, J., Martincova, O., Prasil, I. T., vd., 2012, Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants, *Plant Science*, 182, 49- 58.
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F. A., 2016, Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development, In *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies* 155-166, Springer, New Delhi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Darkwa, K., Ambachew, D., Mohammed, H., Asfaw, A., W. Blair, M., 2016, Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for drought stress adaptation in Ethiopia, *The Crop Journal*, 4, 367-376.
- Dhanda, S. S., Sethi, G. S., 2002, Tolerance to drought stress among selected Indian wheat cultivars. *The Journal of Agricultural Science*, 139(3), 319.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., Goloubinoff, P., 2001, Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses, *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39586–39591.
- Ding, X., Jiang, Y., Hao, T., Jin, H., Zhang, H., vd., 2016, Effects of Heat Shock on Photosynthetic Properties, Antioxidant Enzyme Activity, and Downy Mildew of Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Plos One*, 11(4), 1-15.
- D'souza, M. R., Devaraj, V. R., 2013, Induction of thermotolerance through heat acclimation in lablab bean (*Dolichos lablab*), *African Journal of Biotechnology*, 12 (38).
- Efeoğlu, B., 2009, Heat shock proteins and heat shock response in plants, *Gazi University Journal of Science*, 22(2), 67-75.
- Ergin, S., 2012, Yüksek sıcaklık stresinin çilek bitkisinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile protein metabolizmasına etkileri, *Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa*, 92 s.
- Ergin, S., Gülen, H., Kesici, M., Turhan, E., Ipek, A.N., Köksal, N., 2016, Effects of high temperature stress on enzymatic and nonenzymatic antioxidants and proteins in strawberry plants, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40, 908-917.
- FAO, 2021, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics division, <http://www.fao.org/faostat/en/>, erişim tarihi: 28.01.2021
- Farouk, S., 2011, Osmotic adjustment in wheat flag leaf in relation to flag leaf area and grain yield per plant, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(2), 117-138.
- Feder, M. E., 1999, Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones and The Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology, *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Fender, S. E., O'Connell, M. A., 1989, Heat shock protein expression in thermotolerant and thermosensitive lines of cotton, *Plant Cell Reports*, 8, 37-40.
- Firmansyah, Argosubekti, N., 2020, A review of heat stress signaling in plants, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 484.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gosavi, G. U., Jadhav, A. S., Kale, A. A., Gadakh, S. R., Pawar, B. D., vd., 2014, Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedlings stage, Indian Journal of Biotechnology, 13, 356-363.
- Grigorova, B., Vaseva, I., Demirevska, K., Feller, U., 2011, Combined drought and heat stress in wheat: changes in some heat shock proteins, Biologia Plantarum, 55 (1), 105-111.
- Gülen, H., Eriş, A., 2003, Some physiological changes in strawberry (*Fragaria ananassa* 'Camarosa') plants under heat stress, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78(6), 894-898.
- Gülen, H., Eriş, A., 2004, Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants, Plant Science, 166, 739-744.
- Gülen, H., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N., Cansev, A., Kesici, M., Eriş, A., 2007, Bazı Çilek Çeşitlerinde Yüksek Sıcaklığa Toleransın Belirlenmesi, V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-7 Eylül 2007, Erzurum, Bildiriler Kitabı, Cilt 1, 32-36.
- Gür, A., Demirel, U., Özden, M., Kahraman, A., Çopur, O., 2010, Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), African Journal of Biotechnology, 9(7), 1008-1015.
- Haliloğlu, H., 2015, Pamuk Üzerine Sıcaklık Stresinin Etkisi, Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 19(4), 238-249.
- Han, Y., Fan, S., Zhang, Q., Wang, Y., 2013, Effect of heat stress on the MDA, proline and soluble sugar content in leaf lettuce seedlings, Agricultural Sciences, 4, 112-115.
- Harsh, A., Sharma, Y. K., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., vd., 2016, Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*), Annals of Agricultural Science, 61(1), 57-64.
- Hartl, F. H., Martin, J., 1995, Molecular chaperones in cellular protein folding, Current Opinion in Structural Biology, 5, 92-102.
- Hartl, F.U., 1996, Molecular chaperones in cellular protein folding, Nature, 381, 571-580.
- Hasanuzzaman, M., Nahar K., Alam, M.M., Roychowdhury, R., Fujita, M., 2013, Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plant, International Journal of Molecular Sciences, 14, 9643-9684.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012, Role of proline under changing environments, *Plant Signaling & Behavior* 7(11), 1-11.
- He, Y., Liu, X., Huang, B., 2005, Protein changes in response to heat stress in acclimated and nonacclimated creeping bentgrass, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 521-526.
- He, Y., Huang, B., 2007, Protein changes during heat stress in three Kentucky bluegrass cultivars differing in heat tolerance, *Crop Science*, 47(6), 2513-2520.
- Heckathorn, S.A., Downs, C.A., Sharkey, T.D., Coleman, J.S., 1998, The small, methionine-rich chloroplast heat shock protein protects photosystem II Electron transport during heat stress, *Plant Physiology*, 116, 439-444.
- Hedhly, A., Hormoza, J. I., Herrero, M., 2005, The Effect of Temperature on Pollen Germination, Polen Tube Growth and Stigmatic Receptivity in Peach, *Plant Biology*, 7, 476-483.
- Hemantaranjan, A., Bhanu, A. N., Singh, M.N., Yadav, D.K., Patel, P.K., vd., 2014, Heat stress responses and thermotolerance, *Advances in Plants & Agriculture Research*, 1(3), 62-70.
- Hendrick, J. P., Hartl, F. U., 1993, Molecular Chaperone Functions of Heat Shock Proteins, *Annual Review of Biochemistry*, 62, 349-384.
- Hong, S. W., Lee, U., Vierling, E., 2003, Arabidopsis hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures, *Plant Physiology*, 132, 757-767.
- 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*, 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, *The Plant Journal*, 27, 25-35.
- Howarth, C., 1989, Heat shock proteins in Sorghum bicoior and Pennisetum americanum I. genotypic and developmental variation during seed germination, *Plant, Cell and Environment*, 12, 471-477.
- Hucl, P., 1993, Effects of temperature and moisture stress on the germination of diverse common bean genotypes, *Canadian Journal of Plant Science*, 73, 697-702.
- Huo, L., Sun, X., Guo, Z., Jia, X., Runmin, C., vd., 2020, MdATG18a overexpression improves basal thermotolerance in transgenic apple by decreasing damage to chloroplasts, *Horticulture Research*, 7(21), 1-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hussain, I., Ashraf, M. A., Rasheed, R., Iqbal, M., Ibrahim, M., 2016, Heat shock increases oxidative stress to modulate growth and physico-chemical attributes in diverse maize cultivars, *International Agrophysics*, 30, 519-531.
- Inze, D., Montagu M. V., 1995, Oxidative stress in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 153-158.
- IPCC Climate Change (2014). Synthesis Report Core Writing Team, R.K. Pachauri, L.A. Meyer (Eds.), Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC, Geneva, Switzerland, 151.
- Jagadish, S. V. K., Muthurajan, R., Oane, R., Wheeler, T. R., Heuer, S., 2010, Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 143–156.
- Jambunathan, N., 2010, Determination and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS), Lipid Peroxidation, and Electrolyte Leakage in Plants, *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology*, 291-297.
- 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, 341-349.
- Kabay, T., 2018, Potasyum Uygulamalarının Yüksek Sıcaklığa Hassas Fasulye Genotiplerinde Klorofil İyon ve Enzim Aktivite Değişimlerine Etkileri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(3), 311-316.
- Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W. X., Zhang, H. X., Wei, A. M., Gong, Z. H. 2019, Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses, *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5321.
- Kaur, G., Asthir, B., 2015, Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance, *Biologia Plantarum*, 59, 609–619.
- Kavi Kishor, P. B., Hima Kumari, P., Sunita, M. S. L., Sreenivasulu, N., 2015, Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-17.
- Kee, S. C., Nobel, P. S., 1986, Concomitant changes in high temperature tolerance and heat-shock proteins in desert succulents, *Plant Physiology*, 80(2), 596-598.
- Keeler, S.J., Boettger, C.M., Haynes, J.G., Kuches, K.A., Johnson, M.M., Thureen, D.L., Keeler, C.L., Kitto, S.L., 2000, Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean, *Plant Physiol.*, 123, 1121-1132.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kesici, M., 2009, Bazı çilek (*Fragaria x ananassa*) çeşitlerinin yüksek sıcaklığa toleransları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bursa, 49 s.
- Kesici M., Gulen, H., Ergin, S., Turhan, E., Ipek, A., Koksal, N., 2013, Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41,238-243.
- Key, J. L., Lin, C. Y., Chen, Y. M., 1981, Heat shock proteins of higher plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3526-3530.
- Kim, B., 2017, Western blot techniques, In *Molecular Profiling*, Humana Press, New York, 133-139.
- Kimpel, J. A., Key, J. L., 1985, Heat shock in plants, *Trends in Biochemical Sciences*, 10(9), 353-357.
- Kiraly, L., Hafez, Y. M., Fodor, J., Kiraly Z., 2008, Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase, *Journal of General Virology*, 89, 799–808.
- Kishore, R., Upadhyaya, K. C., 1988, Heat shock proteins of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant and cell physiology*, 29(3), 517-521.
- Kılıç, B., 2020, Prolin ön uygulamasının kuraklık stresi koşullarındaki karaçam tohumlarının çimlenmesi üzerine etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 72 s.
- Korotaeva, N. E., Antipina, A. I., Grabelnykh, O. I., Varakina, N. N., Borovskii, G. B., Voinikov, V. K., 2001, Mitochondrial low-molecular-weight heat-shock proteins and the tolerance of cereal mitochondria to hyperthermia, *Russian Journal of plant physiology*, 48(6), 798-803.
- Kosova, K., Vitamvasa P., Prasil, I.T., Renaut, J., 2011, Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response, *Journal of Proteomics*, 74, 1301 – 1322.
- Krishna, P., 2003, Plant responses to heat stress, *Topics in Current Genetics*, 4, 73-101.
- Kumar, M. S., Srikanthbabu, V., Raju, B. M., Ganeshkumar, Shivaprakash, N., Udayakumar, M., 2003, Screening of inbred lines to develop a thermotolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: a novel approach by exploiting residual variability, *Journal of Experimental Botany*, 54 (392), 2569-2578.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, S., Kaur, R., Kaur, N., Bhandhari, K., Kaushal, N., Gupta, K., ... & Nayyar, H., 2011, Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2091–2101.
- Kumar, S., Gupta, D., Nayyar, H., 2012, Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 75-86.
- Kumari, B., Kumar Roy, P., 2019, Effect of heat stress on free amino acids in leaves of *Aloe vera* and *Bryophyllum pinnatum*, *Inter J Biol Technology*, 10(1), 1-5.
- Kuo, C. G., Shen, B. J., Chen, H. M., Chen, H. C., Opena, R. T., 1988, Associations between heat tolerance, water consumption, and morphological characters in Chinese cabbage, *Euphytica*, 39(1), 65-73.
- Larcher, W., 1995, *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups*, Springer-Verlag, Berlin.
- Ledesma, N.A., Kawabata, S., Sugiyama, N., 2004, Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants, *Biologia Plantarum*, 48(1), 73-79.
- Lee, G. J., Vierling, E., 2000, A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein, *Plant Physiology*, 122(1), 189-198.
- Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., Lee, B. H., 2007, A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves, *Proteomics*, 7(18), 3369-3383.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010, Proline metabolism and transport in plant development, *Amino Acids*, 39, 949–962.
- Levitt, J., 1980, *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol. I, Academic Pres, New York, 347-370.
- Lin, C.Y., Roberts, J.K., Key, J.L., 1984, Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization, *Plant Physiology*, 74(1), 152-160.
- Lin, B. L., Wang, J. S., Liu, H. C., Chen, R. W., Meyer, Y., vd., 2001, Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 201–208.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lui, J., Shono, M., 1999, Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Plant and Cell Physiology*, 40(12), 1297-1304.
- Liu, X., Huang, B., 2000, Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass, *Crop Science*, 40(2), 503-510.
- Liu, J., Xie, X., Du, J., Sun, J., Bai, X., 2008, Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass, *Scientia Horticulturae*, 115(2), 190–195.
- Lund, A.A., Blum, P.H., Bhatramakki, D., Elthon, T.E., 1998, Heat-stress response of maize mitochondria, *Plant Physiology*, 116, 1097-1110.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H. T., vd., 2002, Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals, *Plant Molecular Biology*, 48, 667–681.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboi, E., Hamida, J. B., Branlard, G., 2003, Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm, *Proteomics*, 3, 175–183.
- Marotti, Í., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., Dinelli, G., 2006, Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 175–188.
- Masouleh, S. S. S., Sassine, Y. N., 2020, Molecular and biochemical responses of horticultural plants and crops to heat stress, *Ornamental Horticulture*, 26(2), 148-158.
- Mayer, R. R., Cherry, J. H., Rhodes, D., 1990, Effects of Heat Shock on Amino Acid Metabolism of Cowpea Cells, *Plant Physiology*, 94, 796-810.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R., 2008, Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia Plantarum*, 133, 481–489.
- Mostajeran, A., Rahimi-Eichi, V., 2009, Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars and Accumulation of Proline and Soluble Sugars in Sheath and Blades of Their Different Ages Leaves, *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 5(2), 264-272.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, Md. M., Fujita, M., 2015, Exogenous glutathione confers high temperature stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by modulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system, *Environmental and Experimental Botany*, 112, 44-54.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakatomo, H., Hiyama, T., 1999, Heat-Shock Proteins and Temperature Stress, Handbook of Plant and Crop Stress, 399-416.
- Necchi, A., Pogna, N.E., Mapelli, S., 1987, Early and late heat shock proteins in wheat and other cereal species, Plant Physiology, 84, 1378-1384.
- Nijabat, A., Bolton, A., Mahmood-ur-Rehman, M., Shah, A. I., Hussain, R., Naveed, N. H., ... & Simon, P., 2020, Cell Membrane Stability and Relative Cell Injury in Response to Heat Stress during Early and Late Seedling Stages of Diverse Carrot (*Daucus carota* L.) Germplasm, HortScience, 55(9), 1446-1452.
- Omae, H., Kumar, A., Egawa, Y., Kashiwaba, K., Shono, M., 2005, Midday Drop of Leaf Water Content Related to Drought Tolerance in Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Plant Production Science, 8(4), 465- 467.
- Ortiz, C., Cardemil, L., 2001, Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study, Journal of Experimental Botany, 52(361), 1711-1719.
- Ozga, J. A., Kaur, H., Savada, R. P., Reinecke, D. M., 2017, Hormonal regulation of reproductive growth under normal and heat-stress conditions in legume and other model crop species, Journal of Experimental Botany, 68(8), 1885–1894.
- Öztürk, L., Demir, Y., 2002, In vivo and in vitro protective role of proline, Plant Growth Regulation, 38(3), 259-264.
- Pareek, A., Singla, S. L., Grover, A., 1998, Plant Hsp90 family with special reference to rice, Journal of biosciences, 23(4), 361-367.
- Parrotta, L., Faleri, C., Cresti, M., Cai, G., 2016, Heat stress affects the cytoskeleton and the delivery of sucrose synthase in tobacco pollen tubes, Planta, 243(1),43-63.
- Preczewski, P. J., Heckathorn, S. A., Downs, C. A., & 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, 38(1), 127-134.
- Porch, T. G., 2006, Application of Stress Indices for Heat Tolerance Screening of Common Bean, Journal of Agronomy and Crop Science, 192, 390-394.
- Rani, B., Kumari, N., Jain, V., Dhawan, K., Avtar, R., 2016, Heat stress induced changes in protein profile of Indian mustard (*Brassica juncea* L.), Journal of Oilseed Brassica, 1(1), 302-305.
- Rani, A., Tokas, J., 2020, Transcriptional Regulation of Proline Biosynthesis, International Journal of Advanced Research, 8(2), 67-73.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rehman, S. U., Bilal, M., Rana, R. M., Tahir, M. N., Shah, M. K. N., Ayalew, H., Yan, G., 2016, Cell membrane stability and chlorophyll content variation in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes under conditions of heat and drought, *Crop and Pasture Science*, 67(7), 712-718.
- Riezman, H., 2004, Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress?, *Cell cycle*, 3(1), 60-62.
- Rikhvanov, E. G., Gamburg, K. Z., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Fedoseeva, I. V., Tauson, E. L., ... & Voinikov, V. K., 2007, Nuclear–mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture, *The Plant Journal*, 52(4), 763-778.
- Rivero, R. M., Ruiz J. M., Romero, L. M., 2004, Importance of N source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants, *Plant biology*, 6(6), 702-707.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R., 2004, When defense pathways collide, The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress, *Plant Physiology*, 134, 1683-1696.
- Sailaja, B., Mangrauthia, S. K., Sarla, N., Voleti, S. R., 2014, Transcriptomics of Heat Stress in Plants, *Improvement of crops in the era of climatic changes*, 49-89.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992, *Plant Physiology* Fourth ed., Wadsworth Inc., Belmont, CA, 575-600.
- Sanmiya, K., Suzuki, K., Egawa Y., Shono, M., 2004, Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants, *FEBS Letters*, 557, 265-268.
- Schoffl, F., Rossol, I., Angermüller, S., 1987, Regulation of the transcription of heat shock genes in nuclei from soybean (*Glycine max*) seedlings, *Plant Cell and Environment* 10, 113-119.
- Semenova, G. A., 2004, Structural reorganization of thylakoid systems in response to heat treatment, *Photosynthetica*, 42 (4), 521-527.
- Shen, S., Jing, Y., Kuang, T., 2003, Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath, *Proteomics*, 3 (4), 527-535.
- Siddiqui, M.H., Al-Khaishany, M.Y., Al-Qutami, M.A., Al-Wahaibi, M.H., Grover, A., Hayssam M.A., Al-Wahaibi, M.S., 2015, Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 656-663.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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 α -crystallin domains (Acid proteins), Cell stress & chaperones, 6(3), 225-237.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R., 2008, Metabolomics for plant stress response, Physiologia Plantarum, 132, 199–208.
- Soliman, W. S., Fujimori, M., Tase, K., Sugiyama, S., 2010, Oxidative stress and physiological damage under prolonged heat stress in C3 grass *Lolium perenne*, Japanese Society of Grassland Science, 57, 101–106.
- Soltani, A., Weraduwege, S. M., Sharkey, T. D., Lowry, D. B., 2019, Elevated temperatures cause loss of seed set in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) potentially through the disruption of source-sink relationships, BMC Genomics, 20, 1-18.
- Sumesh, K.V., Sharma-Natu, P., Ghildyal, M.C., 2008, Starch synthase activity and heat shock protein in relation to thermal tolerance of developing wheat grains, Biologia Plant, 52(4), 749-753.
- Sun, W., Montagu, M.V., Verbruggen, N., 2002, Small heat shock proteins and stress tolerance in plants, Biochimica et Biophysica Acta, 1577, 1-9.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014, Abiotic and biotic stress combinations, New Phytologist, 1-12.
- Szabados, L., Savoure, A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, Trends in Plant Science, 15(2), 89-97.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplö, A., Rigo, G., Zsigmon, L., vd., 2008, Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis, The Plant Journal, 53, 11–28.
- Tanrıseven, M., 2020, Fasulye Bitkisinde Kuraklığa Duyarlı HSP70 Genlerinin Tüm Genomda Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 107.
- Tiwari, S., Patel, A., Singh, M., Prasad, S. M., 2020, Regulation of temperature stress in plants, Plant Life under Changing Environment, 25-45.
- Tokyo, A., 2016, Bazı Taze Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Yüksek Sıcaklığa Toleransları, ESOGÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 75 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tokyol, A., Turhan, E., 2019, Heat stress tolerance of some green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes, Scientific Papers. Series A. Agronomy, Vol. LXII, 1, 2019, 472-479.
- Ton, A., Karaköy, T., Anlarsal, A. E., 2014, Türkiye’de Yemelik Tane Baklagiller Üretiminin Sorunları ve Çözüm Önerileri, Türk Tarım Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2(4), 175-180.
- Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P., 2008, Multiple Roles of Proline in Plant Stress Tolerance and Development, Rendiconti Lincei 19, 325-346.
- Turfan, N., 2016, Yerel ceviz çeşidinde (*Juglans regia* L.) abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılık mekanizmasının belirlenmesi, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 31(3), 321-331.
- Turhan, E., Aydoğan, C., Ergin, S., Ozturk, N., 2015, Proteins in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) under heat stress, Journal of Biotechnology, 208, 31.
- Turhan, E., Aydoğan, C., Ergin, S., and Ozturk, N., 2014, Variation in heat stress-induced some physiological changes and peroxidase activities among three tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars, Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2, 1492-1498.
- TÜİK, 2021, Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, Taze Fasulye, www.tuik.gov.tr. (28.01.2021)
- Wahid, A., Close, T.J., 2007, Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves, Biologia Plantarum, 51, 104-109.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R., 2007, Heat tolerance in plants: An overview, Environmental and Experimental Botany, 61, 199–223.
- Wang, S.Y., Lin, H.S., 2006, Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.), Scientia Horticultura, 108, 35-42.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, Planta 218, 1–14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, Trends in Plant Science, 9(5), 244-252.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J., Yuan, B., Xu, Y., Huang, B., 2018, Differential responses of amino acids and soluble proteins to heat stress associated with genetic variations in heat tolerance for hard fescue, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 143(1), 45-55.
- Wang, S.Y., Zheng, W., 2001, Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4977-4982.
- Wery, J., Turc, O., Lecoer, J., 1993, Mechanisms of resistance to cold, heat and drought in cool season legumes, with special reference to chickpea and pea: Breeding for stress tolerance in cool season food legumes, Eds: Singh, K.B., Saxena, M.C., Chichester, U.K., John Wiley and Sons. 271-291.
- Wilson, R. A., Sangha, M. K., Banga, S. S., Atwal, A. K., Gupta, S., 2014, Heat stress tolerance in relation to oxidative stress and antioxidants in *Brassica juncea*, *Journal of Environmental Biology*, 35, 383-387.
- Wu, D. H., Laidman, D. L., 1997, Isolation of six low molecular weight heat shock proteins and partial characterization of heat shock protein 29 from mung bean hypocotyl, *Phytochemistry*, 44(6), 985-989.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., Goloubinoff, P., 1998, The Small Heat-shock Protein IbpB from *Escherichia coli* Stabilizes Stress-denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (18), 11032-11037.
- Vierling, R. A., Nguyen, H. T., 1990, Heat-Shock Protein Synthesis and Accumulation in Diploid Wheat, *Crop science*, 30(6), 1337-1342.
- Vierling, E., 1991, The Roles of Heat Shock Proteins in Plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 579-620.
- Yamasaki, S., Dillenburg L. R., 1999, Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(2), 69-75.
- Yan, H., Zhang, A., Chen, J., He, X., Xu, B., 2017, Genome-Wide Analysis of the PvHsp20 Family in Switchgrass: Motif, Genomic Organization, and Identification of Stress or Developmental-Related Hsp20s, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-15.
- Yanık, F., Çetinbaş, A., Vardar, F., 2018, Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 1, 221-230.
- Yıldız, M., Terzi, H., 2007, Bitkilerin Yüksek Sıcaklık Stresine Toleransının Hücre Canlılığı Ve Fotosentetik Pigmentasyon Testleri İle Belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23 (1-2), 47-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yin, H., Chen, Q., Yi, M., 2008, Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*, *Plant Growth Regulation* 54, 45–54.
- Yu, K., Zhu, K., Ye, M., Zhao, Y., Chen, W., Guo, W., 2016, Heat tolerance of highbush blueberry is related to the antioxidative enzymes and oxidative protein-repairing enzymes, *Scientia Horticulturae*, 198, 36-43.
- Zhang, Y., Xu, L., Zhu, X., Gong, Y., Xiang, F., Sun, X., & Liu, L., 2013, Proteomic analysis of heat stress response in leaves of radish (*Raphanus sativus* L.), *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(1), 195-203.
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., Jin, B. 2021, Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L., 2006, Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress, *Environmental and Experimental Botany* , 56, 274-285.
- Xu, Y., Zhan, C., Huang, B., 2011, Heat shock proteins in association with heat tolerance in grasses. *International journal of proteomics*, 1-11.
- Xy, H., Ye, H., Ma, J. L., Zhang, R. Q., Chen, G. C., Xia, Y. Y., 2012, Semi-lethal high temperature and heat tolerance of eight *Camellia* species, *Phyton*, 81, 177.

EK AÇIKLAMALAR LİSTESİ

- Ek Açıklama-A: İyon Sızıntısı İnteraksiyon Tablosu
- Ek Açıklama-B: Yüksek Sıcaklık Tolerans Derecesi (LT₅₀) İnteraksiyon Tablosu
- Ek Açıklama-C: Yaprak Oransal Su Kapsamı İnteraksiyon Tablosu
- Ek Açıklama-D: Turgor Kaybı İnteraksiyon Tablosu
- Ek Açıklama-E: Prolin İnteraksiyon Tablosu
- Ek Açıklama -F: Toplam Çözünebilir Protein İnteraksiyon Tablosu



EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama-A: Hücre Membran Zararlanma Oranı

Bağımlı Değişken: % zararlanma

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karalar Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	21451,022 ^a	5	4290,204	643,817	,000
Kesişme	24276,024	1	24276,024	3643,026	,000
Genotip	517,526	1	517,526	77,663	,000
Uygulama	20736,235	2	10368,117	1555,911	,000
Genotip * Uygulama	197,262	2	98,631	14,801	,001
Hata	79,964	12	6,664		
Toplam	45807,010	18			
Düzeltilmiş Toplam	21530,986	17			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklama-B: Yüksek Sıcaklık Tolerans Derecesi (LT₅₀) İnteraksiyon Tablosu
Bağımlı Değişken: °C

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karalar Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	1,101 ^a	1	1,101	43,396	,003
Kesişme	12595,918	1	12595,918	496553,930	,000
Genotip	1,101	1	1,101	43,396	,003
Hata	,101	4	,025		
Toplam	12597,120	6			
Düzeltilmiş Toplam	1,202	5			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklama-C: Yaprak Oransal Su Kapsamı İnteraksiyon Tablosu
Bağımlı Değişken: %YOSK

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	7414,229 ^a	7	1059,176	34,116	,000
Kesişme	60663,119	1	60663,119	1953,928	,000
Genotip	61,996	1	61,996	1,997	,179
Uygulama	7277,481	3	2425,827	78,135	,000
Genotip * Uygulama	97,036	3	32,345	1,042	,405
Hata	434,654	14	31,047		
Toplam	74455,535	22			
Düzeltilmiş Toplam	7848,883	21			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklama-D: Turgor Kaybı İnteraksiyon Tablosu
Bağımlı Değişken: % TK

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karalar Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	8288,365 ^a	7	1184,052	21,574	,000
Kesişme	43384,073	1	43384,073	790,479	,000
Genotip	208,860	1	208,860	3,806	,070
Uygulama	7143,639	3	2381,213	43,387	,000
Genotip * Uygulama	421,559	3	140,520	2,560	,094
Hata	823,250	15	54,883		
Toplam	52480,343	23			
Düzeltilmiş Toplam	9111,614	22			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklama-E: Prolin İnteraksiyon Tablosu
Bağımlı Değişken: μM prolin/ gTA

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karalar Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	17939710,447 ^a	7	2562815,778	54,845	,000
Kesişme	74322321,730	1	74322321,730	1590,530	,000
Genotip	982098,904	1	982098,904	21,017	,000
Uygulama	15126882,770	3	5042294,257	107,907	,000
Genotip * Uygulama	1685720,423	3	561906,808	12,025	,000
Hata	1168200,766	25	46728,031		
Toplam	98014929,664	33			
Düzeltilmiş Toplam	19107911,213	32			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklama-F: Toplam Çözünebilir Protein İnteraksiyon Tablosu
Bağımlı Değişken: mg protein/ gTA

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karalar Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	6366,395 ^a	7	909,485	110,151	,000
Kesişme	28220,483	1	28220,483	3417,887	,000
Genotip	16,703	1	16,703	2,023	,193
Uygulama	5412,669	3	1804,223	218,516	,000
Genotip * Uygulama	937,023	3	312,341	37,829	,000
Hata	66,054	8	8,257		
Toplam	34652,932	16			
Düzeltilmiş Toplam	6432,449	15			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)