

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Bitkisinin Yüksek Sıcaklık Stresine Verdiği Antioksidant Cevaplar

Ali DOĞRU*

Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sakarya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 12.09.2020

Kabul Tarihi/Accepted: 02.02.2021

ORCID ID

orcid.org/0000-0003-0060-4691

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: adogru@sakarya.edu.tr

Öz: Bu çalışmanın amacı, hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinin “Beith Alpha F1” adlı çeşidinin yüksek sıcaklık stresi (45 °C ve 55 °C, 4 saat) altında oluşturduğu antioksidant cevapların araştırılmasıdır. Hıyar bitkileri perlit içeren plastik saksılarda Hoagland besin çözeltisi ile sulanarak iklim dolabında on gün boyunca yetiştirilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamasından 24 saat sonra bitkiler hasat edilmiştir. Hıyar bitkisinin kotiledonlarındaki klorofil-*a*, klorofil-*b* ve toplam klorofil miktarı, sıcaklığın artışı ile birlikte dereceli olarak azalmıştır. Hıyar kotiledonlarında yüksek sıcaklıkla indüklenen süperoksit dismutaz aktivitesi, süperoksit radikalının etkili bir şekilde detoksifiye edildiğini göstermektedir. Yüksek sıcaklık koşullarında kotiledonlardaki düşük askorbat peroksidaz ve yüksek glutatyon redüktaz aktivitesi askorbat-glutatyon döngüsünün inhibe edildiğini işaret etmektedir. Ancak yüksek sıcaklık stresi kotiledonlarda H₂O₂ (hidrojen peroksit) birikimine yol açmamıştır. Yüksek sıcaklık stresi altında kotiledonlardaki malondialdehit miktarının azalması, membran sistemlerinin kimyasal olarak hasar görmediğini göstermiştir. Buna göre, hıyar kotiledonlarında yüksek sıcaklık stresi etkisiyle süperoksit radikali birikiminin gerçekleşmediği ve katalazın H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca hıyar kotiledonlarındaki membran sistemlerinin yüksek sıcaklığın etkisiyle fiziksel olarak zarar görmüş olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidant sistem, hıyar, *Cucumis sativus*, yüksek sıcaklık stresi, yüksek sıcaklık toleransı

Antioxidant Responses of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Plant to Heat Stress

Abstract: The aim of this study is to study the antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivar, Beith Alpha F1, under heat stress (45 °C and 55 °C, 4 hours). Cucumber plants were grown in plastic pots containing perlite in the climate chamber for ten days and irrigated with Hoagland nutrient solution. Plants were harvested 24 hours after high temperature application. The amount of chlorophyll-*a*, chlorophyll-*b* and total chlorophyll in the cotyledons of the cucumber plant gradually decreased with the increase in temperature. Superoxide dismutase activity induced by high temperature in cucumber cotyledons indicates that the superoxide radical is effectively detoxified. Low ascorbate peroxidase and high glutathione reductase activity in cotyledons at high temperature conditions indicate that the ascorbate-glutathione cycle is inhibited. However, heat stress did not lead to the accumulation of H₂O₂ in cotyledons. In addition, lower level of malondialdehyde in the cotyledons showed that membrane systems were not chemically damaged under heat stress. Accordingly, it could be concluded that superoxide radical accumulation did not occur in the cotyledons of cucumber and catalase was the predominant H₂O₂-detoxifying enzyme under heat stress. In addition, membrane systems in cucumber cotyledons may be physically affected by high temperature applications.

Keywords: Antioxidant system, cucumber, *Cucumis sativus*, heat stress, heat tolerance

1. Giriş

İklim değişikliğine bağlı olarak artan sıcaklıklar dünya genelinde tarımsal verim için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Wang ve ark., 2018). Sıcaklığın her on yılda 0.2 °C olmak üzere 2100 yılına kadar 1.8-4.0 °C artış göstereceği tahmin edilmektedir (Sehgal ve ark., 2016). Yüksek sıcaklık stresi genellikle; bitki büyüme ve gelişmesinde geri dönüşümsüz hasarlara neden olmaya yetecek bir süre boyunca, belirli bir eşik değerinin üzerindeki sıcaklık koşullarının hakim olması şeklinde tanımlanmaktadır (Wahid ve ark., 2007). Artan gıda ihtiyacı ve küresel ısınma nedeniyle ortaya çıkan tarımsal verim kayıpları, gıda güvenliğinin acil bir şekilde iyileştirilmesi gerektiğini göstermektedir (Abdelrahman ve ark., 2017). Bu nedenle bitkilerin yüksek sıcaklığa karşı oluşturdukları fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevapların araştırılması oldukça önemlidir.

Yüksek sıcaklık stresinin bitki metabolizması üzerindeki etkisi; maruz kalınan sıcaklık derecesine, maruz kalma süresine ve sıcaklığın artış hızına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Wahid ve ark., 2007). Oldukça yüksek sıcaklıklarda hücrel organizasyonun bozulması nedeniyle dakikalarla ifade edilebilecek kadar kısa bir süre içinde önemli metabolik hasarlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir (Schöffl ve ark., 1999). Daha düşük sıcaklıklarda hücrel hasarların veya ölümün meydana gelmesi için bitkinin maruz kalma süresinin uzun olması gerekir. Yüksek sıcaklığın bitkiler üzerindeki direkt etkileri arasında; protein denaturasyonu ve agregasyonu, protein sentezinin ve enzim aktivitesinin inhibisyonu, membran akışkanlığının artması, ve membran bütünlüğünün bozulması sayılabilir. Bu hasarlar büyümenin inhibisyonu, çeşitli toksik bileşiklerin ve aktif oksijen türlerinin (AOT) oluşumu ile sonuçlanır (Schöffl ve ark., 1999).

Aerobik metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucu olarak bitki hücrelerinde hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve tekli uyarılmış oksijen (1O_2) gibi aktif oksijen türleri sürekli üretilmektedir. Özellikle kloroplastların aktif oksijen türlerinin en fazla üretildiği organeller olduğu bilinmektedir (Asada, 2006). Bunun sebebi fotosistem II'nin (FS-II) yapısındaki eksitasyon enerjisi transferinin ve elektron taşınım reaksiyonlarının, yüksek sıcaklık da dahil birçok abiyotik ve biyotik stress faktörü etkisiyle inhibe edilmesidir (Suzuki ve ark., 2012). Örneğin 1O_2 eksitasyon enerjisinin transferinin inhibisyonu; H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} radikalleri ise elektron taşınımının inhibisyonu sonucunda oluşmaktadır (Pospisil ve Prasad, 2014). Stres

içermeyen ideal koşullar altında bitki dokularındaki aktif oksijen türlerinin oluşum ve detoksifikasyon hızları arasında bir dengenin bulunduğu bilinmektedir (Doğru, 2019). Ancak abiyotik ve biyotik stres faktörlerine maruz kalan bitki hücrelerinde aktif oksijen türlerinin oluşum hızında artış meydana gelmektedir. Bu durumda bitki hücrelerinde birikim gösteren aktif oksijen türleri; lipid peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, enzimlerin inhibisyonu, karbohidrat ve nükleik asitlerde yapısal problemler ortaya çıkmaktadır. Stres süresinin uzaması ve şiddetinin artması durumunda ise duyarlı bitki türlerinde doku ölümleri meydana gelebilmektedir. Ancak bitkiler hem aktif oksijen türlerinin oluşumunu sınırlayan hem de oluşan aktif oksijen türlerini detoksifiye eden etkili bir antioksidant sisteme sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD), glutatyon redüktaz (GR), guaiacol peroksidaz (GPOD) ve katalaz (KAT) bu sistemin enzimatik bileşenlerini oluşturmaktadır (Czarnocka ve Karpinski, 2018). Askorbik asit (C vitamini), karotenoidler, glutatyon ve α -tokoferol (E vitamini) ise enzimatik olmayan bileşenlerdir (Agati ve ark., 2012). Farklı stres koşulları altında hücrel antioksidant mekanizmada meydana gelen değişimler konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Stres koşulları altında antioksidant etkinliğini arttırabilen bitki türlerinin genellikle strese daha dayanıklı oldukları kabul edilmektedir (Doğru ve Çakırlar, 2020a ve 2020b). Bu nedenle stresli koşullarda antioksidant sistemin aktivasyonu hem tarımsal verimlilik hem de bitkinin canlılığını koruması bakımından oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde yüksek sıcaklık stresine karşı oluşturulan fizyolojik cevaplarla bazı antioksidant enzimler arasındaki olası etkileşimlerin incelenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Büyüme koşulları ve deneysel plan

Araştırmada hıyar (*C. sativus* L.) bitkisine ait "Beith Alpha F1" çeşidi kullanılmış olup, bu çeşide ait tohumlar 10 dakika boyunca % 5'lik sodyum hipoklorit içerisinde sterilize edilmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra perlit içeren 14 cm çapındaki her plastik saksıya ikişer tohum ekilmiş ve ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisiyle sulanmıştır (Hoagland, 1920). Saksılar 200 μ mol foton $m^{-2} s^{-1}$ ışık yoğunluğu, 25/18 °C gündüz/gece sıcaklığına, 16:8 saat saatlik gündüz/gece fotoperiyoda ve % 40-50'lik oransal neme sahip olan iklim dolabına yerleştirilmiştir. Hıyar fidelerine on gün sonra 4 saat boyunca yüksek sıcaklık stresi (45 °C ve 55 °C)

uygulanmıştır. Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan kotiledon örnekleri sıvı azotta şoklandıktan sonra analizlere kadar -80 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2. Fotosentetik pigment analizi

Fotosentetik pigment ekstraksiyonu kotiledon parçacıkları kullanılarak % 100'lük aseton içerisinde yapılmıştır. Özütlü 10000 g ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, absorbans değerleri Shimadzu mini 1240 UV visible spektrofotometre kullanılarak 470, 644.8 ve 661.6 nm'de ölçülmüştür. Klorofil-*a*, klorofil-*b*, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarları Lichtenthaler (1987)'ye göre mg g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır.

2.3. Malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) analizi

MDA ve H₂O₂ miktarı sırasıyla Heath ve Packer (1968) ve Ohkawa ve ark. (1979)'a göre belirlenmiştir. Taze kotiledon materyali (0.1 g) 6 mL % 5'lik TCA (trikloro asetik asit) ile homojenize edildikten sonra, 10000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve üst fazlar toplanmıştır. Üst faz (0.5 mL), 0.5 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 mL TCA-TBA (tiobarbitürik asit) ile karıştırılmış ve bir saat boyunca 95 °C sıcaklığındaki sıcak su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda hızla soğutulmuştur. Santrifüj işlemi 10000 g'da 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiş ve üst fazların absorpsiyonu spektrofotometre yardımıyla 532 ve 600 nm'de belirlenmiştir. MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı (155 mM⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır. H₂O₂ miktarının belirlenmesi için 0,5 mL üst faz ile 0.5 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 mL 1 M potasyum iyodür (KI) karıştırılmış ve karışımın absorbans değeri 90 dakika sonra 390 nm'de ölçülmüştür. H₂O₂ miktarı standart grafik yardımıyla nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır.

2.4. Antioksidant enzim aktiviteleri

Kotiledon örneklerinin protein konsantrasyonları, Bradford metoduna (Bradford, 1976) göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak belirlenmiştir.

Toplam süperoksit dismutaz (SOD; 1. 15. 1. 1) aktivitesi Beyer ve Fridovich (1987)'e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0,3 g taze kotiledon dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 mL, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), % 2'lik polivinilpirolidon (PVP) ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14000 g ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1030 µL olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu

(pH 7.8), 9.9x10⁻³ M metionin, 5.7x10⁻⁵ M nitroblue tetrazolyum (NBT), % 1'lik triton-X-100 ve enzim karışımından oluşan bir reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon 0.9 µM riboflavin ilavesi ile başlatılmış, bu karışım 15 dakika boyunca 375 µmol m⁻² s⁻¹ şiddetinde ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir. Toplam SOD aktivitesi (U mg protein⁻¹) daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanarak hesaplanmıştır.

Toplam askorbat peroksidaz (APOD; 1. 11. 1. 11) aktivitesi Wang ve ark. (1991)'na göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze kotiledon dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 mL, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), % 2'lik PVP, 1 mM Na₂EDTA ve 2 mM askorbat içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 12000 rpm ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µL olacak şekilde 50 mM K-PO₄ tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat, 10 mM H₂O₂ ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, H₂O₂'in eklenmesiyle başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki azalma, spektrofotometrede 290 nm'de yapılan okumalarla enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmiştir. APOD aktivitesi (nmol askorbat dk⁻¹mg protein⁻¹), askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır.

Toplam glutatyon redüktaz (GR; 1. 8. 1. 7) aktivitesi Sgherri ve ark. (1994)'na göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0,3 g taze kotiledon dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 mL, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), % 2'lik PVP ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14000 rpm ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µL olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM okside glutatyon (GSSG), 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, nikotin adenin amid dinükleotid fosfat (NADPH)'ın eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de yapılan okumalarla ölçülmüştür. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG oksidasyonu ile yapılmıştır. GR aktivitesi (nmol NADPH dk⁻¹mg protein⁻¹), NADPH'in ekstinksiyon katsayısı kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır.

Toplam katalaz (KAT; 1. 11. 1. 6) aktivitesi Aebi (1984) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Kotiledonların ekstraksiyonu 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.5) ve Na₂EDTA içeren süspansiyon çözeltisi kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Özütler 20 dakika boyunca 15000 g'da 4 °C de santrifüj edilmiş ve üst fazlar enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmak üzere toplanmıştır. Son hacim 3 mL olacak şekilde 0.05 mL üst faz, 1.5 mL fosfat tamponu (100 mM, pH 7.0), 0.5 mL H₂O₂ ve 0.95 mL distile sudan oluşan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 240 nm'de yapılan okumalarla ölçülmüştür. Katalaz aktivitesi (nmol H₂O₂ dk⁻¹mg protein⁻¹) H₂O₂'in ekstinksiyon katsayısı kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır.

2.5. İstatistik analizler

Biyolojik olarak üç bağımsız tekerrürden elde edilen verilerin aritmetik ortalama ve standart hataları hesaplanmış; daha sonra verilere SPSS 22.0 paket programı kullanılarak, istatistiki varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulamaların kontrole göre neden olduğu farkın önem kontrolü % 5 düzeyinde Duncan testi ile hesaplanmıştır (Yurtsever, 1984).

3. Bulgular ve Tartışma

Klorofil molekülleri kloroplastların tilakoid membranlarında yerleşim gösteren ve ışık enerjisini absorblayarak elektron taşınım reaksiyonlarını başlatan temel fotosentetik pigmentlerdir (Wang ve ark., 2018). Normal büyüme koşullarında bitki yapraklarındaki klorofil miktarının, bu moleküllerin sentezi ve parçalanması arasında bir denge bulunduğu için, hemen hemen sabit olduğu bildirilmiştir (Hörtensteiner, 2006; Wang ve ark., 2018). Ancak yüksek sıcaklık da dahil olmak üzere, bitkiler herhangi bir çevresel stres faktörüne maruz kaldığında çoğunlukla klorofil miktarındaki azalma nedeniyle yapraklarda senesens ve klorosis gibi semptomların ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Rossi ve ark., 2017). Bu verilere uygun olarak araştırmada 45 °C ve 55 °C'lik yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda hıyar kotiledonlarındaki klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarının sıcaklık artışı ile birlikte düzenli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Tablo 1). Yüksek sıcaklık stresi ile klorosis olayının indüklendiği soya (Djanaguiraman ve ark., 2011), sorgum (Djanaguiraman ve ark., 2014) ve buğday (Akter ve Islam, 2017) bitkilerinde de gözlenmiştir. Ancak bitkilerde yüksek sıcaklık stresine maruz kalma boyunca yaprak senesensinin regülasyonundan sorumlu olan mekanizma hakkında çok az bilgi mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, yüksek sıcaklık uygulaması sonucunda klorofillaz ve klorofil parçalayan peroksidaz

Tablo 1. Yüksek sıcaklık uygulamalarının hıyar kotiledonlarındaki fotosentetik pigment miktarı (mg g⁻¹ taze ağırlık) üzerine etkisi*

Parametreler	Kontrol	45 °C	55 °C
Klorofil-a	1.09±0.1 a	0.96±0.1 b	0.70±0.1 c
Klorofil-b	0.48±0.1 a	0.40±0.0 b	0.32±0.1 c
Toplam klorofil	1.57±0.1 a	1.36±0.1 b	1.02±0.1 c
Toplam karotenoid	0.47±0.1 a	0.36±0.1 b	0.32±0.1 c

*: Aynı satırdaki farklı harfler ortalama değerlerin istatistiksel olarak p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu göstermektedir.

enzimlerinin aktivitelerinin artış gösterdiği ve sonuçta klorofil miktarının belirgin derecede azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Wang ve ark., 2018). *Agrostis stolonifera* bitkisinde yapılan bir araştırmada yüksek sıcaklık uygulamalarının klorofil sentezinden sorumlu olan enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkili olmadığı ancak klorofilin parçalanmasını sağlayan reaksiyonları katalizleyen enzimlerin aktivitelerinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Rossi ve ark., 2017). Bu durumda çalışmada kullanılan hıyar kotiledonlarında yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda klorofil pigmentlerinin parçalanma hızının arttığı söylenebilir. Ayrıca bazı araştırmacılar da yüksek sıcaklık stresi altındaki bitkilerde gözlenen klorofil parçalanmasının bir savunma mekanizması olabileceğini bildirmiştir (Ginsburg ve ark., 1994; Hörtensteiner, 2006, 2009). Hu ve ark. (2020), yüksek sıcaklık stresi koşullarında meydana gelen klorofil parçalanmasının yakalanan ışık enerjisi miktarını azalttığını ve bu enerjinin kullanılmaması sonucunda fotosentetik birimlerin zarar görme olasılığını azalttığını belirtmişlerdir.

Karotenoidler tekli uyarılmış oksijen radikalının oluşumunu engelleyen ve üçlü uyarılmış klorofil moleküllerinin detoksifikasyonundan sorumlu olan, antioksidant sistemin enzimatik olmayan bileşenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Trebst, 2003). Hashimoto ve ark. (2016) karotenoidlerin, klorofil moleküllerinin fotooksidasyonundan korunmasını sağlayan pigmentler olduğunu belirtmişlerdir. Kumar ve ark. (2020) ise yüksek sıcaklık stresine toleranslı olan nohut çeşitlerinin yapraklarındaki klorofil ve karotenoid pigmentlerinin miktarının yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada 45 °C ve 55 °C'lik yüksek sıcaklık uygulamaları hıyar kotiledonlarındaki toplam karotenoid miktarının azalmasına yol açmıştır (Tablo 1). Aynı zamanda hıyar kotiledonlarındaki klorofil ve karotenoid pigmentlerinin miktarı arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Bu durumda hıyar kotiledonlarındaki klorofil pigmentlerinin yüksek sıcaklık stresi etkisiyle fotooksidasyona uğradığı ve karotenoidle bu konuda koruyucu bir etki sergilemediği söylenebilir.

Yüksek sıcaklık stresinin bitki metabolizmasında neden olduğu olumsuz etkilerden biri de, çeşitli aktif oksijen türlerinin oluşum hızını artırarak bitki üzerinde sekonder olarak oksidatif strese yol açmasıdır (Wahid ve ark., 2007). Bitki dokularında birikim göstermeye başlayan aktif oksijen türleri de membran lipidlerinin ve pigment moleküllerinin peroksidasyonuna neden olmaktadır (Xu ve ark., 2006). Kloroplastlarda ve mitokondrilerde sürekli oluşturulan O_2^- radikalleri, bir metaloenzim olan süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonla detoksifiye edilmektedir. Bu reaksiyonun ürünü olan H_2O_2 ise, askorbat-glutasyon döngüsünün enzimatik bileşenleri arasında yer alan APOD ve GR ile su ve oksijene kadar parçalanmaktadır (Doğru ve Çakırlar, 2020a). Bu döngüde APOD direkt olarak H_2O_2 'yi parçalarken, GR de bu reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan elektronları sağlamaktadır (Doğru ve Çakırlar, 2020b). Gelişmiş bitkilerde H_2O_2 'in detoksifikasyonundan birinci derecede sorumlu olan enzim APOD olmasına rağmen, KAT enzimi de aynı substratın dekompozisyonundan sorumludur. Çalışmada 45 °C ve 55 °C'lik yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan hıyar kotiledonlarında toplam SOD aktivitesi kontrole göre artış göstermiştir (Tablo 2). Bu sonuç

çalışmada kullanılan hıyar kotiledonlarında yüksek sıcaklık stresi altında etkili bir O_2^- detoksifikasyonunun gerçekleştiğini ve H_2O_2 oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir. Hıyar kotiledonlarındaki APOD aktivitesi yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda azalırken, GR aktivitesi artış göstermiştir (Tablo 2). Bu sonuç yüksek sıcaklık stresinin askorbat-glutasyon döngüsünü inhibe ettiğini göstermektedir (Doğru, 2020). Yüksek sıcaklık koşullarında (45 °C ve 55 °C) hıyar kotiledonlarındaki APOD aktivitesinin azalması aynı zamanda bu enzimin yüksek sıcaklığa yapısal olarak duyarlı olduğunu da gösteriyor olabilir. Ancak çalışmada aynı stres koşullarında hıyar kotiledonlarındaki H_2O_2 miktarı azalmış, KAT aktivitesi ise artmıştır (Tablo 2). Bu sonuçlar hıyar kotiledonlarında yüksek sıcaklık stresi koşullarında H_2O_2 'in detoksifikasyonundan sorumlu olan enzimin KAT olduğunu açıkça göstermektedir. Bitki dokularındaki MDA birikimi hücrel membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Doğru, 2020). Çalışmada hıyar kotiledonlarındaki MDA miktarı yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda azalmıştır (Tablo 2). Bu sonuç hıyar kotiledonlarındaki yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda hücrel membranlarda kimyasal bir hasarın meydana gelmediğini

Tablo 2. Yüksek sıcaklık uygulamalarının hıyar kotiledonlarındaki H_2O_2 ve MDA miktarı ile SOD, APOD, GR ve KAT aktivitesi üzerine etkisi*

Parametreler	Kontrol	45 °C	55 °C
H_2O_2 (nmol g ⁻¹)	4.94±1.0 a	4.99±0.7 a	4.85±0.50 b
MDA (nmol g ⁻¹)	17.1±1.5 a	14.7±2.5 b	14.5±3.00 c
Toplam SOD (U mg ⁻¹)	0.90±1.0 c	1.61±1.0 b	2.53±0.03 a
Toplam APOD (nmol ask dk ⁻¹ mg prot ⁻¹)	24.1±2.0 a	19.5±1.0 b	18.9±2.00 c
Toplam GR (nmol NADPH dk ⁻¹ mg prot ⁻¹)	0.78±0.5 c	1.14±0.1 b	2.06±0.10 a
Toplam KAT (nmol H_2O_2 dk ⁻¹ mg protein ⁻¹)	1.44±0.7 c	5.25±1.2 a	4.15±1.0 b

*: Aynı satırdaki farklı harfler ortalama değerlerin istatistiksel olarak p<0.05 seviyesinde farklı olduğunu göstermektedir.

gösteriyor olabilir. Ancak yapılan bazı çalışmalar yüksek sıcaklık stresi etkisiyle kloroplastlardaki tilakoid membranlarının organizasyonunun bozulduğunu, grana kümelerinin şiştiğini veya parçalandığını ve FS-II birimlerinden pigment moleküllerinin ayrıldığını ortaya çıkarmıştır (Karim ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2005). Buna göre çalışmada uygulanan yüksek sıcaklık stresinin hıyar kotiledonlarındaki membran sistemlerinde fiziksel olarak hasarlar oluşturmuş olması da mümkündür. Nitekim yüksek sıcaklık stresi altında gözlenen pigment kayıpları da bu fikri destekler niteliktedir.

4. Sonuçlar

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, 45 °C ve 55 °C'lik yüksek sıcaklık uygulamalarının hıyar

kotiledonlarında fotosentetik pigment metabolizmasını olumsuz etkilediğini göstermiştir. Uygulanan yüksek sıcaklık stresinin hıyar kotiledonlarında askorbat-glutasyon döngüsünü inhibe ettiği, H_2O_2 detoksifikasyonu konusunda KAT enziminin ön plana çıktığı görülmüştür. Bunun dışında yüksek sıcaklık uygulamaları sonucunda hıyar kotiledonlarında MDA miktarının sıcaklığın artışına bağlı olarak azalması membran sistemlerinde kimyasal bir hasarın oluşmadığını göstermiştir.

Teşekkür

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "2015-50-01-048" numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdelrahman, M., El-Sayed, M., Jogaiah, S., Burritt, D.J., Tran, L.S.P., 2017. The “stay green” trait and phytohormone signaling networks in plan under heat stress. *Plant Cell Reports*, 36(7): 1009-1025.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Agati, G., Azzarello, S., Poolastri, M., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67-76.
- Akter, N., Islam, M.R., 2017. Heat stress effects and management in wheat. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37: 37-53.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their function. *Plant Physiology*, 141(2): 391-396.
- Beyer, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2): 559-566.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Czarnocka, W., Karpinski, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 122: 4-20.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Boyle, D.L., Schapaugh, W.T., 2011. High-temperature stress and soybean leaves: Leaf anatomy and photosynthesis. *Crop Science*, 51(5): 2125-2131.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., Murugan, M., Perumal, R., Reddy, U.K., 2014. Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 100: 43-54.
- Doğru, A., 2019. Bitkilerde antioksidant sistemler ve tuz stresine verdikleri cevaplar. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 1(2): 164-185.
- Doğru, A., 2020. Antioxidant responses of barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes to lead toxicity. *Biologia*, 75(9): 1265-1272.
- Doğru, A., Çakırlar H., 2020a. Effects of leaf age on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes activity in winter rapeseed leaves under cold acclimation conditions. *Brazilian Journal of Botany*, 43(1): 11-20.
- Doğru, A., Çakırlar, H., 2020b. Is leaf age a predictor for cold tolerance in winter oilseed rape plants? *Functional Plant Biology*, 47(3): 250-262.
- Ginsburg, S., Schellenberg, M., Matile, P., 1994. Cleavage of chlorophyll-porphyrin (requirement for reduced ferredoxin and oxygen). *Plant Physiology*, 105(2): 545-554.
- Hashimoto, H., Uragami, C., Cogdell, R.J., 2016. Carotenoids and photosynthesis. In: C. Stange (Ed.), *Carotenoids in Nature*, Subcellular Biochemistry. Cham, Springer, pp. 111-139.
- Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
- Hoagland, D.R., 1920. Optimum nutrient solution for plants. *Science*, 52(1354): 562-564.
- Hörtensteiner, S., 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1): 55-77.
- Hörtensteiner, S., 2009. Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends in Plant Science*, 14(3): 155-162.
- Hu, S., Ding, Y., Zhu, C., 2020. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 375-385.
- Karim, M.A., Fracheboud, Y., Stamp, P., 1997. Heat tolerance of maize with reference of some physiological characteristics. *Annals of Bangladesh Agriculture*, 7(1): 27-33.
- Kumar, P., Yadav, S., Singh, M.P., 2020. Possible involvement of xanthophyll cycle pigments in heat tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(1): 1773-1785.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, N.Y., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358.
- Pospisil, P., Prasad, A., 2014. Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in photosystem II under abiotic stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 137: 39-48.
- Rossi, S., Burgess, P., Jespersen, D., Huang, B., 2017. Heat-induced leaf senescence associated with chlorophyll metabolism in bentgrass lines differing in heat tolerance. *Crop Science*, 57(S1): 169-178.
- Schöffl, F., Prandl, R., Reindl, A., 1999. Molecular responses to heat stress. In: K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (Eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, R.G. Landes Co., Austin, Texas, pp. 81-99.
- Sehgal, A., Sita, K., Nayyar, H., 2016. Heat stress in plants: Sensing and defence mechanism. *Journal of Plant Science Research*, 32(2): 195-210.
- Sgherri, C.L.M., Loggini, B., Puliga, S., Navari-Izzo, F., 1994. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry*, 35(3): 561-565.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G., 2012. ROS and redox signaling in response to plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35(2): 259-270.
- Trebst, A., 2003. Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58(9-10): 609-620.

- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3): 199-223.
- Wang, Q.L., Chen, J.H., He, N.Y., Guo, F.Q., 2018. Metabolic reprogramming in chloroplasts under heat stress in plants. *International Journal of Molecular Science*, 19(3): 849-870.
- Wang, S.Y., Jiao, H., Faust, M., 1991. Changes in ascorbate, glutathione and related enzyme activity during thidiazuron-induced bud break of apple. *Plant Physiology*, 82: 231-236.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L., 2006. Effect 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(3): 274-285.
- Yurtsever, N., 1984. Deneysel İstatistik Metodları. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Genel Yayın No: 121, Teknik Yayın No: 56, Ankara.
- Zhang, J.H., Huang, W.D., Liu, Y.P., Pan, Q.H., 2005. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross temperature stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(8): 959-970.