

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**BOR STRESİNE MARUZ KALMIŞ BUĞDAY BİTKİSİNE EKSOJEN NİTRİK
OKSİT (NO) İLAVESİNİN FİZYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hafize DİLEK TEPE

**Danışman
Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**



MANİSA-2016

**Hafize
DILEK TEPE**

**BOR STRESİNE MARUZ KALMIŞ BUĞDAY BİTKİSİNE EKSOJEN NİTRİK OKSİT
(NO) İLAVESİNİN FİZYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

2016

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Hafize DİLEK TEPE



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLOLAR DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bitkilerde Stres	4
2.1.1. Oksidatif Stres	5
2.1.2. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri	8
2.2. Bor ve Özellikleri	11
2.2.1. Bor'un Toksik Etkisi	12
2.3. NO ve Özellikleri	14
2.4. Poliaminler ve Özellikleri	17
2.5. Fitoşelatinler ve Özellikleri	19
2.6. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asitler	21
2.7. Buğdayın Tarım Açısından Önemi	22
2. 8. Literatür Özeti	24
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	30
3.1.Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	32
3.2. Bitki Büyüme Koşulları	33
3.3. Fotosentetik Pigment İçeriği Ölçümü	36
3.4. Elektrolitik İletkenlik(%) (EL) Ölçümü	37
3.5. Hidrojen Peroksit Ölçümü	37
3.6. Prolin Ölçümü	37
3.7. MDA (Lipid Peroksidasyonu) Ölçümü	38
3.8. Enzim Aktivitesi Ölçümleri	38

3.8.1. Nitrat Redüktaz (NR).....	39
3.8.2. Glutatyon Peroksidaz (GPX)	40
3.8.3. Glutatyon Redüktaz (GR).....	40
3.8.4. Glutatyon-S-Trasferaz (GST)	41
3.9. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit (LMWOA) Ölçümü	42
3.10. Poliamin (Putresin, Spermidin, Spermin) Ölçümü	42
3.11. Metal İçeriği Ölçümü	43
3.12. Sistein, GSH, GSSG, Fitoşelatin Ölçümü	43
3.13. RNA izolasyon, cDNA sentezi ve real-time PCR (RT-PCR) Analizi	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	46
4.1. Büyüme Parametreleri Sonuçları	46
4.2. Fotosentetik Pigment İçeriği ve % Elektrolitik İletkenlik Sonuçları	49
4.3. H ₂ O ₂ , Prolin ve MDA İçeriği Sonuçları	51
4.4. Enzim Aktivite Sonuçları	55
4.5. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit Sonuçları	61
4.6. Metal İçeriği Sonuçları	67
4.7. Poliamin (putresin, spermidin, spermin) Sonuçları	73
4.8. Sistein, GSH ve GSSG Sonuçları	78
4.9. Fitoşelatin (PC ₂) Sonuçları	81
4.10. Real Time PCR Sonuçları	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

B	Bor
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
NO	Nitrik Oksit
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon- S-Transferaz
NR	Nitrat Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
PA	Poliamin
Put	Putresin
Spmdn	Spermidin
Spm	Spermin
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
ADC	Arjinin Dekarboksilaz
PC₂	Fitoşelatin 2
LMWOA	Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Enerji transferi sırasında ROS oluşumu.....	6
Şekil 2.2. Bitkiden ROS gideriminin hücrel yolları.....	9
Şekil 2.3. Bitki hücresinde NO biyosentezi.	16
Şekil 2.4. Bitkilerde poliamin biyosentezi.	18
Şekil 2.5. Fitoşelatinin yapısı.	19
Şekil 3.1. Bezostoya buğday türünde, Kontrol (borsuz), 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B uygulamasının 7. günü resimleri.....	34
Şekil 3.2. Bezostoya buğday türünde, 10 mM B, 10 mM B+0,5 mM SNP, 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B+0,1 mM SNP uygulamasının 7. günü resimleri.	35
Şekil 3.3. Kutluk 94 buğday türünde, Kontrol (borsuz), 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B uygulamasının 7. günü resimleri	35
Şekil 3.4. Kutluk 94 buğday türünde, 10 mM B, 10 mM B+0,5 mM SNP, 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B+0,1 mM SNP uygulamasının 7. günü resimleri.	36
Şekil 4.1. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) ağırlık değişimleri.	46
Şekil 4.2. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) uzunluk değişimleri.	47
Şekil 4.3. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Elektrolitik İletkenlik değişimleri.	50
Şekil 4.4. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Hidrojen Peroksit İçeriği.....	51
Şekil 4.5. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Prolin İçeriği	52
Şekil 4.6. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) MDA İçeriği.	53
Şekil 4.7. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi.	55
Şekil 4.8. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutatyon Redüktaz Aktivitesi.	56
Şekil 4.9. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutatyon S Transferaz Aktivitesi.	57
Şekil 4.10. NO ₂ ⁻ Kalibrasyon grafiği.	59

Şekil 4.11. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Nitrat Redüktaz Aktivitesi.....	59
Şekil 4.12. HPLC analizinde organik asit standartlarına ait piklerin absorbans değerleri ve alıkonma zamanları (Retention Time)	61
Şekil 4.13. Kutluk 94 buğday türü gövdesinde 10 B+0,2 SNP örneğine ait organik asit piklerinin absorbans değerleri ve alıkonma zamanları (Retention Time)	62
Şekil 4.14. ICP-MS cihazında K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B metallerinin kalibrasyon grafikleri	68
Şekil 4.15. Poliamin standartlarına ait (putresin, spermidin ve spermin) kalibrasyon grafikleri.	73
Şekil 4.16. Poliamin standartlarına (putresin, spermidin, spermin) ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10 B+0,2 SNP) ait absorbans ve alıkonma zamanı grafiği.	74
Şekil 4.17 Standartlara ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10 B+0,2 SNP) ait absorbans ve alıkonma zamanı grafiği	78
Şekil 4.18. Standart ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10B+0,2 SNP) ait Fitoşelatin 2 (PC ₂) absorbans ve alıkonma zamanları (4.11 dak.).	81
Şekil 4.19. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Fitoşelatin (PC ₂) değişimleri.	82
Şekil 4.20. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Nitrat Redüktaz Enzim aktivitesinin Real Time PCR analizi.	84

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bitkilerde stres faktörleri	4
Tablo 2.2. Türkiye Bor Rezervleri (Ton).	12
Tablo 4.1. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu fotosentetik pigment içeriği değişimi.	49
Tablo 4.2. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit içeriği değişimi.....	63
Tablo 4.3. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit içeriği değişimi.	64
Tablo 4.4. Bezostoya buğday türünde Bor ve SNP uygulaması sonucu K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B içeriğindeki değişimler.....	69
Tablo 4.5. Kutluk 94 buğday türünde Bor ve SNP uygulaması sonucu K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B içeriğindeki değişimler.....	70
Tablo 4.6. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu poliamin (putresin, spermidin, spermin) değişimleri.....	75
Tablo 4.7. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Sistein, GSH ve GSSG değişimleri	79

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her safhasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülin AYDEMİR'e, 2013-094 no'lu projeyi maddi olarak destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, çalıőmam boyunca bana manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli aileme, çalışma arkadaşlarıma ve bu uzun süreçte bana anlayıő ve sabır gösteren sevgili eőim Muammer TEPE'ye sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Hafize DİLEK TEPE

Manisa, 2016



ÖZET

Doktora Tezi

Bor Stresine Maruz Kalmış Buğday Bitkisine Eksojen Nitrik Oksit (NO) İlavesinin Fizyolojik Etkilerinin İncelenmesi

Hafize DİLEK TEPE

**Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Türkiye, özellikle Batı Anadolu Bölgesi, dünyadaki Bor (B) rezervlerinin % 61'ine sahiptir ve bu bölgedeki B toksisitesi tarım alanlarını etkileyen önemli bir problemdir. Türkiye'de önemli bir tarım ürünü olan buğday da bu bölgelerde yetişmekte ve B toksisitesinden oldukça etkilenmektedir. Nitrik oksit (NO), bitki büyümesi, gelişmesi ve farklı hücre içi süreçlerde rol alan önemli bir sinyal molekülüdür. Bu tez çalışmasında, 10 mM B stresi uygulanan Bezostoya (B hassas) ve Kutluk 94 (B dayanıklı) buğday türlerine farklı konsantrasyonlarda Sodyum Nitroprussid (SNP) (NO donörü) eklenerek, NO'nun iyileştirici etkileri araştırıldı. Bunun için her iki buğday türünde; gövde ve kök uzunlukları, ağırlıkları, % elektrolitik iletkenlik (%EL), Malondialdehit (MDA), Prolin, Hidrojen Peroksit (H₂O₂) içerikleri, Glutasyon Peroksidaz (GPX), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon S Transferaz (GST), Nitrat Redüktaz (NR) enzim aktiviteleri, Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit içerikleri (LMWOA), metal içerikleri, Poliamin (PA) içerikleri, Sistein, Redükte Glutasyon (GSH), Okside Glutasyon (GSSG), Fitoşelatin (PC₂) içerikleri ve Nitrat Redüktaz enzimine ait gen ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

Bor stresıyla birlikte buğday bitkisinin her iki türünde de gövde, kök ağırlıklarında azalmalar elde edildi. On mM bor derişimine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövde ağırlıklarında sırasıyla %64 ve %103 oranlarında artışların olduğu gözlemlendi. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövdelerinde H₂O₂ içeriğinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre sırasıyla %102 ve %70 oranında artış elde edildi. On mM bor derişimine 0,2 mM SNP ilave edildiğinde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde H₂O₂ içeriğinde sırasıyla %13 ve %23 oranında azalmalar elde edildi. GPX aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde 10 mM bor konsantrasyonuyla birlikte kontrol gruplarına göre sırasıyla %33 ve %14 oranında azaldı. Bor stresine 0,2 mM SNP ilave edildiğinde enzim aktivitesinde sırasıyla %32 ve %9,8 oranında artışlar elde edildi. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövdelerinde 10 mM bor stresinde NR enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %57,43 ve %25,76 oranında azalmalar gözlemlendi. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde NR enzim aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %220,67 ve %70,33 oranında arttı. Bezostoya gövdelerine 10 mM bor uyguladığımızda kontrol grubuna göre benzoik, malik, oksalik asit içeriklerinde sırasıyla %49, %36, %40 oranında, Kutluk 94 türünde ise %19, %16, %23 oranında azalmalar elde edildi. Ortama ilave edilen SNP konsantrasyonlarından 0,2 mM'da benzoik, malik, oksalik asit düzeyleri

Bezostoya türünde %118, %42, %90, Kutluk 94 türünde ise %22, %54, %39 oranında arttı. Hem Bezostoya hem de Kutluk 94 buğday türlerinin kök ve gövdelerinde 10 mM bor ilavesiyle bor içeriklerinde artış gözlemlendi. Kutluk 94 buğday gövdelerinde 10 mM bor stresli ortama 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave edildiğinde bor içerikleri %12, %40 ve %32,5 oranında azaldı. Poliamin içeriklerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre Bezostoya buğday türünün gövdelerinde putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %60,47, %27,24 ve %68,57, Kutluk 94 buğday türünde ise %46,94, %24,27 ve %37,39 oranında artışlar elde edildi. Bor stresi ortamına ilave edilen SNP, stresten dolayı artan poliamin miktarlarını azalttı. Ancak en iyi cevap 0,2 mM SNP konsantrasyonundan elde edildi. Kutluk 94 türü köklerinde, sistein, GSH ve GSSG oranları 10 mM bor konsantrasyonunda kontrol grubuna göre %38,80, %31,06 ve %52,87 oranında azalırken Bezostoya buğday türünde ise %39,60, %41,87 ve %56,89 oranında azaldı.

Bezostoya buğday türü gövdelerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre PC₂ içeriği %94,49 oranında artış gösterdi. Bu artış Kutluk 94 buğday türünde %80,44 olarak bulundu. On mM bor stresine 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP uyguladığımızda Bezostoya türünde PC₂ içeriklerinde sırasıyla %19,02, %36,42 ve %51,60 oranında azalmalar elde edilirken Kutluk 94 türünde bu oranlar %22,98, %39,35 ve %45,08 olarak bulundu. NR enzimine ait RT-PCR sonuçlarına göre enzimin ekspresyon oranı, gövdelerde kontrol grubuna göre değişim, 10 mM bor ilavesiyle Bezostoya türünde 4,5 kat, Kutluk 94 türünde 2,6 kat oranında azaldı. Ortama 0,2 mM SNP ilave edilmesiyle NR enzim ekspresyonunda 10 mM bor stresine göre Bezostoya ve Kutluk 94 gövdelerinde sırasıyla 10,57, 6,65 kat oranında artışlar elde edildi.

Bu sonuçlar, NO'nun, B stresine karşı buğday bitkisinin büyümesi ve gelişmesinde hayati önem taşıyan birçok metabolik süreçte iyileşmelere neden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, B toksisitesinin problem oluşturduğu buğday tarımının yapıldığı alanlarda, NO'nun bitkiye dışarıdan uygulaması ile bitkideki stresin negatif etkileri ortadan kaldırılabılır.

Anahtar Kelimeler: Buğday, Bor, Nitrik Oksit, Poliamin, Organik Asit, Glutasyon, Fitoşelatin.

2016, 106 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of Physiologic Effects of Exogenous Nitric Oxide (NO) Application on Wheat Exposed to Boron Stress

Hafize DİLEK TEPE

Celal Bayar University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Turkey, especially West Anatolia Region, has 61% of the boron (B) reserves of the world and B toxicity in this region is a major problem for cultivated areas. Wheat which is an important crop product in Turkey grows in this area and affected from B toxicity. Nitric oxide (NO) is an important signal molecule which plays a role in plant growth, development and various intracellular processes. In this thesis study, ameliorative effect of NO in Bezostoya (B sensitive) and Kutluk 94 (B tolerant) wheat cultivars exposed to 10 mM B stress by addition of different concentrations of a NO donor, Sodium nitroprusside (SNP). For this aim, shoot and root lengths, % electrolyte leakage (EL%), malondialdehyde (MDA), proline, hydrogen peroxide (H₂O₂), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR), Glutathione S-transferase (GST), Nitrate reductase (NR), low molecular weight organic acid (LMWOA), polyamine (PA), cysteine, GSH, GSSG and phytochelatine (PC₂) contents and NR gene expression levels were investigated in both wheat cultivars.

Reductions in shoot and root weights were determined in both wheat cultivars exposed to B stress. When 0.2 mM SNP was added to 10 mM boron concentration, shoot weight levels of Bezostoya and Kutluk 94 wheats were increased by %64 and %103 respectively. By 10 mM boron stress, H₂O₂ content of wheat shoots of Bezostoya and Kutluk 94 plants was increased by %102 and %70 respectively, as compared to control group. H₂O₂ levels of Bezostoya and Kutluk 94 wheat plants were reduced by %13 and %23 respectively, when 0.2 mM SNP was added to 10 mM boron concentration. 10 mM boron concentration caused decreased GPX activity in Bezostoya and Kutluk 94 wheat shoots by %33 and %14 respectively as compared to the control group. Enzyme activity levels were increased by %32 and %9.8 when 0.2 mM SNP was added to boron stress. NR enzyme activity levels of Bezostoya and Kutluk 94 wheat shoots were decreased by %57.43 and %25.76 respectively, under the 10 mM boron stress when compared to control group. When 0.2 mM SNP was added to 10 mM boron concentration, NR enzyme activity levels of Bezostoya and Kutluk 94 wheat shoots were increased by %220.67 and %70.33 respectively. When 10 mM boron was applied; benzoic, malic and oxalic acid levels of Bezostoya shoots decreased by %49, %36, %40 and these acid levels of Kutluk 94 shoots decreased by %19, %16, %23 respectively. Addition of 0.2 mM SNP

concentration increased the benzoic, malic and oxalic acid levels of Bezostoya shoots by %118, %42, %90 and increased the acid levels by %22, %54, %39 of Kutluk 94 shoots respectively. Boron levels of the roots and shoots of Bezostoya and Kutluk 94 wheat cultivars increased after 10 mM boron addition. 0.1, 0.2 ve 0.5 mM addition of SNP to 10 mM boron stress caused reduction of boron levels of Kutluk 94 wheat shoots by %12, %40 and %32.5. Putrescine, spermidine and spermine contents of Bezostoya wheat cultivars were increased by %60.47, %27.24 and %68.57 respectively, however, in Kutluk 94 wheat cultivars there were %46.94, %24.27 and %37.39 increases in polyamine contents by 10 mM boron stress as compared to control group. Addition of SNP to boron stress environment decreased the polyamine levels which caused by stress. However, best response obtained by 0.2 mM SNP concentration. Cysteine, GSH and GSSG levels of Kutluk 94 roots exposed to 10 mM boron concentration, decreased by %38.80, %31.06 and %52.87; while these levels in Bezostoya wheat plant roots decreased by %39.60, %41.87 and %56.89.

By 10 mM boron stress, PC₂ levels of Bezostoya wheat shoots increased by %94.49 as compared to the control group. This increase was %80.44 in Kutluk 94 wheat shoots. When 0.1, 0.2 and 0.5 mM SNP applied to 10 mM boron stress, PC₂ levels of Bezostoya wheat plant decreased by %19.02, %36.42 and %51.60; while these levels were %22.98, %39.35 and %45.08 in Kutluk 94. RT-PCR results of NR enzyme expression levels were decreased by 4.5 fold in Bezostoya wheat plant and 2.6 fold in Kutluk 94 by the addition of 10 mM boron. By 0.2 mM SNP addition, NR expressions were increased by 10.57, 6.65 fold in Bezostoya and Kutluk 94 shoots, respectively, as compared to 10 mM boron stress.

These results show that NO ameliorated many metabolic processes having vital importance in wheat growth and development. Thus, exogenous NO may be used as an amendatory in wheat cultivation areas having B toxicity problem.

Key Words: Wheat, Boron, Nitric Oxide, Polyamine, Organic Acid, Glutathione, Phytochelatine.

2016, 106 pages

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamları boyunca dış çevre ile sürekli iletişim halinde bulunurlar. Yaşadıkları ortamda canlıya uygun olmayan koşullar var ise bunlara uyum sağlayamayabilirler. Bitkiler ise canlıların büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Ortam koşullarının bitkinin normal gelişimini negatif bir şekilde etkilemesiyle bitkide oluşan duruma stres adı verilir [1].

Çevresel streslerde hücre içindeki metabolik faaliyetlerde reaktif oksijen türleri (ROS) ikincil haberciler olarak görev alırlar. Bu durum canlılarda tolerans mekanizmalarının gelişimini de etkilemiştir. Bitkilerde abiyotik stres çeşitleri içinde yer alan kuraklık, metal stresi, don stresi gibi streslerde reaktif oksijen türlerinin üretimi de tetiklenmektedir. Bu durum hücredeki antioksidan sisteminin dengesini bozmaktadır. Böylece zincirleme reaksiyonlar başlayarak reaktif oksijen türlerinin üretimi gerçekleşmektedir. Reaktif oksijen türlerinin artışı ile bitkiler oksidatif strese girmektedirler. Bitkilerde oksidatif stres altında reaktif oksijen türlerinin artışı ile birçok hasar oluşmaktadır. Bunlar DNA hasarı, enzimlerin aktivitesinde azalma, proteinlerin okside olması, apoptosis gibi hasarlardır [2].

Kimyasal sembolü 'B' olan Bor metal ile ametal arasında olan yarı metal bir elementtir. Erime noktası 2190 ± 20 °C olup yarı iletken bir maddedir. Toprakta bor derişimi 10 ile 20 ppm arasında değişmektedir. Amerika'nın batı kesimleri ve Akdeniz'den Kazakistan'a kadar olan topraklarda yüksek derişimlerde bor bulunur. Bor derişimi deniz sularında 0,5 – 9,6 ppm, tatlı sularda ise 0,01 – 1,5 ppm aralığındadır. Yüksek konsantrasyonda ve ekonomik önemi olan B yatakları, Türkiye ve ABD'nin kurak, volkanik ve hidrotermal etkinliğin fazla olduğu bölgelerinde bulunmaktadır [3]. Bor minerallerinden ticari bakımdan değerli olanlar; tinkal, kolemanit, üleksit, probertit, borasit, szyabelit, hidroborasit ve kernit'tir. Bor yüksek sıcaklıkta su ile reaksiyona girerek borik asit ve diğer ürünleri oluşturur. Mineral asitleri ile reaksiyonu, konsantrasyona ve sıcaklığa bağlı olarak yavaş veya patlama şeklinde olabilir ve ana ürün olarak borik asit oluşur [4].

Bitki büyümesi için gerekli olan bor, hücre duvarının yapısında bulunması zorunlu olan rhamnogalacturon II kompleksinin bir yapı bileşenidir [5]. Borun diğer yapısal veya metabolik süreçlerdeki rolü için güçlü kanıtlar şimdilik yeterli değildir. Büyük olasılıkla bor toksisitesi, borun birçok metabolite ilgisinin olmasından kaynaklanmaktadır. Genel olarak, bor nispeten reaktif olmayan ama *cis*- yapısındaki birden fazla hidroksil gruplarına sahip metabolitlerle birçok kuvvetli kompleksler oluşturabilir. Bunlardan, riboz toksisiteden etkilenebilecek en temel moleküllerden biridir. Çünkü fotosentez ve solunum sırasında enerji taşıyan ATP, NADH ve NADPH moleküllerine ait ribozların *cis*- hidroksil kısımları bora maruz kalır [6]. Bir ile 5 mM bor konsantrasyonunda moleküllerin bağlanması çok kuvvetli olmadığından toksisiteden etkilenme çok fazla gözlenmemektedir [5]. t-RNA'ya gen aktarımı sırasında borun, riboz moleküllerindeki *cis*- hidroksil radikallerine bağlanıp transkripsiyon veya translasyona girişim yaptığı öne sürülmektedir. Böylece ribozomal proteinler ve transkripsiyon faktörleri borun bağlanmasıyla inhibe olur [7].

Nitrik oksit (yaygın adı) ya da azot monoksit (sistemik adı) kimyasal formülü NO olan bir kimyasal bileşiktir. 1772 yılında Joseph Priestley tarafından yayınlanan bir makalede NO, sanayi atıkları, araç egzoz gazları ve sigara dumanının bileşiminde bulunan toksik bir bileşiktir. Sinyal bir molekül olarak bulunmasından önce, NO'nun oksidatif metabolizma ürünü olan toksik serbest radikal olduğu düşünüldü. Fakat bugünün araştırmacıları bu serbest radikalın çeşitli hücrel fonksiyonlarındaki etkilerine odaklanmışlardır.

Türkiye'de Orta ve Güney Anadolu Bölgesinde yapılan araştırmalarda arpa ve buğday üretim alanlarında, ciddi boyutta bor toksisitesi bulunmasına karşılık bunun yanında önemli miktarda da bor noksanlığı olduğu görülmüştür [8]. Konya ili tarım alanlarından topladıkları 667 adet toprak örneğinin analiz sonuçlarına göre, toprakların bitkiye elverişli bor kapsamının 0,01 – 63,9 ppm (ort. 2,48 ppm) arasında değiştiğini, araştırmacılar bu çalışmada toprakların elverişli bor kapsamının %26,5'inde yetersiz (< 0,5 ppm), %64,3'ünde yeterli (0,5 – 5 ppm) ve %9,2'sinde toksik (>5 ppm) düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. B toksisitesi ile mücadele bor noksanlığından daha zordur. Toprağın B'dan arındırılması konvansiyonel

yöntemlerle çok zor ve masraflıdır. Buğdayda genotipik varyasyonlardan yararlanma olanaklarının araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Türkiye’de tarım açısından önemli bir yeri olan buğday bitkisinin iki tescilli türünü (Bezostoya ve Kutluk 94) inceledik. Bezostoya buğday türü Bor’a hassas, Kutluk 94 buğday türü ise Bor’a toleranslı tür olarak bilinmektedir.

Buğdayın yetiştirilmesinde borlu topraklar büyük bir problem teşkil etmektedir. Özellikle bor toksisitesinin yaygın olduğu orta Anadolu bölgesinde buğday veriminde büyük kayıplar yaşanmaktadır. Bundan dolayı çalışmada bor stresini azaltmak amacıyla ortama eksojen olarak SNP (NO donörü) ilave ettik. Nitrik Oksit (NO) çeşitli hücrel fonksiyonlarda görevli bir sinyal moleküldür. Bu özelliğinden dolayı bor stresinde etki gösterebileceği ve stresin azaltılmasını sağlayarak buğday veriminde artışa sebep olabileceği düşünülmektedir.

Bor stresi ile buğday bitkisinde meydana gelen verim kaybının ve stres hasarlarının Nitrik Oksit ile gideriminin incelenmesi için iki buğday türünün gövde ve köklerinde çeşitli deneyler gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz bulguları literatür verileri ile destekledik. Ülkemizde özellikle kurak-yarı kurak ve bor toksisitesinin problem oluşturduğu bölgelerde buğday tarımının yapıldığı ekim alanlarında, eksojen olarak toprağa NO’nun düzenleyici bir besin olarak verilip verilemeyeceğinin araştırılması çalışmamızın esas amacıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkilerde Stres

Stres faktörlerinin sebep olduğu hasarlar, bitkilerin çevrelerine uyum sağlayabilme kapasitelerine göre değişiklik gösterir. Bu kapasiteleri sayesinde farklı bölgelerde farklı bitkiler en iyi şekilde yetişebilir. Biyoteknolojik çalışmalarla bitkilerin strese karşı toleransları geliştirilmekte ve ileride oluşacak beslenme sorunlarının önüne geçilmesi planlanmaktadır. Bitkiler strese iki farklı sistem ile cevap verirler. Birincisi bitkilerin kendi geliştirdikleri önleyici mekanizmalar ikincisi ise tolerans mekanizmalarıdır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır [1].

Tablo 2.1. Bitkilerde stres faktörleri.

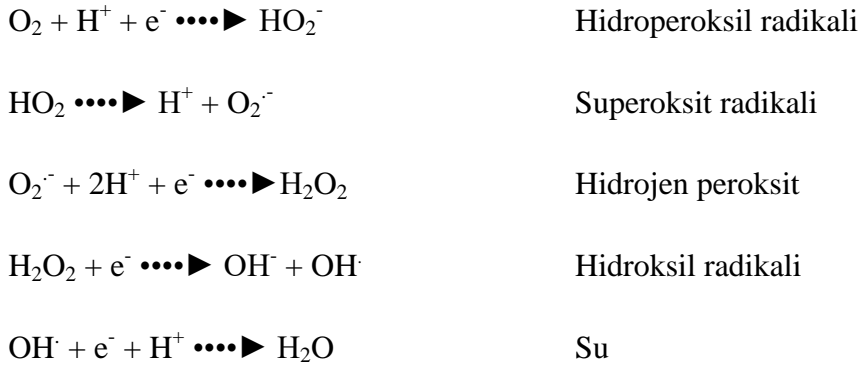
Abiyotik faktörler		Biyotik faktörler
Fiziksel faktörler	Kimyasal faktörler	
Kuraklık, sıcaklık, radyasyon, su baskını, mekanik etkiler (rüzgâr, kar ve buz örtüsü)	Hava kirliliği, bitki besin elementleri, pestisitler (zirai ilaçlar), toksinler, tuzlar, toprak pH'sı	Yabani bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar, hayvanlar

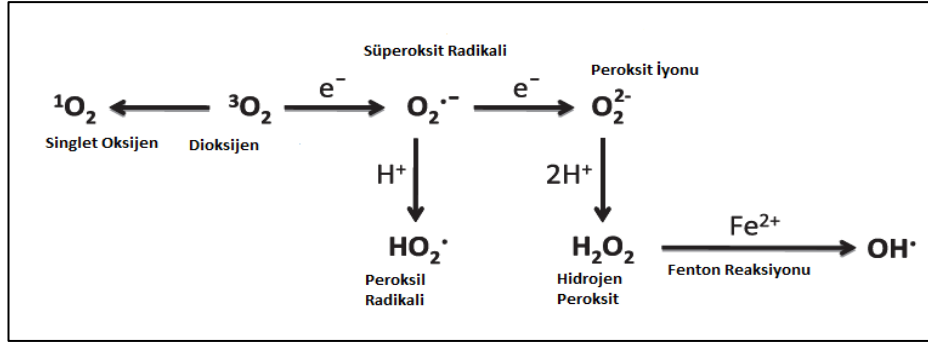
Bitkilerde başlıca stres çeşitleri, su (kuraklık), tuz, sıcaklık, soğuk, don, ışık, hastalık, su taşkını (fazla su), hava kirliliği, metal ve oksidatif strestir. Bitkiler hayatları boyunca çok çeşitli stres faktörüyle karşı karşıya gelmektedir. Bu stres faktörleri çok nadir olarak tek başına etki yapabilirler ancak çoğunlukla aynı anda etki gösterirler. Biyotik ve abiyotik faktörler ekonomik değeri büyük olan tahıllar başta olmak üzere, diğer bitki türlerinin de fizyolojilerinde değişimlere neden olabilirler. Bu stres çeşitleri bitkilerin büyüme ve gelişme süreçlerini yavaşlatarak, metabolik fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak bitki ölümlerine neden olur [9]

2.1.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikallerin, özellikle reaktif oksijen türlerinin [süperoksit molekülü ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinin (OH^{\bullet})] oluşumunu içeren ve reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS) aracılığıyla bitkilerde zararlara neden olan stres olarak tanımlanır [10]. Serbest radikaller, çiftleşmemiş elektron içerdikleri için yüksek derecede reaktif moleküllerdir. Bu radikaller; plazma membranı, mitokondri, endoplazmik retikulum membranlarında oluşabilirler [11]. Bitkilerde serbest radikallerin en çok üretildiği yer hücrelerdeki kloroplastlardır [12].

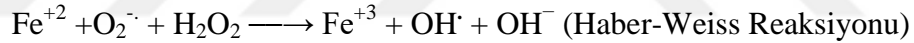
Aerobik canlıların hayatlarını devam ettirebilmesi için oksijen gerekir. Oksijen hücre içinde birkaç reaksiyonda görev alır ve sonuçta su oluşur böylece hücre kendisinin ihtiyacı olan enerjiyi de sağlamış olur. Ancak bazen oksijenin %2-3'ü suya dönüşmez, oksijen kaynaklı serbest radikal denen moleküllere dönüşür. Oksijen bir elektron alıp indirgenirse **süperoksit radikali**, iki elektron alıp indirgenirse **hidrojen peroksit** oluşur. Ortama üçüncü elektron katılması ile reaktifliği yüksek olan **hidroksil radikali**, dördüncü elektronun katılması ile **su** oluşur





Şekil 2.1. Enerji transferi sırasında ROS oluşumu.

Hidrojen peroksit yapısal olarak değerlendirildiğinde serbest radikal değildir. Ancak metabolik işlevlerine bakıldığında serbest radikal biyokimyasında reaktif oksijen türü (ROS) olarak görev yapar. Bunun nedeni Hidrojen peroksitin Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin bulunduğu ortamlarda **Fenton reaksiyonunu** başlatması, ardından süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında **Haber-Weiss reaksiyonunu** gerçekleştirerek hidroksil radikali (OH^{\cdot})'ni oluşturmasıdır. Oluşan bu hidroksil radikali (OH^{\cdot}) en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikalidir.



Serbest radikaller hücre duvarı ve membranına saldırarak, hücrelerin parçalanmasına, fotosentezde verim kaybına, yapraklarda dirilikte azalmalara ve bitkinin diğer stres faktörlerine karşı toleransının azalmasına yol açarak bitki büyümesinin azalmasına sebep olurlar. Serbest radikaller hücrelerin lipidlerine, proteinlerine, DNA yapısına, karbonhidratlarına ve diğer hayati önem taşıyan bileşenlerine zarar verirler [13].

Hidroksil (OH^{\cdot}) ve süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikalleri sitoplazma membranında, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olur. Membran permeabilitesinin artmasının sebebi de bu lipid peroksidasyonudur. Serbest radikallerden dolayı proteinlerin yapısında bulunan sistein, sülfidril yapıları ve amino asitlerin kalan kısımları oksitlenerek yıkıma uğrar, çekirdek ve mitokondriyal DNA da oksitlenir [14].

Hidroksil radikali (OH^{*}) hücre içindeki reaktivitesi en yüksek oksidanlardan biridir. Hücrelerin bu serbest radikali zararsız hale getirecek bir enzim sistemi bulunmadığından, OH^{*} diğer birçok biyolojik molekül ile tepkime oluşturabilmektedir. Aşırı miktarı ise hücre kaybına neden olur. hidroksil radikaline göre zararı kısmen daha az olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve O₂⁻ anyonu metal iyonları bulunan ortamda Haber– Weiss (Cu, Cu, Fe, Fe) yada Fenton (Fe ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) tepkimelerini gerçekleştirir [2].

Lipid serbest radikali (L[•]) ve lipid peroksit radikali (LOO[•]), hücre membranında reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu radikallerdir. Bu yapıların oluşması hücrede hasarın başladığının bir göstergesidir.

Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" adı verilir. Hücre membranında lipid peroksidasyonundan en çok doymamış yağ asitleri etkilenir. Lipid peroksidasyonun başlamasının temel sebebi doymamış yağ asitlerindeki çift bağdan bir hidrojen atomunun ayrılmasıdır. Bunun sonucunda yağ asidi bir radikal özelliği kazanır [14].

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıma uğradığında birçoğu biyolojik aktifliği yüksek olan aldehit moleküllerine dönüşür. Bu bileşikler hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. En az üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) oluşur. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu yüksek derecede hasar verebilen bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membranların yapısına ayrıca ürettiği reaktif aldehitlerle dolaylı olarak hücre içindeki diğer yapılara da hasar verir. Bu nedenle doku hasarlarına ve pek çok olumsuzluklara sebep olur. Lipid peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi ve tayin edilmesi oksitatif stres çalışmalarında çok önemlidir. Çünkü organizmada serbest radikallerin artışlarının kontrol edilebilmesi için farklı biyolojik örneklerde lipid peroksidasyon ürünlerinin derişimleri sık sık tayin edilmelidir. Serbest oksijen radikallerinin başlatmış olduğu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının son

ürünleri olarak lipid hidroperoksitleri (LOOH) meydana gelir. Oluşan bu lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler parçalanarak aldehitlerin, alkan, alken, hidroksialken, malondialdehit türevleri ve uçucu hidrokarbonlar oluşur. Serbest radikallerin artıp azaldığını belirleyebilmek için bu moleküllerin ölçümleri yapılabilir [14].

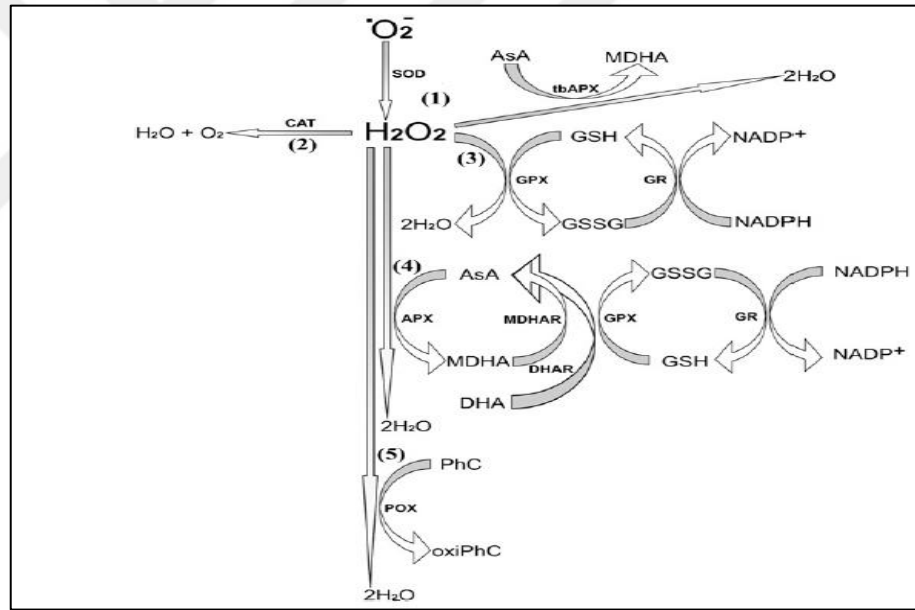
Proteinler serbest radikallere karşı doymamış yağ asitlerinden daha toleranslıdır. Proteinlerin serbest radikal hasarlarından etkilenme dereceleri yapılarındaki amino asitlerin türlerine bağlıdır. Doymamış bağlı ve kükürtlü amino asitler olan fenilalanin, histidin, metiyonin, sisteini içeren proteinler serbest radikallerden dolayı çok hızlı bir şekilde hasara uğrayabilirler. Serbest radikallerin vermiş olduğu hasarlardan dolayı sülfid bağı açısından zengin olan immünoglobülinin ve albüminin üç boyutlu yapılarında deformasyon gözlenir, bu da bu moleküllerin fonksiyonlarını yerine getirememelerine neden olur. Prolin ve lizin, serbest radikal üretim tepkimeleriyle karşılaştıklarında enzimatik olmayan bir hidroksilenmeye uğrayabilirler. Hem yapısına sahip olan hemoglobin de reaktif oksijen türlerinden büyük ölçüde etkilenir. Bu etkilenme sonucu hemoglobinin yapısı oksihemoglobin ya da methemoglobine dönüşür [14].

2.1.2. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar, Süperoksid Dismutaz (SOD), Askorbat Peroksidaz (APX), Glutasyon Peroksidaz (GPX), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon S Transferaz (GST), Katalaz (CAT), enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutasyon ve fenolik bileşiklerdir [2].

Major olan enzimatik antioksidanlar ROS'lara karşı özgül olarak yüksek bir ilgi duyarlar. Bunlardan Süperoksit Dismutaz (SOD); sitozolik Cu-ZnSOD, mitokondrial Mn-SOD, kloroplastal Fe-SOD dur. SOD bulunduğu bölgelerde $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ tepkimesini, katalaz (CAT) enzimi $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

tepkimesini, Peroksidazlar ($R/HOOH + R-H_2 \rightarrow R + 2H_2O/ROH$ tepkimesini, peroksiredoksinler $ROOH \rightarrow ROH$ tepkimesini, tiyoredoksinler ve glutaredoksinler $R-S-S-R \rightarrow 2R-SH$ tepkimelerini gerçekleştirir. Askorbik asit, glutatyon, prolin, poliaminler, betain, karotenler, bazı flavonoidler ve tokoferol gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ROS'lara karşı özgül değildir. Bunların önemli olmasının sebebi diğer moleküllere göre antioksidan gibi görev yapmalarıdır. ROS sönmüleyici görevinde bir grup enzim de vardır. Bunlar okside olmuş glutatyon ve askorbik asit gibi antioksidanları azaltan monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, tiyoredoksin redüktaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferazlar gibi enzimlerdir. Bu moleküller, metalotiyoneinler (küçük *cis* yapılı proteinler), fitoşelatinler (glutatyon oligomerleri), pektinler, hücre duvarındaki polisakaritler ve yapısal proteinler gibi moleküller de geçiş metallere katalitik aktivitesini azaltarak savunma sisteminde görev yaparlar [15-18].



Şekil 2.2. Bitkiden ROS gideriminin hücresel yolları.

(1) kloroplastlarda su-su döngüsünün bir bölümünde Süperoksit dismutaz; (2) Peoksizomlardaki katalaz; (3) Glutatyon peoksidaz ve kendi döngüsü; (4) Stoma, sitazol, mitokondri ve apoplastlarda askorbat-glutatyon yolağı; (5) Polyfenol oksidasyon. SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; APX, askorbat peoksidaz; MDHAR, monodehidroaskorbat redüktaz; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GR, glutatyon redüktaz; GPX, glutatyon peoksidaz; POX, peoksidaz; GSH, redükte glutatyon; GSSG, okside glutatyon; AsA, askorbik asit; MDHA, monodehidroaskorbat; DHA, dehidroaskorbat; PhC, fenolik bileşikler; oxiPhC, okside fenolik bileşikler.

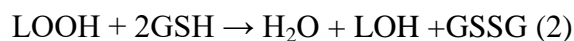
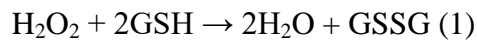
Glutasyon (GSH) düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Formülü γ -Glu-Cys-Gly olup yapısında glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) bulunur. Bitki dokularında milimolar konsantrasyonunda bulunur. GSH serbest tiyol grubuyla birlikte indirgenmiş (GSH) veya iki özdeş grup arasına disülfid bağı oluşturarak yükseltgenmiş (GSSG) şekilde bulunabilir. Yapısında bulunan sisteinden gelen kimyasal aktiviteye sahip ve suda çözünebilir -SH grupları GSH'a biyolojik özellikler kazandırmaktadır. Bu özellikler, büyüme, gelişme ve çevresel dış etkilere karşı bitkilerin cevap mekanizmaları gibi önemli özelliklerdir [19-21].

Glutasyon redüktaz (GR) hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan, oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir [22]. Askorbat-glutamat döngüsünde potansiyel bir enzimdir. Ayrıca, GSH'ın indirgenmiş bir şekilde kalmasını destekleyerek ROS'lara karşı savunma sisteminde temel bir rol oynar. Büyük bir miktarı kloroplastlarda bulunmasına karşın az da olsa mitokondri ve kloroplastlarda da lokalize olmuştur [23, 24].

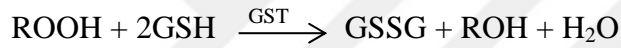


Bu enzim bitkilerde oksidatif prosesle NADPH'a bağlı reaksiyonla disülfid bağıyla bağlı GSSG'yi GSH'a indirgeyerek metabolik düzenleyici olarak görev yapar [25, 26]. Aslında, GSSG bir disülfid köprüsü ile bağlanmış iki GSH'tan oluşmaktadır. GSSG, GR tarafından GSH'a tekrar geri dönüştürülebilir [27].

Glutasyon Peroksidazlar (GPX), farklı izoenzimlere sahip geniş bir ailedir. H_2O_2 , organik ve lipid hidroperoksitleri indirgemek için GSH'ı kullanarak, oksidatif strese karşı bitki hücrelerini korurlar [28]. Millar ve ark. Arabidopsis bitkisinde sitozol, kloroplast, mitokondri ve kloroplastlarda GPX'i ait yedi adet benzer protein ailesi olduğunu tespit etmiş ve bunları AtGPX1-AtGPX7 şeklinde isimlendirmişlerdir [29]. GPX, H_2O_2 'yi iki molekül H_2O (Reaksiyon 1) ve bir molekül membran peroksidini (ROOH/LOOH) bir molekül H_2O 'ye ve alkole (ROH/LOH) indirger (Reaksiyon 2):



Bitkilerdeki glutatyon-S-transferazlar bilinen glutatyon-S-transferaz enzim ailesinin geniş bir ailesidir ve bunlar tripeptit glutatyon ile elektrofilik ksenobiyotik substratların konjugasyonunu katalize ederler. Bitkilerdeki herbisit detoksifikasyonu, antosiyanin vakuoler sekestrasyonunu, hormon homeostasisini, tirozin metabolizmasını, hidroperoksit detoksifikasyonunu, apoptoz düzenlenmesini ve biyotik-abiyotik streslerde bitki cevaplarını düzenlerler [30]. GST'ler DNA, RNA ve proteinlerle reaksiyona girebilen veya hasar verebilen sitotoksik ve genotoksik bileşiklerin bertaraf edilmesinde potansiyel bir göreve sahiptir [28]. GST'ler, GSH'ı kullanarak peroksitleri indirgeyerek sitotoksik ve genotoksik bileşik sönmleyiciler üretebilirler. Glutatyon-S-transferazlar; çevre kirleticilerinden ilaçlara, karsinojenlerden pestisidlere kadar birçok bileşiği metabolize edebilirler. Glutatyon-S-transferazların diğer bir fonksiyonu, lipid peroksitlerinin bozunma ürünleri ile GSH arasındaki konjugasyonda antioksidan olarak görev yapmalarıdır [31, 32].



2.2. Bor ve Özellikleri

Türkiye'de bor bileşiklerinden başlıcaları olan tinkal Eskişehir Kırka, kolemanit Kütahya Emet, Balıkesir Bigadiç ve Bursa Kestelek, üleksit ise Balıkesir Bigadiç'te bulunmaktadır. Dünyada bor rezervleri bakımından Türkiye birinci sırada yer almaktadır. Türkiye bor oksit (B_2O_3) bazında 851.000 milyon ton ile dünyanın en zengin bor ülkesidir. Türkiye, dünya görünür rezerv içinde %61,5, muhtemel rezerv içinde %77,3 ve toplam rezervde ise %72,3'lük bir orana sahiptir [33].

Tablo 2.2. Türkiye Bor rezervleri (Ton)

Türkiye Bor Rezervleri (Ton)	
Rezerv Yeri	Rezerv
Bigadiç (Kolemanit-Üleksit)	631.865.000
Emet (Kolemanit-Üleksit)	1.815.291.000
Kestelek (Kolemanit)	5.555.000
Kırka (Tinkal)	832.676.000
Toplam	3.285.087.000

(ETİ Maden bölüm raporu,2015)

2.2.1. Bor'un Toksik Etkisi

Bor (B) mineraline bitkiler eser düzeyde ihtiyaç duyarlar. Bitkiler tarafından kullanılan borun eksik miktarı ve toksik düzeyi birbirine oldukça yakındır [34]. Dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde B toksisitesi büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bor konsantrasyonunun yüksek olduğu ve az yağış alan bölgelerde yetiştirilen tarım ürünleri için bor sorunu yaygın bir problemdir [35]. Bor genellikle kurak tarım bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bu bölgeler tuzlu ya da tuzlu su ile sulanmış topraklardır [36]. Topraklardaki yüksek bor seviyesi gübreleme ve maden işletmeciliğinden de artış göstermiş durumdadır [37]. Dünyada kurak ve yarı kurak bölgelerdeki toprakta bulunan veya sulama suyu ile oluşan yüksek bor düzeyi bitki büyümesini olumsuz etkilemektedir [38]. Ayrıca bitkide yüksek konsantrasyonlarda bulunan bor, bitki verimini de azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda topraktaki bor miktarının eşik seviyesi 0,53 ppm olarak bulunmuş olup her ilave 0,1 ppm ile birlikte ürün veriminde %3,7 oranında azalmalar gözlenmiştir [39]. Bitkilerdeki aşırı bor miktarı sonucu gelişen mekanizmalar bor konsantrasyonlarına cevap oluşturacak şekildeki genetik varyasyonlara sebep olmuştur [40]. Bu mekanizmalara dayanan çalışmalara örnek olarak, buğday ve arpa gövdelerinde daha az bor biriktirmeleri gösterilebilir [41, 42]. Bazı bitkilerde bor toksisitesini azaltmak amacıyla antioksidan enzimler aracılığı ile bir antioksidan savunma öne sürülmüştür [43]. Antioksidan enzimlerin ve antioksidanların aktivitelerindeki değişim, bitkilerdeki oksidatif stresin bir göstergesi olduğu yapılan

araştırmalarda gösterilmiştir [44]. Tarımın bu kadar büyük öneme sahip olmasına rağmen, tarımda bor toksisitesiyle mücadele ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır [45].

Dünyanın farklı bölgelerinde B konsantrasyonunun fazla olduğu topraklarda, bitki büyümesi ve mahsul verimi düşmektedir [46]. Aşırı bora maruz kalmış bitkilerde canlılıkta azalma, büyümede yavaşlama, yapraklarda yanma, meyve sayısında ve byklğine azalma gibi semptomların olduğu gösterilmiştir [41, 37]. Bor toksisitesi nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi, elma köklerinde [47], buğday [48], arpa [49] ve domates [40] bitkilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca aşırı bor konsantrasyonu lipid peroksidasyonuna ve hidrojen peroksit birikimine sebep olarak bitkilerde oksidatif hasara neden olmaktadır [50, 47, 48].

Son 20 yıldır bazı bitkilerin neden bora karşı toleranslı olduğunu anlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bor toksisitesinin olduğu topraklarda bitkilerde bulunan tolerans mekanizmalarının, ürün verimini artırması umut edilmektedir. Bu çalışmaların neticesinde, toleranslı bitkilerde bor-efflux taşıyıcı genlerinin sentezlenmesiyle bor tolerans kabiliyetinin artabileceği düşünmektedir. Büyük olasılıkla taşıyıcı genlerin ekspresyonunun artmasıyla hücre duvarının gelişimi gibi temel apoplastik süreçlerde gerekli olan düşük seviyedeki bor taşınarak tolerans mekanizmasının gelişebildiği ileri sürülmektedir. Borlu toprak içeren seralarda ve çeşitli borlu solüsyonlarda yapılan çalışmalarda efflux taşıyıcı genlerinin daha fazla ekspresyonu ile bitki türlerinin daha iyi performans gösterebileceği çalışmaları yapılmaktadır. Ancak son 10 yıl içinde yapılan çalışmalarda kurak ve yarı kurak bölgelerde bu bitki kültürlerinin verimliliği konusunda yeterli sonuçlar henüz elde edilememiştir. En iyi izlenen örnek güney Avustralya'da bulunan Cezayir ırkı Sahra arpa eşitidi, bor tolerans genlerini taşıdığı için yüksek verimli çeşitlerin içinde son derece toleranslı tür olarak bulunmuştur. Yüksek verim alımında herhangi bir azalmanın olmadığı saha çalışmalarında kaydedilmiştir [51, 52]. Bor toksisitesinden kaynaklanan fizyolojik ve morfolojik değişikliklerden metabolik süreçleri korumak için hücresel mekanizmaların geliştirilmesi gerekmektedir. Çünkü bitkiler strese maruz kaldıklarında öngörülemez şekilde gelişimleri engellenmektedir [53].

Bitkiler diğer stres koşullarında gösterdikleri tepkiler gibi bor stresiyle de başa çıkabilmek için çeşitli biyokimyasal mekanizmalar geliştirmişlerdir. Biyokimyasal mekanizmalarını geliştirmelerinin sebebi stres koşullarına uyum sağlamaktır. Bu mekanizmalardan bazıları, köklerde alınan bazı iyonların biriktirilip bazılarının atılması, fotosentetik metabolik yolların değişimi, membran duvarındaki değişiklikler, antioksidan savunmadaki değişimler ve hormonal değişimlerdir [54].

Türkiye’de bor miktarı fazla olan bölgelerde akarsular yüksek oranda bor taşımaktadır. Bu akarsular sulama amaçlı kullanıldığında bazı bölgelerde bor kirliliği oluşmaktadır. Dolayısıyla topraktaki ve sudaki yüksek derişimdeki bor bitkiye geçmekte ve bitkide bor toksisitesi oluşmaktadır [55]. Türkiye’de Batı Anadolu Bölgesi dünya B rezervlerinin yaklaşık %61’ine sahiptir. Bu bölgede tarım alanlarında ve su kaynaklarında bor toksisitesi önemli bir problem teşkil etmektedir [56, 57].

2.3. NO ve Özellikleri

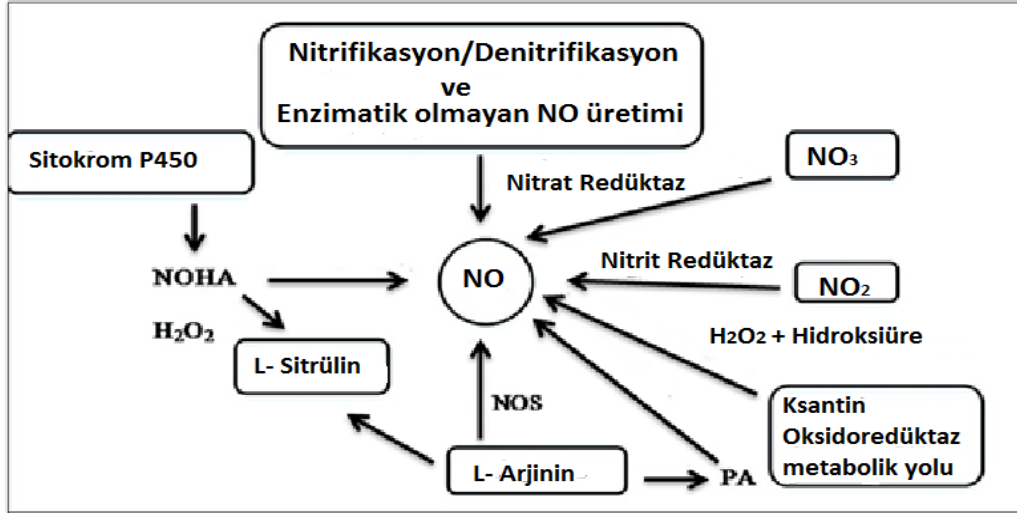
Nitrik oksit (bir kaç saniyelik ömrü olan), son derece reaktif ve membranlar arasında kolaylıkla difüze olabilen bir moleküldür. NO, nitrosonyum katyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-) ve nitroksil radikali (NO^\cdot) gibi kendi içinde değişebilir yapılarda bulunabilir. Bu özellikler nitrik oksiti geçici olarak ideal bir parakrin (komşu hücreler arasında) ve otokrin (tek bir hücre içinde) sinyalizasyon molekülü yapar [58]. NO kimyası ve difüzlenebilir davranışından dolayı sinyal reseptörlerine bağlanamaz. Biyolojik olarak aktif bir molekül olan NO, bitkilerde çeşitli fizyolojik süreçlerde anahtar bir rol oynar [59]. NO bitkilerde, enzimatik veya enzimatik olmayan sistemler tarafından üretilir [60, 61].

Geçtiğimiz on yıldan bu yana birçok araştırmacı, dışarıdan eklenen NO’nun, ağır metal toksisitesine etkileri üzerine pek çok çalışma yapmıştır fakat bu konudaki bilgiler oldukça sınırlıdır.

Bitkilerde NO araştırması son yıllarda büyük ilgi görmektedir. NO'nun bitkilerdeki esas görevi bitki büyümesi, gelişmesi ve farklı hücre içi süreçlerinde önemli bir sinyal molekülü olarak davranmasıdır. Farklı hücre tipleri üzerinde NO'nun etkilerinin toksik ya da koruyucu olması onun konsantrasyonuna ve durumuna bağlıdır [62]. NO bitki sinyalizasyonunda önemli bir yere sahiptir. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres durumlarında bitkilerin vermiş oldukları tepkileri düzenlediğine dair birçok kanıt vardır. NO çeşitli stres durumlarında ROS ile etkileşerek bir antioksidan gibi görev yapar [63, 64]. O_2^- molekülünün peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüştürülmesi gibi NO doğrudan ROS sönmleyici bir antioksidan olarak hareket edebilir. Çünkü hücre hasarının sınırlandırılmasında peroksitler daha az toksik olarak kabul edilir [65].

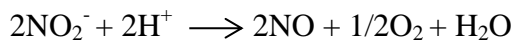
Düşük miktarlardaki NO, savunma sisteminin aktivasyonunda bir sinyal olarak hareket eder. Fakat yüksek dozları kontrolsüz ROS üretiminden dolayı birçok hasara sebep olur [66]. NO'de bulunan eşleşmemiş elektron çifti nedeniyle O_2^- molekülü etkileşime girebilir. Hücredeki miktarlarına göre ROS ile NO kombinasyonu toksik ya da koruyucu etki gösterebilir.

Bitki hücre ve dokularında evrensel bir sinyal molekül olan NO, Cd [67], Cu [68], Fe [69] gibi ağır metal içeren stres durumlarında anahtar bir rol oynar. Bu üç farklı türdeki elemente ait raporların dışında yüksek bor ortamında yetiştirilen bitkilere dışarıdan NO ilave edilmesinin etkilerinin araştırıldığı literatür bilgisi hemen hemen yok denecek kadar azdır. NO'nun aşırı borlu ortamlarda yetiştirilen bitkilerde yararlı olabileceği düşünülmektedir.

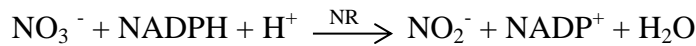


Şekil 2.3. Bitki hücresinde NO biyosentezi.

Buğdayda, NO enzimatik veya enzimatik olmayan bir mekanizma ile endojen olarak sentezlenebilir. NO, nitrit kaynaklı olabildiğinden, sentezlenmesi nitrit veya nitrat substrat konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir [70]. Bitki sistemlerinde endojen nitrik oksit üretiminden sorumlu birkaç enzim vardır. Bunlar, Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrik Oksit Sentetaz (NOS) gibi enzimlerdir [71]. Fakat sadece NR enzimini ile NO üretimi açıklanabilmiştir, NOS enziminin çalışma yolu henüz bitkilerde tamamen aydınlatılmamıştır [72]. NO sadece NO_2^- 'den asidik koşullar altında sentezlenir [73].



Nitrat redüktaz (NR) buğdayda hem nitrat asimilasyonu, hem de NO üretimi birincil enzimi olarak davranır. NR aktivitesi ile substrat konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır [74]. NR yüksek bitkilerde nitrat asimilasyon anahtar enzimidir. NR, NADPH'dan nitrate iki elektron transferi ile nitritin oluşumunu katalizler. Daha sonra nitrit amonyuma (NH_4^+), nitrit redüktaz (NIR) tarafından indirgenir. Oluşan bu amonyum amino asit sentezinde kullanılır. NR ayrıca ortamda fazla nitrit biriktiğinde NO üretme kapasitesine sahiptir [75]. NR'ın NO oluşturma oranı bitkilerdeki nitrit ve nitratın konsantrasyonuna bağlıdır.



2.4. Poliaminler ve Özellikleri

Poliaminler (PA) bütün canlı hücrelerde bulunan düşük molekül ağırlıklı, polikatyonik, azotlu büyüme düzenleyicileridir. Bitkilerde en yaygın poliaminler, diamin putresin (put), triamin spermidin (spd) ve tetraamin spermin (spm) özel koşullar altında uzun zincirli poliaminlerin birikimi ile oluşur [76, 77].

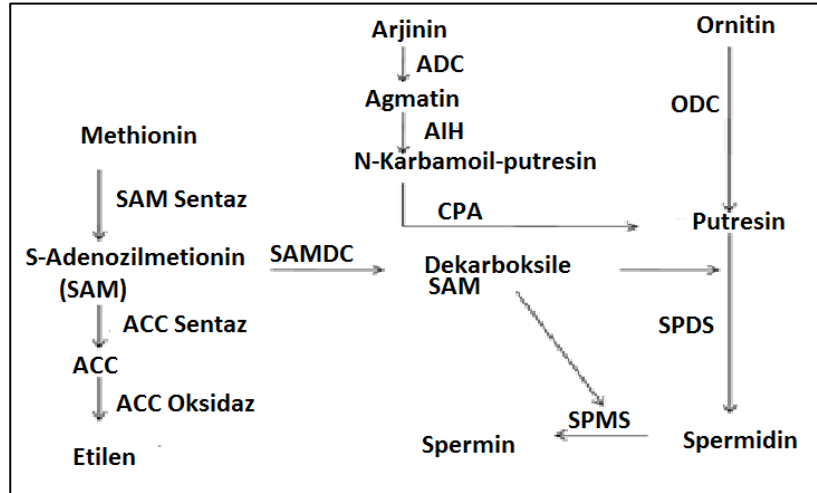
$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$ Putresin

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$ Spermidin

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$ Spermin

Poliaminler prokaryotlarda ve ökaryotlarda normal büyüme ve gelişme için gereklidirler. Bitkilerde poliaminler, hücre proliferasyonu, somatik embriyojenez, farklılaşma ve morfojenin düzenlenmesi, çimlenme, gelişme, meyve oluşumu gibi gelişimsel ve fizyolojik süreçlerde kritik rol oynarlar [78, 79]. PA'lerin aynı zamanda tuzluluk, don, kuraklık, potasyum eksikliği ve patojenlere karşı savunma sinyali oluşturma gibi çevresel streslere karşı toleransı arttırdığı bilinmektedir.

Bitki gelişiminde abiyotik ve biyotik streslerde NO ve PA ortak fonksiyonları göz önüne alındığında, NO ile PA-aracılı stres yanıtları arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir. Arabidopsis bitkisinde PA-kaynaklı NO biyosentezi üzerinde bulgular elde edilmiştir. NO'nun poliamin hareketliliğinde bir potansiyel molekül olduğu ve bunun da PA-aracılığı ile sinyalizasyon oluşturabileceği düşünülmektedir. Poliamin oksidaz (PAO) ve diamin oksidaz (DAO) sayesinde poliamin katabolizmasının bir sonucu olarak NO biyosentezi, PA-aracılı stres yanıtlarının birçok işlevini açıklamak için bir hipotez olarak sunulmaktadır [80].



Şekil 2.4. Bitkilerde poliamin biyosentezi.

ADC: arjinin dekarboksilaz; AIH: agmatin aminohidrolaz; CPA: N-karbomoil putresin aminohidrolaz; ODC: ornitin dekarboksilaz; SPDS: spermidin sentaz; SPMS: spermin sentaz; SAM sentaz: S-adenozilmethionin sentaz; SAMDC: S-adenozilmethionin dekarboksilaz; ACC sentaz: 1-amino siklopropan-1-karboksilik asit sentaz; ACC oksidaz: 1- amino-siklopropan-1- karboksilik asit oksidaz.

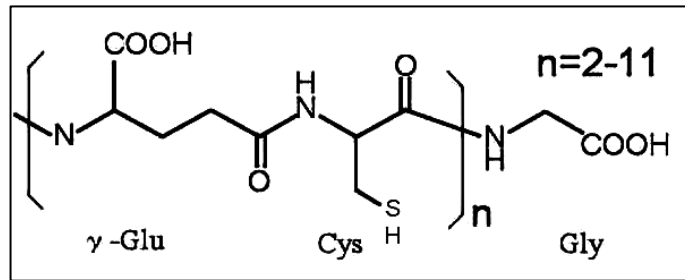
Poliaminlerin biyosentezi ve metabolizması yapılan çalışmalarla ayrıntılı biçimde incelenmiştir. Bitkilerde putresin, ornitin dekarboksilaz (ODC) aracılığı ile ornitinden veya arginin dekarboksilaz (ADC) aracılığı ile iki basamaklı bir reaksiyon sonucunda sentez edilir. Bitkilerde en yüksek miktarda bulunan poliamin putresindir. Bazı çalışmalarda portakal, portakal suyu, mandarin, altıntop suyu, ketçap, donmuş yeşil bezelye ve fermente soya sosu gibi test edilen besinlerin kilogramında 40 mg putresin bulunmuştur. Spermidin ise sperminden daha yüksek düzeyde bulunur. Baklagiller, armut, soya, karnabahar ve brokoli gibi besinlerde spermidin kilogramda 30 mg olarak bulunmuştur [81, 82].

Stres koşulları altında poliaminlerin, hücredeki işlevsel molekülleri ve membranları etkin bir biçimde koruduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [83]. Poliaminlerin, hücredeki diğer bazı koruyucu moleküllerin özelliğine benzer bir özellik göstererek hücrenin serbest radikallere karşı korunmasında görev yaptığı da düşünülmektedir. Bu özellikler hücrede pH'ın korunması, makro moleküllerin stabil halde tutulması ve hidrofilik olma gibi özelliklerdir [83, 84].

Poliaminlerin, serbest radikalleri temizleme ve membran stabilizesini sağlama gibi özellikleri onların çok yönlü fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir [85, 86]. Verma ve Mishra (2005), NaCl stresi altında *B. juncea* fidelerinde putresinin (put), H₂O₂ ve lipid peroksidasyonunu azalttığını belirtmişlerdir. Bu sonuç putresinin bir antioksidan gibi davrandığını göstermiştir [87]. Diğer bir örnekte ise putresin, tuz stresine maruz bırakılmış *Brassica*'nın yapraklarında antioksidan aktivitesinin ve karotenoidlerin miktarının artmasını sağlamıştır. Tuz stresi altındaki bitkiye spermidin ilave edildiğinde antioksidan enzim aktivitesinde, prolin miktarlarında, fotosentez içeriğinde ve büyümede artış olurken köklerdeki membran hasarlarında azalma gözlenmiştir [88, 89].

2.5. Fitoşelatinler ve Özellikleri

Fitoşelatinler (PC'ler) genel yapısı (γ -Glu-Cys)_n-Gly olan ve sisteince zengin küçük polipeptitlerdir [90]. Bu peptitler, birçok metali metal-tiyolat kompleksleri şeklinde alıkoyabilmekte ve ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır [18, 91]. Glu-Cys birimlerinin sayısına bağlı olarak PC'ler; PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ ve PC₆ olarak sınıflandırılmaktadır [92].



Şekil 2.5. Fitoşelatinin yapısı.

Glutatyon S-transferazlar ve PC sentaz GSH'ı tüketen reaksiyonları katalize etmekte ve sonuç olarak bu enzimlerin aktivasyonu glutamilsistein sentetaz (ECS)'ın GSH ile geri besleme inhibisyonunun üstesinden gelerek biyosentetik yolda bir artışa neden olabilmektedir. Sistein ve glisin kullanılabilirliği de GSH sentezinin düzenlenmesine katkıda bulunabilmektedir [93]. Bununla birlikte, GSH sentezinin oksidatif stres ile düzenlendiği bildirilmiştir [94]. Xiang ve Oliver (1998) Cd

stresinin PC sentazı aktive ederek GSH'dan PC'lerin sentezini teşvik ettiğini ve sadece GSH biyosentez yolunun transkripsiyonel aktivasyonu ile değil, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin oluşumu tarafından da GSH sentezinin teşvik edildiğini bildirmişlerdir [95]. PC sentaz aktivitesinin düzenlenmesi PC sentezinin düzenlendiği birincil nokta olduğu düşünülmektedir [90]. Çünkü bu enzim biyosentez yolundaki en yavaş enzimdir [93]. Bazı türlerde PC sentaz aktivesi hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel seviyede düzenlenmektedir [18].

Bitkilerde ağır metal birikimi PC'lerin üretimini teşvik etmektedir [96, 97]. Bitki dokularında PC üretiminin ağır metal birikimi ile pozitif korelasyon göstermesi PC'lerin ağır metal stresi tarafından teşvik edildiğini göstermektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar, glutatyon, askorbat, fenolik ve karotenoidler gibi düşük moleküler ağırlıktaki bileşikler içerir. Bunlar arasında, glutatyon bitki hücrelerinde büyük bir redoks bileşenidir ve oksidatif stres, ağır metaller ve ksenobiyotiklere karşı bitkileri korur. Glutatyon ayrıca, fitoşelatinlerin (PC) bir öncü molekülü olarak davranmaktadır. PC'ler bitkilerin ağır metal toksisitesine karşı geliştirdiği detoksifikasyon mekanizmalarıdır [98]. Arsenik ve selenyum gibi metalloidler tutulumu için ortama PC katılmasının, detoksifikasyon için iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir [99 - 101]. Fakat B toksisitesinin olduğu topraklarda yetişen bitkilerde PC'lerin etkileri hiç araştırılmamıştır.

Ağır metallerin bitkilerde vakuolde tutulması bitkideki ağır metal gideriminde önemli bir rol oynar. Sitozollerde sentezlenen PC'ler, PC-metal kompleksleri yaparak vakuole taşınır ve sitozolden ağır metal giderimi sağlanır [93, 102]. Glutatyon ve fitoşelatin sentezlenmesinden sorumlu genlerin tekrar düzenlenmesi ile bitkilerin toksik metal giderim kabiliyetleri geliştirilebilmektedir.

Glutatyon ve PC seviyelerinin düzenlenmesinde görev alan Glutamilsistein Sentetaz (-ECS), Glutatyon Sentaz (GS) ve Fitoşelatin Sentaz (PCS) enzimlerinin kodlanmasından sorumlu genler, toksik metal giderimi kabiliyetinin gelişmesi için önemli genlerdir [103].

Bitkilerin birçoğunda ve mayada bu genlerin yüksek oranda ekspresyonu ağır metal tutulmasına veya toleransına yol açabilmektedir [104]. *Arabidopsis thaliana* [105], *Triticum aestivum* [106], *Allium sativum* [107] ve *Brassica juncea* [108]'dan alınan fitoşelatin genlerinin değişik bitki ve mikroorganizmalarda fazla miktarda eksprese olmasıyla metal-tutucu protein miktarında artış sağlanmış, buna bağlı olarak ağır metal toleransı daha fazla gözlenmiştir.

Bugüne kadar elde edilen bulgularda, PC'lerin Cd toleransında önemli bir görev almadığı doğrultusundadır. Örnek olarak Cd'a toleranslı *Silene vulgaris* genotiplerinde Cd'a hassas genotiplere göre daha az miktarda fitoşelatin üretimi olduğu tespit edilmiştir [109]. Başka bir örnekte de, Cd-toleranslı *Thlaspi caerulescens*'in Cd-hassas *T. arvense*'ye göre daha az miktarda fitoşelatin sentezlediği saptanmıştır [110].

2.6. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asitler

Düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin (LMWOA), eser elementler ile kirlenmiş toprakta fitoremediasyonu artırdığı gösterilmiştir. Fitoremediasyon, kimyasal temizleme işlemine gerek kalmadan, bitkiler kullanılarak topraktaki ağır metallerin ve organik kirlerin giderilmesidir [111, 112]. Topraktaki organik asitlerin ana kaynakları köklerin terlemesi, bakteri ve mantarların parçalanmasıdır [113]. LMWOA içeren organik bileşiklerin aktif terlemesi veya kökten bileşiklerin pasif olarak kaybı sonucunda köklerdeki aktivite ile toprak yüzeyinde kök terlemesi (eksudasyon) oluşur [114]. Bitki köklerinin terlemesiyle toprağın pH'ı ve organik yapısı değişikliğe uğrayabilir [115]. Bitkiler ve mikroorganizmalar toprağa besin sağlamak, metal detoksifikasyonunu gerçekleştirmek [116], köklerdeki anaerobik stresi azaltmak, mineral ayrışmayı sağlamak ve mikrobiyal atıkları sönmölemek için organik asit salgılayabilir [117, 118]. Rizosferin asitlendirilmesi ve besinlerin çözündürülmesi fitoremediasyon ile gerçekleşir ve bu olayda LMWOA'lar önemli bir rol oynar. Düşük molekül ağırlıklı organik asitlerden en önemlileri olan sitrik asit, oksalik asit ve malik asit ağır metal çözünürlüğünü ve mineral besin hareketliliğini gerçekleştirir [114]. Kökler tarafından en sık salınan LMWOA'lar asetik asit,

fumarik asit, maleik asit ve laktik asittir. Bunlar, bitki türleri, toprağın fizikokimyasal özellikleri, iz elementlerin konsantrasyonu ve metallerin indirgen formuna bağlı olarak farklı bileşimlerde ve miktarlarda olabilirler [111, 119- 123].

Düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve ilgili bileşikler, her yerde bulunan polar ve suda çözünür bileşiklerdir. Aerosoller, yağmur suyu, buz kütleleri, deniz sedimentleri, tatlı sular ve toprak gibi çeşitli çevresel örneklerde bulunurlar. LMWOA'lar, trikarboksilik asit ara maddeleri oluşumu, katabolizma, anabolizma, glioksilat çevrimi, amino asit metabolizması gibi birçok biyolojik süreçlerde yer alır. Oksijensiz deniz sedimentlerinde, LMWOA'lar büyük moleküller arasında önemli aktif ara maddeler olarak hareket ederler. Metabolik aktiviteleri sırasındaki remineralizasyon son ürünleri ise CH_4 , SO_2 'dir [124]. LMWOA'lar mikrobiyal metabolitler ve bitki salgılarından oluşmaktadır ve bunlarda çeşitli işlevsel gruplar bulunmaktadır. LMWOA'lardan örneğin oksalik, sitrik, malik, malonik ve süksinik asitte 1-6 karbon atomu ve 1-3 karboksil grubu bulunmaktadır ve toprakta çözülmüş organik karbon miktarının %10'unu oluşturmaktadır [125, 126].

2.7. Buğdayın Tarım Açısından Önemi

Dünya'nın ve Türkiye'nin neredeyse her bölümünde üretimi yapılan buğday; gerek çok büyük üretici kitlesini ilgilendirmesi, gerekse insanların temel gıdası olan ekmeğin hammaddesini oluşturması bakımından oldukça önemli bir üründür.

Buğday üretimi, ülkemizin her bölgesinde yapılmaktadır. Bu nedenle buğday, tarla bitkileri içerisinde ekim alanı ve üretim miktarı bakımından ilk sırayı almaktadır. Son 20 yılda buğday ekim alanları 7,5-9,8 milyon hektar arasında; üretimi ise 17,2–22,05 milyon ton arasında değişmiştir. Ekmek, bulgur, makarna, irmik, bisküvi, nişasta ve buğdaya dayalı diğer unlu mamuller tüketimi dikkate alındığında buğday tüketimimiz 18-18,5 milyon ton düzeyindedir. Son 14 yıla bakıldığında buğday ekim alanlarının 7,5–9,4 milyon hektar arasında; üretim miktarının ise 17,2–22,1 milyon ton arasında değiştiği görülmektedir. 2007 yılında

yaşanan kuraklık nedeniyle üretim 17,2 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. TÜİK'e göre 2013 yılında buğday üretimi 22,050 milyon ton olup; 2014 yılı itibariyle 19,0 milyon tona düştüğü tahmin edilmiştir. Buğday Türkiye'nin her bölgesinde yetiştirilebilmekle birlikte özellikle Orta Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak üretilmektedir. Nitekim 2013 yılı ekmeçlik buğday üretiminde %36'lık pay ile ilk sırada Orta Anadolu Bölgesi yer almaktadır. Orta Anadolu'yu %15 oranıyla Marmara Bölgesi ve %14 oranıyla Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Üretimden en az payı %7 ile Doğu Anadolu ve Ege Bölgeleri almaktadır. Makarnalık buğday üretiminde ise ilk sırayı %46'lık payla Güneydoğu Anadolu Bölgesi almakta, ikinci sırada Orta Anadolu Bölgesi (%28), üçüncü sırada ise Ege Bölgesi (%13) yer almaktadır [127].

Üretim açısından yaklaşık 4 milyon işletmeyi başka bir ifade ile 15 milyon civarında insanı, tüketim açısından ise Türkiye'nin tüm nüfusunu ilgilendirmektedir. Türkiye'de oldukça fazla çeşit olmasına rağmen buğdayda uygun çeşit standardı, verim ve kalite sorunları henüz tam anlamıyla çözümlenememiştir. Türkiye'de buğday tarımı, büyük ölçüde kuru koşullarda yapıldığı için verim düşük ve dolayısıyla buğday üreticisinin geliri de diğer ürün üreticilerine göre daha azdır. Kuru ve yağışın az olduğu bölgelerde bor toksisitesi de toprakta karşılaşılan en büyük problemdir. Bor stresi ile birlikte buğdayda verim azalmaktadır. Bu hem üreticiye hem de ülke ekonomisine büyük darbe vurmaktadır. Bor toksisitesinden kaynaklanan verim kayıplarının önüne geçmek adına, ortama NO ekleyerek stres koşullarını normalleştirmek ve buğday verimini arttırmak bu çalışmanın temel amacıdır.

2.8. Literatür Özeti

Gezgin ve ark. (2002) Türkiye’de Orta ve Güney Anadolu’da arpa ve buğday üretimi yapılan bölgelerde yüksek oranda bor kirliliğinin olduğunu bildirmişlerdir [8].

Alonso ve ark. (2001) serbest radikallerin, hücre duvarı ve membranına saldırarak, hücrelerin parçalanmasına, fotosentezde verim kaybına, yapraklarda dirilikte azalmalara ve bitkinin diğer stres faktörlerine karşı toleransının zayıflamasına yol açarak bitki büyümesinin gerilediğini bildirmişlerdir. Ayrıca serbest radikallerin, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi fonksiyonel moleküllerine olan negatif etkilerini de rapor etmişlerdir [13].

Seçkin ve ark. (2005)’na göre bitkiler diğer stres koşullarında gösterdikleri tepkiler gibi bor stresiyle de başa çıkabilmek için çeşitli biyokimyasal mekanizmalar geliştirmişlerdir. Biyokimyasal mekanizmalarını geliştirmelerinin sebebi stres koşullarına uyum sağlamaktır. Bu mekanizmalardan bazıları, köklerde alınan bazı iyonların biriktirilip bazılarının atılması, fotosentetik metabolik yolların değişimi, membran duvarındaki değişiklikler, antioksidan savunmadaki değişimler ve hormonal değişimlerdir [54].

Wink ve ark. (1998) NO’nun bitkilerdeki esas görevinin bitki büyümesi, gelişmesi ve farklı hücre içi süreçlerinde önemli bir sinyal molekülü olarak davranması olduğunu ve farklı hücre tipleri üzerinde NO’nun etkilerinin toksik ya da koruyucu olması onun konsantrasyonuna ve durumuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir [62].

Bitkilerin yapısında poliaminlerden putresinin genellikle en yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda da portakal, portakal suyu, mandarin, altıntop suyu, ketçap, donmuş yeşil bezelye ve fermente soya sosu gibi besinlerde putresin miktarı kilogramında 40 mg olarak ölçülmüştür. Ayrıca baklagiller, armut,

soya, karnabahar ve brokoli gibi besinlerde, spermidinin sperminden daha yüksek oranda bulunduğu ve bu miktarın kilogramda 30 mg olduğu rapor edilmiştir [81, 82].

Liu ve ark. (2007) PA'lerin stres koşullarında biyomolekülleri korumada ve membran sistemlerinin denatürasyonunun önlenmesinde diğer bileşiklere göre daha iyi bir stabilize edici olduğu düşünülmektedir [83].

Mendoza-Cozatl ve ark. (2005) glutatyon S-transferazlar ve PC sentazın GSH'ı tüketen reaksiyonları katalize etmekte ve sonuç olarak bu enzimlerin aktivasyonu glutamilsistein sentetazın (-ECS) GSH ile geri besleme inhibisyonunun üstesinden gelerek biyosentetik yolda artışa neden olabileceğini, ayrıca sistein ve glisin kullanılmasının da GSH sentezinin düzenlenmesine katkıda bulunabildiğini belirtmişlerdir [93].

Ramos ve ark. (2007) ve Mendoza-Cozatl ve ark (2008) bitkilerde dokularında PC üretiminin ağır metal birikimi ile pozitif korelasyon göstermesi sonucu PC'lerin ağır metal stresi tarafından teşvik edildiğini öne sürmüşlerdir [96, 97].

Mendoza-Cozatl ve ark. (2005) ve Verbruggen ve ark. (2009)'na göre ağır metallerin vakuollerde alıkonulması maya, mantar ve bitkilerde ağır metal toleransının önemli mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Sitozolde sentezlenen PC'ler, PC-metal kompleksleri oluşturarak vakuole taşınmakta ve böylece sitozolden toksik elementlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır [93, 102].

Bitkiler ve mikroorganizmalar toprağa besin sağlamak, metal detoksifikasyonunu gerçekleştirmek, köklerdeki anaerobik stresi azaltmak, mineral ayrışmayı sağlamak ve mikrobiyal atıkları sönmölemek için organik asit salgılayabilir [116-118].

Jones ve ark. (1996)'na göre rizosferin asitlendirilmesi ve besinlerin çözünmesi fitoremediasyon ile gerçekleşir ve bu olayda LMWOA'lar önemli bir rol oynar. Düşük molekül ağırlıklı organik asitlerden en önemlileri olan sitrik asit, oksalik asit ve malik asit ağır metal çözünürlüğünü ve mineral besin hareketliliğini gerçekleştirir [114].

Kökler tarafından en sık salınan LMWOA'lar asetik asit, fumarik asit, maleik asit ve laktik asittir. Bunlar, bitki türleri, toprağın fizikokimyasal özellikleri, iz elementlerin konsantrasyonu ve metallerin indirgen formuna bağlı olarak farklı bileşimlerde ve miktarlarda olabilirler [111, 119-123].

Ekmek, bulgur, makarna, irmik, bisküvi, nişasta ve buğdaya dayalı diğer unlu mamuller tüketimi dikkate alındığında buğday tüketimimiz 18-18,5 milyon ton düzeyindedir. Son 14 yıla bakıldığında buğday ekim alanlarının 7,5-9,4 milyon hektar arasında; üretim miktarının ise 17,2-22,1 milyon ton arasında değiştiği görülmektedir [127].

Söylemezoğlu ve ark. (2009) iki asma türüne 20 mg/kg bor toksisitesi uygulamışlardır. Bor stresi ile birlikte bitki kuru ağırlığında azalma gözlenirken, prolin, MDA, H₂O₂ içeriklerinde artma olduğu rapor edilmiştir [128].

Kaya ve ark. (2015) domates bitkisinde 0,5, 3,5 ve 6,5 mg/L bor uyguladıklarında kök ve gövde kuru ağırlıklarında, Ca ve K miktarlarında azalmaların olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 0,1 mM SNP ile gövde kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı, Ca, K miktarları artış göstermiş, % elektrolitik azalmıştır [129].

Bastias ve ark. (2010) domates bitkisine 150 mM NaCl uyguladıklarında, bitkide Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn içeriklerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir [130].

Nable (1988) arpa ve buğday genotiplerini incelediğinde B hassas kültürlerin, B toleranslı kültürlerden daha fazla boru bünyesinde biriktirdiğini göstermiştir. Bu sonucun toleranslı genotiplerin köklerinin ortamdaki yüksek miktardaki borun alınımını kısıtlayacak yeteneğe sahip olduğunu kanıtladığını ileri sürmüştür [131].

Matoh (1997)'a göre aşırı bora maruz kalan bitkide bor, yaprak hücrelerinde birikim meydana getirir. Stoplazmaya sızarak stoplazmik metabolizmayı düzensizleştirir ve büyümede yavaşlamaya sebep olur [5].

Groppa (2008) buğday yaprakları ve filizleri kuraklığa maruz kaldığında ortama NO donörü olan SNP eklendiğinde, stoma kapanmasının uyarılmasıyla ve terleme oranının azaltılmasıyla su kaybında azalma olduğunu rapor etmiştir. Son yapılan çalışmalar poliamin ve NO sinyal metabolizmasının diğer metabolik yollarla ortak düşünülmesi gerektiğini göstermiştir [132].

Yamasaki ve ark. (2006) bazı oksidatif streslerde poliamin katabolizmasının ürettiği hidrojen peroksidin antioksidan savunma sistemini aktive ettiğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca fenil propanoid ve poliamin konjugatların da ROS ve NOS'lara karşı stres koşullarında bir antioksidan cevap oluşturacak şekilde hareket edebildiği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur [133].

Ruiz ve ark. (2003) ayçiçeği bitkisinde aşırı borun GSH sentezini inhibe ettiğini öne sürmüşler. Ayrıca dışarıdan ilave edilen antioksidanların borun oluşturduğu zararları azalttığını de belirtmişlerdir [134].

Foyer ve ark. (2005) GSH'ın sentezlenmesi sonucunda birden fazla hücrel reaksiyon için öncü moleküller oluşabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu reaksiyonlardan biri de iki glutatyonun (GSH) bir disülfid bağıyla bağlanıp GSSG molekülünü oluşturmasıdır. Ayrıca GSH ve GSSG arasındaki bu dengenin hücrel redoks durumunun korunması açısından gerekli olduğunu belirtmişlerdir [135].

Keltjens ve ark. (1998) fitoşelatinlerin, Ni gibi taşınım gerektiren metaller varlığında yoğun sentezlendiğini ve fitoşelatin biyosentezi gerçekleşirken GSH'ların öncü molekül olarak kullanıldığını ayrıca metal kaynaklı fitoşelatinlerin bitkilerde özellikle tahıllarda metal toksisitesinin bir belirteci olarak fonksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir [136].

Pb, Cd ve Cu gibi metallerin artışı, gıvışkan otu, buğday, mısır ve mikroalgler de metal toksisitesine sebep olur. Bitki büyümesini engeller ve fitoşelatin birikimini artırır [136-140].

Hoff ve ark. (1994) ve Crawford (1995) Nitrat redüktaz (NR)'ın nitrat asimilasyon metabolik yolunun birincil enzimi olduğunu ve bitkilerde stoplazmada nitratın nitrite indirgenmesini katalizlediğini belirtmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NR proteinlerinin düzenleyici özellikleri ve yapılarının karakterizasyonu üzerine odaklanılmıştır [141, 142].

Hoff ve ark. (1994) ve MacKintosh ve ark. (2001) NR geninin ekspresyonunu arttıran birincil etkenin ışık olduğunu, ışığın protein seviyesinde NR aktivitesini indüklediğini belirtmişlerdir. Fotosentez gibi nitrat asimilasyonunun da enerji tüketen bir metabolik yola sahip olduğunu ve ışık gerektirdiğini rapor etmişlerdir [141, 143].

Jones ve ark. (1998) soğuk stresi uygulanan domates bitkisinde NR gen ekspresyonunun azaldığını rapor edilmiştir [144].

Foyer (1998) kuraklığın mısır bitkisine olan etkisini incelemiştir. Mısır yapraklarında kuraklık etkisiyle NR genine ait mRNA seviyelerinin azaldığını belirtmiştir [145].

Oksidatif stres durumunda klorofil kaybı gerçekleşir. Bunun sebebi PS II kompleks proteinindeki dengesizlik sonucu oluşan fotosentetik yapıların hasar görmesidir [146].

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

H ₃ BO ₃	Sigma Aldrich
SNP (Sodyum Nitroprussid)	Sigma Aldrich
KNO ₃	Merck
Ca(NO ₃) ₂	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck
NaMoO ₄ .H ₂ O	Merck
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Tartarik asit	Merck
Titanyum (IV) klorür	Merck
Perklorik asit	Sigma Aldrich
NaClO ₄	Sigma Aldrich
H ₃ PO ₄	Sigma Aldrich
H ₂ O ₂	Sigma Aldrich
Sülfosalisilik asit	Sigma Aldrich
Toluen	Sigma Aldrich

Asetonitril	Sigma Aldrich
TBA (Tiyobarbütirik asit)	Sigma Aldrich
TCA (Trikloroasetik asit)	Merck
KNO ₂	Alfa Aesar
İzopropanol	Sigma Aldrich
Sülfanilamid	Sigma Aldrich
NED-HCl	Fluka
Sistein	Sigma Aldrich
GSH	Sigma Aldrich
GSSG	Sigma Aldrich
Glutasyon redüktaz	Sigma Aldrich
NADPH	Sigma Aldrich
t-butilhidroperoksit	Sigma Aldrich
CDNB	Sigma Aldrich
DTNB	Sigma Aldrich
Düşük molekül ağırlıklı organik asit kiti	Supelco
Poliamin Standartları	Sigma Aldrich
PC ₂ (Fitoşelatin 2)	Anaspec
Real Time - PCR Kiti	Thermo Scientific

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

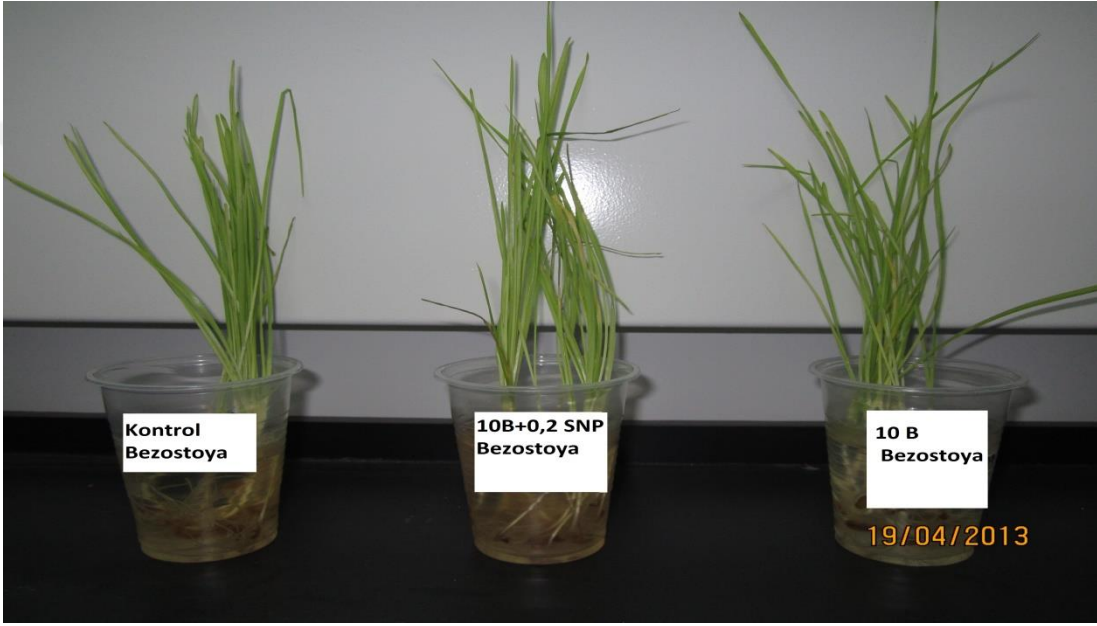
1. Hassas Terazî (Sartorius)
2. Homojenizatör (IKA)
3. Mikrodalga bozundurma Sistemi (Cem Mars 6)
4. ICP-MS (Agilent 7700 Serises)
5. UV-VIS spektrofotometre (Agilent Cary 60)
6. HPLC (Agilent 1200 Affinity)
8. Termocycler (BioRad, T100)
9. Real Time PCR (Thermo Scientific)
10. Etüv (Mettler UNB400)
11. Vorteks (Daihan)
12. Mikro Santrifüj (Hettich Micro 200R)
13. Çalkalayıcı (IKA-KS400)
14. Su banyosu (Mettler WNE10)
15. Ultrasonik Banyo (Daihan, Wise Clean)

3.2. Bitki Büyüme Koşulları

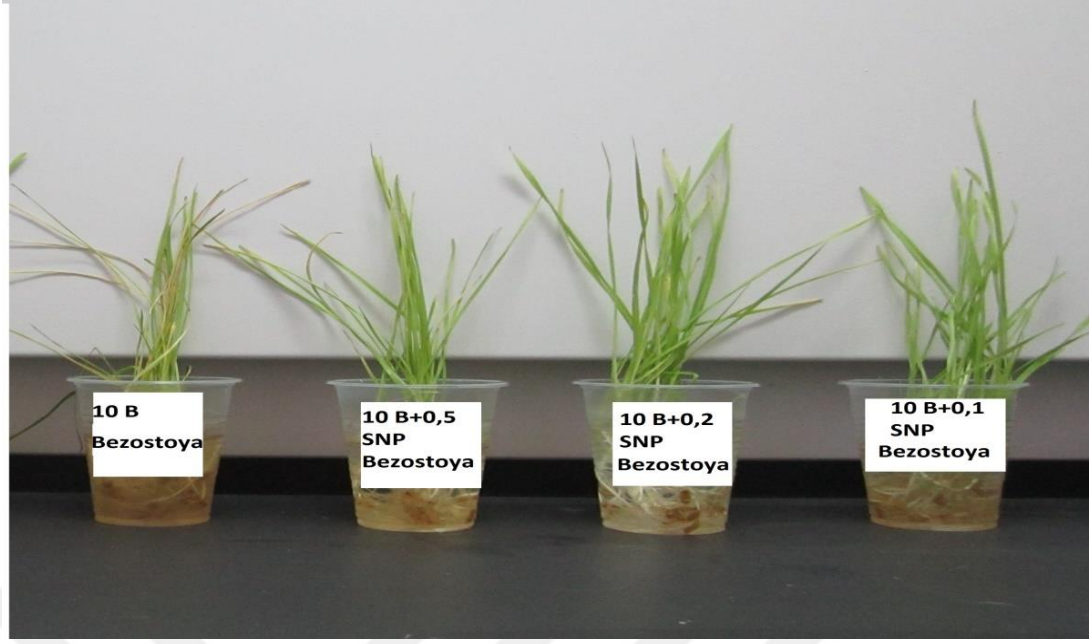
Bu tez çalışmasında Türkiye’de tarım açısından ekonomik öneme sahip buğday bitkisi kullanıldı. Bor konsantrasyonunun yüksek olduğu tarım arazilerinde yetiştirilen buğdayda, aşırı bordan kaynaklanan bitki stresi oluşmaktadır. Bu stres buğdaya zarar vermekte ve ürün verimini azaltmaktadır. Buğday bitkisini bor stresinden korumak amacıyla, büyüme koşullarına eksojen olarak SNP (Nitrik Oksit donörü) ilave edildi. Nitrik oksitin, bor stresine olan etkilerinin incelenerek bitkinin normal gelişim düzeylerine tekrar geri dönüp dönemediği yaptığımız deneyler sonucu elde edilen verilerle yorumlandı. Çalışmamızda kullandığımız buğday tohumları Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden (Eskişehir) temin edildi. Deneylerimizde buğdayın iki tescilli türü olan Bezostoya (bora hassas) ile Kutluk 94 (bora toleranslı) kullanıldı.

Buğday tohumları, %10’luk hipoklorit çözeltisi ile 20 dakika dezenfekte edilip distile su ile yıkanarak, daha sonra 10 gün 25 °C’de nemli iki kurutma kağıdı arasında çimlendirildi. 10 günlük fideler, 1,02 g/L KNO₃, 0,492 g/L Ca(NO₃)₂, 0,23 g/L KH₂PO₄, 0,49 g/L MgSO₄.7H₂O, 1,81 mg/L CuSO₄.5H₂O, 0,22 mg/L ZnSO₄.7H₂O, 0,09 mg/L NaMoO₄.H₂O ve FeSO₄.7H₂O (%0,5) ile tartarik asit (%0,4) içeren çözülden 0,6 mL/L olacak şekilde Arnon ve Hougland (1938) [147] tarafından önerilen büyütücü solüsyona aktarılıp, büyütücü solüsyona farklı konsantrasyonlarda, bor ve nitrik oksit ilave edilip değişimler incelendi. Büyütücü solüsyon, pH değişimini engellemek ve besin takviyesi yapabilmek için haftada dört kez değiştirilip sürekli havalandırıldı. Buğday fideleri 25 °C’de 16 saat ışık / 8 saat karanlık büyüme çemberinde gözlendi. Çalışmalarımızda 10 mM bor konsantrasyonuna 0,1, 0,2 ve 0,5 mM Sodyum Nitroprussid (SNP) ilave edildi. Bor konsantrasyonları borik asit (H₃BO₃), NO konsantrasyonları Nitrik Oksit (NO) donörü olan Sodyum Nitroprussid (SNP) (Na₂Fe(CN)₅NO.2H₂O) kimyasallarından hazırlandı. Deney setimiz; kontrol (bor ve SNP hariç), 10 mM bor (borik asitten hazırlandı) (10 B), 10 mM bor + 0,1 mM SNP (10 B+0,1 SNP), 10 mM bor + 0,2 mM SNP (10 B+0,2 SNP), 10 mM bor + 0,5 mM SNP (10 B+0,5 SNP) olarak hazırlandı.

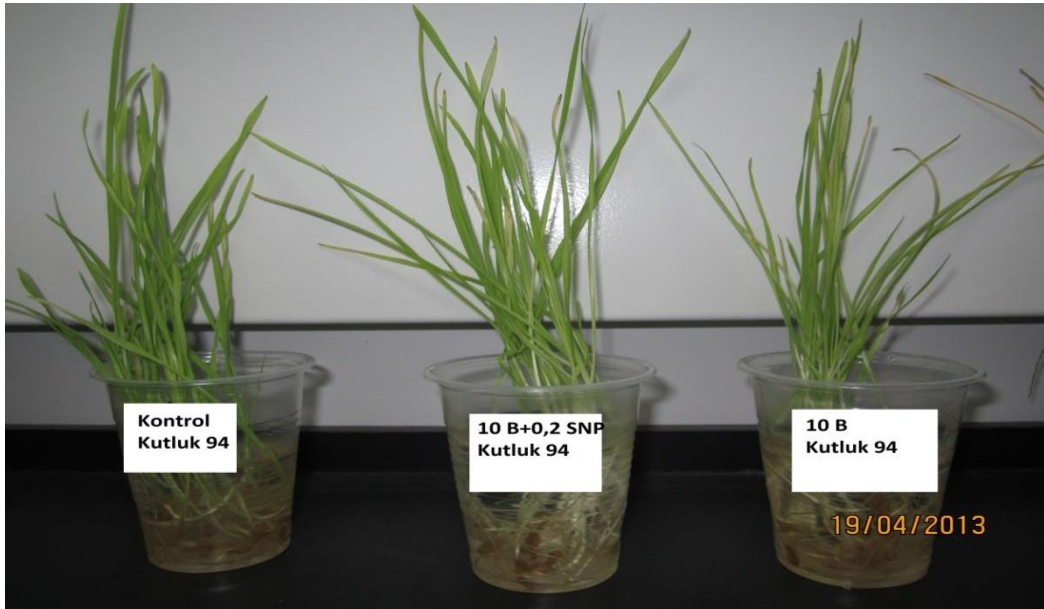
Bor stresine en iyi cevap oluşturan SNP konsantrasyonu deneylerimizden elde ettiğimiz verilere göre yorumlandı. Gövde ve köklerin boy uzunlukları, ağırlıkları, % elektrolitik iletkenlikleri, MDA içerikleri, prolin içerikleri, hidrojen peroksit içerikleri, Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, Glutasyon-S-Transferaz, Nitrat Redüktaz enzimlerinin aktiviteleri, düşük molekül ağırlıklı organik asit miktarları, metal miktarları ve poliamin düzeyleri, glutasyon (GSH/GSSG), sistein, fitoşelatin (PC₂) içerikleri analiz edildi.



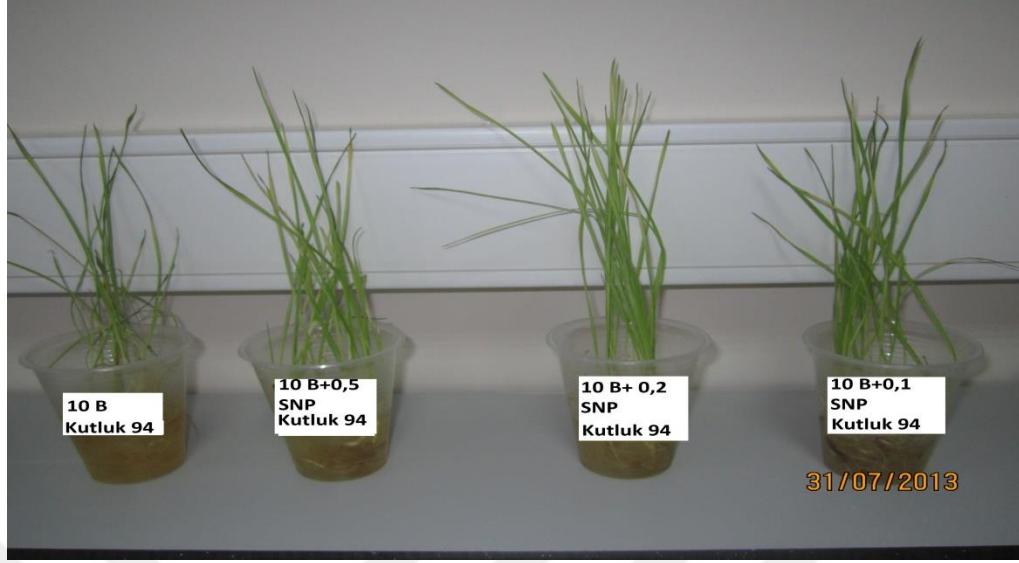
Şekil 3.1. Bezostoya buğday türünde, Kontrol (borsuz), 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B uygulamasının 7. günü resimleri.



Şekil 3.2. Bezostoya buğday türünde, 10 mM B, 10 mM B+0,5 mM SNP, 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B+0,1 mM SNP uygulamasının 7. günü resimleri.



Şekil 3.3. Kutluk 94 buğday türünde, Kontrol (borsuz), 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B uygulamasının 7. günü resimleri.



Şekil 3.4. Kutluk 94 buğday türünde, 10 mM B, 10 mM B+0,5 mM SNP, 10 mM B+0,2 mM SNP ve 10 mM B+0,1 mM SNP uygulamasının 7. günü resimleri.

3.3. Fotosentetik Pigment İçeriği Ölçümü

Buğday taze yapraklarından 0,5 g alınarak üzerine 25 mL %100'lük aseton ilave edildi. Daha sonra bir dakika boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerin üst fazı alınarak spektrofotometrede 470, 645 ve 662 nm'de absorbansları okundu. Fotosentetik pigment içerikleri Lichtenthaler ve Wellburn (1983) tarafından geliştirilen yöntemle göre hesaplandı. Klorofil a (Kl a), klorofil b (Kl b), toplam klorofil (Kl a+Kl b) ve toplam karotenoid içerikleri mg/g taze ağırlık olarak tayin edildi [148].

$$Kl\ a = 11,75\ A_{662} - 2,350\ A_{645}$$

$$Kl\ b = 18,61\ A_{645} - 3,960\ A_{662}$$

$$\text{Toplam Karotenoid} = (1000\ A_{470} - 2,270\ Kl\ a - 81,4\ Kl\ b)/227$$

3.4. Elektrolitik İletkenlik (%) (EL) Ölçümü

Elektriksel iletkenlikleri Masood ve ark. (2006)'na göre hesaplandı. 0.2 g taze bitki örnekleri 20 mL deiyonize suda 2 saat, 25 °C'de 100 rpm'de bekletildi ve elektriksel iletkenlikleri kondüktometre ile ölçüldü (EC1). Daha sonra, bitki örnekleri kaynar suda 10 dakika karıştırılarak bekletildi. Tekrar iletkenlikleri ölçüldü (EC2). Bu iki ölçümden sonra elektriksel iletkenlik değeri (% EL) hesaplandı. $EL=(EC1/EC2) \times 100$ [149].

3.5. Hidrojen Peroksit Ölçümü

Hidrojen peroksit içeriği Jana ve Choudhuri (1981) tarafından önerilen metoda göre belirlendi. Buğday bitkilerinin gövde ve kökleri yaş olarak tartılıp 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 6,5) homojenize edildi ve 10000 g'de 25 dakika santrifüjlendi. Çözelti alındı üzerine %1,0'lik titanium (IV) klorür (v/v) eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 10000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantın 410 nm'deki absorbansı ölçülerek hidrojen peroksit konsantrasyonu hesaplandı ($\epsilon=0.28 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [150].

3.6. Prolin Ölçümü

Prolin içeriği Bates ve arkadaşları (1973) tarafından belirlenen metoda göre tayin edildi. Buğday bitkisinin gövde ve köklerinden 0,5 g alınıp %5'lik sülfosalisilik asit solüsyonunda homojenize edilip 13000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alınıp üzerine 1 mL glasiyer asetik asit ve 1 mL taze hazırlanmış ninhidrin çözeltisi eklenerek 95 °C'de 1 saat inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutuldu. Örneklerin üzerine 2 mL toluen eklenerek vorteksle 20 sn karıştırılıp toluen fazı alınıp 520 nm de köre karşı absorbansı alındı. Prolin konsantrasyonu prolin standart eğrisi oluşturularak $\mu\text{mol/g}$ yaş ağırlık olarak hesaplandı [151].

3.7. MDA (Lipid Peroksidasyonu) Ölçümü

Lipid peroksidasyonu Heath ve Packer (1968) tarafından belirlenen metoda göre hesaplandı. Bu metoda göre lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak MDA' yı kabul eden tiyobarbütirik asit testi kullanıldı. Bir g taze bitki örneği (gövde ve kök), %20 trikloroasetik asit ve %0,5 tiyobarbütirik asit içeren 10 mL çözeltilde homojenize edildi. Homojenat 95 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve 10000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. 532 ve 600 nm de süpernatantın absorpsansı okunup, 600 nm'deki spesifik olmayan absorpsans çıkarıldı. Kırmızı renkli MDA-TBA kompleksinin miktarından lipid peroksidasyon değişimleri hesaplandı.

($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [152].

3.8. Enzim Aktivitesi Ölçümleri

Nitrat redüktaz enzim aktivitesi dışındaki diğer enzimler (GPX, GR, GST) için ekstraksiyon işlemleri aşağıdaki gibidir.

Taze buğday gövde ve köklerinden 0,5 g alındı +4 °C'de 10 mL, 50 mM fosfat tamponunda homojenize edildi. Fosfat tamponu içinde 0,2 mM EDTA, %0,1'lik polivinilpiridon (PVP) hazırlandı. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ham enzim kaynağı için kullanıldı. Enzim aktivitelerinde kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı.

1. 0,05 M fosfat tamponu (pH:7.0): 3,549 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve pH 7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
2. 0,019 M H_2O_2 : 0,1 mL hidrojen peroksit (H_2O_2) alındı bir miktar saf suda çözüldü ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.
3. 1 M Tris-EDTA/5mM EDTA (pH:8): 6,05 g Tris ve 0,073 g EDTA bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 8'e ayarlandı ve daha sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.
4. 0,033 M okside glutatyon (GSSG): 0,2 g GSSG alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

5. 2 mM NADPH (nikotinamid adenin dinükleotidfosfat, indirgenmiş hal): 0,0167 g NADPH alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

6. 2 mM NADP (nikodinamid adenin dinükleotidfosfat, yükseltgenmiş hal): 0,0513 g NADP⁺ alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

7. 0,1 M redükte glutasyon (GSH): 0,155 g GSH alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 5 mL'ye tamamlandı.

8. 0,01 M glutasyon redüktaz: 0,1 g glutasyon redüktaz alındı, bir miktar Tris-EDTA içerisinde çözüldü sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

9. 30 mM CDNB: 0,03 g CDNB (1-kloro-2,4- dinitrobenzen) tartıldıktan sonra 5 mL saf etanolde çözüldü.

3.8.1. Nitrat Redüktaz (NR)

NR (E.C. 1.6.6.1) Jaworski (1971) tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. 540 nm de absorbans ölçümü ile tayin edildi. İki yüz mg taze örnek (gövde ve kök) 2 saat 30 °C'de 2,5 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH:7,5), 0,5 mL 0,2 M KNO₃ çözeltisi ve 2,5 mL, %5'lik izopropanol ile 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 300 µl %1'lik sülfanilamid ve 400 µl %0,02 lik NED-HCl reaksiyon karışımına eklenerek reaksiyon durduruldu. UV-Vis spektrofotometresinde 540 nm'de absorbans okundu. KNO₂ çözeltisinden NO₂⁻ standart grafiği çizilerek sonuçlar hesaplandı [153].

Nitrat Redüktaz enzim aktivitesi:

$$\text{nmol NO}_2^- / \text{s. g taze Ağırlık} = \frac{\text{nmol NO}_2 (t_1) - \text{nmol NO}_2 (t_0)}{\text{g Taze Ağırlık}}$$
 formülüne göre hesaplanmıştır.

(t₁:Bir saat inkübe edildikten sonraki NO₂⁻ nmol sayısı, t₀: Başlangıçtaki NO₂⁻ nmol sayısı)

3.8.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

GPX (EC 1.11.1.9) ile t-bütül hidroperoksit, GSH'nin GSSG'ye dönüşmesini sağlar. Bu tepkime sonucu oluşan okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) enzimi ile tekrar GSH'a indirgenir. Bu metod NADP'ye oksitlenen NADPH'ın 340 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır. Köre ve küvete kimyasallar eklendikten sonra 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından numune küvetine t-bütülhidroperoksit ilave edildi ve köre karşı absorbans ölçüldü [154].

Küvet içeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Tris-EDTA	300	300
GSH	60	60
Glutasyon redüktaz	300	300
NADPH	300	300
örnek	30	-----
Distile su	1980	2010
t-butülhidroperoksit	30	30

3.8.3. Glutasyon Redüktaz (GR)

GR (EC 1.6.4.2), GSSG'nin NADPH tarafından GSH'a indirgenmesini katalize eder. Enzim aktivitesi, tepkime sırasında yükseltgenen NAD(P)H'ın 37 °C'de 340 nm dalga boyunda absorbans farkı ölçülerek belirlendi [154].

Küvet içeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Distile su	2370	2400
Tris-EDTA	150	150
NADPH	150	150
GSSG	300	300
Örnek	30	-----

3.8.4. Glutasyon - S - Transferaz (GST)

GST (EC 2.5.1.18), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun -SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm’de 37 °C’de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S⁻², 4-dinitrofenilglutasyonun 1 mikro molünü katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlendi [155].

Küvet içeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Fosfat tamponu	2650	2800
CDNB	60	60
GSH	150	150
Örnek	150	-----

Enzim aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Aktivite (U / ml)} = (\Delta E / \Delta t) \times V / (\epsilon \times d \times v)$$

ϵ : Molar Soğurma Katsayısı

V : Son hacim

d : Işık yolu (cm)

$\Delta E / \Delta t$: Birim zamanda (1 dak) absorpsiyon farkı

v : Kullanılan enzimin hacmi

3.9. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit (LMWOA) Ölçümü

Organik asit tayininde kullanılan buğday gövde ve kökleri Bevilacqua ve Califano (1989) tarafından belirlenen yöntem modifiye edilerek hazırlandı. Birer g taze gövde ve köklerden alınarak üzerine 2,5 mL 0,009 N H₂SO₄ ilave edildi. Daha sonra homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenizasyondan sonra çalkalayıcı ile 1 saat boyunca bekletildi. Karıştırmadan sonra 15 dakika 15000 rpm de santrifüj edildi. Üst faz alınıp 0,45µm membran filtreden geçirildi.

Organik asit tayini Bevilacqua ve Califano (1989) tarafından belirlenen yöntemle göre HPLC cihazında tayin edildi. Cihazda, Hi-Plex H, 300 x 7.7 mm HPLC kolonu (Agilent), Diyot Array Dedektör (DAD) sistemi ve mobil faz olarak 0,009 N H₂SO₄ çözeltisi kullanıldı, sıcaklık 25 °C ve akış 1 mL/dak olarak koşullar ayarlandı. Organik asit standartlarının 210 nm'deki piklerine ait kalibrasyon grafikleri çizilip örnek içindeki miktarlar tespit edildi. Benzoik asit, oksalik asit, malik asit, malonik asit, süksinik asit, formik asit, propiyonik asit, bütirik asit, standartlarına ait absorpsiyon ve alıkonma zamanı grafikleri şekil 4.12' de gösterilmiştir [156].

3.10. Poliamin (Putresin, Spermidin, Spermin) Ölçümü

Poliamin analizi Duan ve arkadaşlarının (2008) [157] önerdiği yöntem modifiye edilerek yapıldı. Taze buğday bitkisinin gövde ve kökleri %5'lik (v/v) soğuk perklorik asit ile homojenize edildi. İç standart olarak 1,6-hexandiamin ilave edildi. 12000 g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant alınarak benzolasyon işlemine geçildi. 2 M NaOH (2 mL), 15 µl benzol klorür ilave edildi ve vortekslendi. Otuz dakika inkübe edilen örneklere 4 mL doygun NaCl eklenip reaksiyon sonlandırıldı. Karışımın üzerine 3 mL soğuk dietil eter eklendi. Daha sonra eter uçurularak 1 mL metanol ilave edildi. 0,45 µm'lik filtreden süzülen örnekler HPLC cihazında analiz edildi. Analiz koşulları: mobil faz:%64 lük metanol, akış; 0,7 mL /dak, sıcaklık: 25 °C olarak ayarlandı. 4,6x250mm çapına ve 5 mm partikül büyüklüğüne sahip kolon (Agilent) kullanıldı. 254 nm de DAD dedektörlü Agilent marka HPLC sisteminde analiz gerçekleştirildi. Putresin, spermidin ve spermin

standartlarına ait kalibrasyon grafikleri çizilerek sonuçlar hesaplandı. Örneğe ve standartlara ait kromatogram Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

3.11. Metal İçeriği Ölçümü

Deneyimizde buğday bitkisinin Kutluk 94 ve Bezostoya türlerinin gövde ve kökleri kullanıldı. 10 gün çimlendirilen fideler Hougland solüyonuna ilave edilen bor ve SNP ile 7 gün muamele edildi. Daha sonra bu 7 günlük bitkilerin gövde ve kökleri etüvde 80 °C'de kurutuldu. Kurutulmuş bitkilerden 0,5'er g alınarak üzerine 10 mL nitrik asit ilave edilerek mikrodalga bozundurma işlemi yapıldı. 200 °C sıcaklık,15 dakika ramp, 20 dakika hold ve 20 dakika cooling programında bozundurma işlemi gerçekleştirildi. Mikrodalga bozundurma ön işleminden sonra ICP-MS cihazında metal tayini yapıldı. ICP-MS cihazı ile K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B elementlerine ait standartlarla kalibrasyon grafikleri çizilip örnekler analiz edildi. Metallerine ait kalibrasyon grafikleri şekil 4.14'de gösterilmiştir.

3.12. Sistein, GSH, GSSG, Fitoşelatin Ölçümü

Sistein, GSH ve GSSG içerikleri Yılmaz ve arkadaşlarının (2009) önerdiği yöntem modifiye edilerek analizlendi. Standart çözeltiler 50 mM NaClO₄ ve %0,1'lik H₃PO₄ tampon karışımında hazırlandı. Buğday örneklerinden, 0,5 g taze örnek alındı. Üzerine 5 mL'lik 10 mM EDTA, 50 mM NaClO₄ ve %0,1'lik H₃PO₄ karışımı ilave edilip homojenize edildi. Daha sonra üzerine 0,5 mL %5'lik metafosforik asit ilave edilip 20 dakika 8000 g'de 10 dakika +4 °C de sanrifüjlendi ve 0,45 µm filtreden süzüldü. Sistein, GSH ve GSSG analizleri HPLC cihazında analiz edildi. Analiz koşulları; mobil faz: 50 mM NaClO₄ ve %0,1'lik H₃PO₄ karışımı, 4,6x250mm çapına ve 5 mm partikül büyüklüğüne sahip kolon (Agilent), akış hızı 1 mL/dak, kolon sıcaklığı 40 °C, ölçüm dalga boyu 215 nm olarak ayarlandı. Sistein, GSH ve GSSG moleküllerine ait konsantrasyona karşılık gelen pik alanlarının kalibrasyon grafikleri çizilip örnek içindeki miktarlar hesaplandı. Standartlara ve örneğe ait absorbans ve alıkonma zamanları şekil 4.17'de gösterilmiştir [158].

Fitoşelatin analizi Hawrylak ve arkadaşlarının (2014) önerdiği yöntem modifiye edilerek yapıldı. 0,5 g gövde ve kök taze örnekler üzerine 0,1 M HCl ilave edilerek homojenizatörde parçalandı. 14000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Analizden önce örnekler ve standartlar 0,05 M potasyum fosfat tamponu (pH: 7.6) içinde hazırlanan 200 µM 5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile türevlendirildi. Örnekler 0,45 µm filtreden süzüldü. Ters faz RP- C18 kolondan (Agilent) gradient çözelti A (%0,1 Trifloroasetik asit) ve B (%26 Asetonitril) kullanılarak HPLC cihazında analiz yapıldı. Akış: 1 mL/dak, sıcaklık 37 °C olacak şekilde kolon şartları hazırlanıp 405 nm de okuma yapıldı. Standarda ait derişim ve pik alanı kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki PC₂ miktarları nmol-SH/g Taze Ağırlık olarak analizlendi. Standartlara ve örneğe ait absorbans ve alıkonma zamanları şekil 4.18'de gösterilmiştir [159].

3.13. RNA izolasyon, cDNA sentezi ve real-time PCR (RT-PCR) Analizi

RNA İzolasyonu

Buğday gövde ve köklerine ait taze örnekler (0,5 g) 10 mL sıvı azot içeren porselen havanda parçalandı. Mikrosantrifüj tüplerine alınan örneklere 1 mL Tridity G (Applichem, Almanya) eklendi. Tridity G ile oda sıcaklığında 10 dak inkübe edilen örneklere 500 µl kloroform eklenerek 15-20 sn çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra, 200 µl izopropanol eklenen örnekler 15 dak oda sıcaklığında bekletildi. Faz oluşumu gözlenen örnekler +4 °C'de 12000 g'de santrifüjlendi ve 500 µl etanol eklenerek tekrar 12000 g'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA pelletinin üzerindeki etanol atıldıktan sonra geride kalan RNA pelleti 30 µl RNA içermeyen su içinde çözüldü. RNA miktarları spektrofotometrede ölçüldü. A260/A280 oranı 2,0'den büyük olan örnekler PCR çalışması için kullanıldı.

cDNA Sentezi ve real-time PCR (RT-PCR) Analizi

Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" ile Termal Cyler (BIORAD,T100) cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her primer için 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase

inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl RevertAid RT, 9 µl DNAz-RNAz içermeyen su, 1 µl nitrat redüktaz primeri (forward primeri 5'- CTGGGCACAACAGACAAT-3', revers primeri 5'- GAACGATCTCAGAAGAACTCG-3') ve 2 µl cDNA örneği karıştırılarak PCR karışımı hazırlandı. Doksan altı kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna bu karışımdan 20 µl eklendi ve 96 kuyucuklu plaka RT-PCR (Thermo, Pikoreal) cihazına yüklendi. PCR işlemi 95 °C'de 10 dak, 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dak, 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Normalizasyon için Glyceraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Gen ekspresyonunun relatif belirlenmesinde “Delta Ct Kantifikasyon (Δ CT)” metodu kullanıldı.

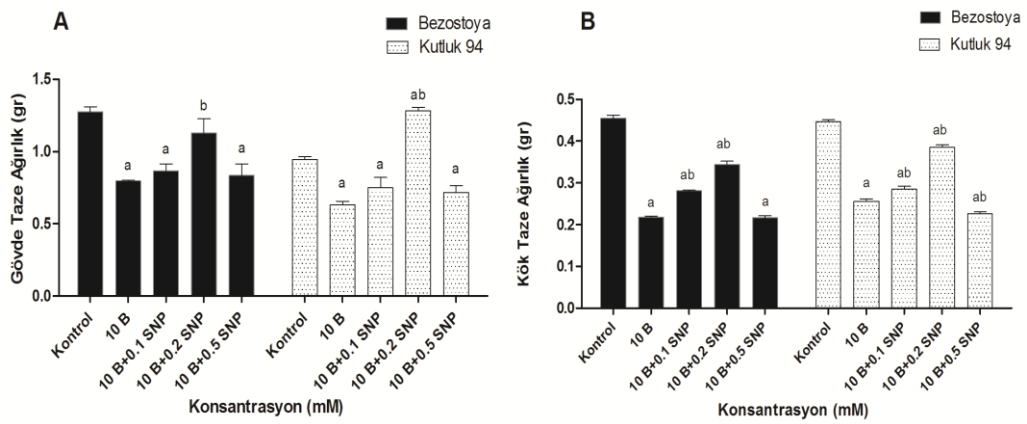
İstatiksel Analiz

Üç ayrı deneyden elde edilen ortalama değerler arasındaki farkın anlamlılığı Two-way varyans analizi (Tukey's multiple comparisons test) (ANOVA) yöntemine göre Graphpad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) programı kullanılarak belirlendi. $p < 0,05$ olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

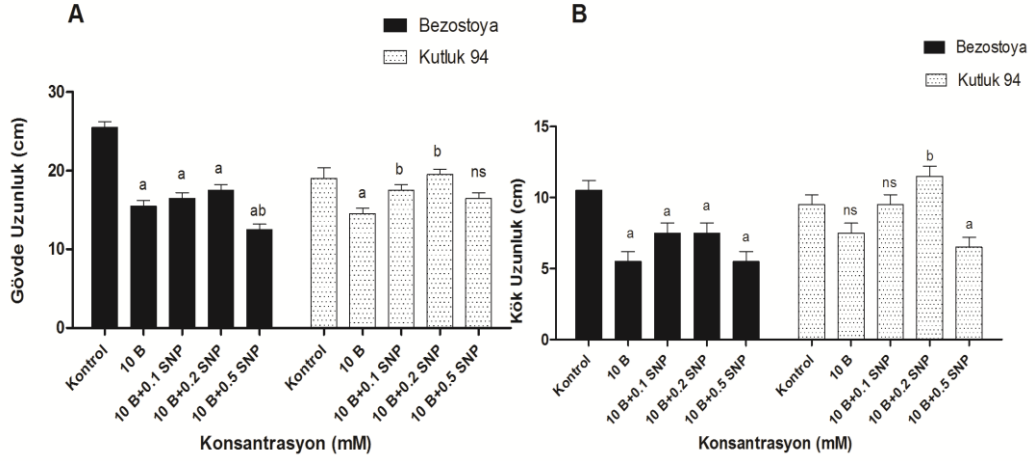
4.1. Büyüme Parametreleri Sonuçları

Elde ettiğimiz bulgulara göre Bezostoya buğday gövdelerinde 10 mM bor derişiminde taze ağırlık miktarında kontrol grubuna göre %37 oranında azalma gözlenirken Kutluk 94 buğday türünde %32 oranında azalma tespit edildi. 10 mM bor derişimine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğdayda sırasıyla %64 ve %103 oranlarında artışların olduğu gözlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.1.A).



Şekil 4.1. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) ağırlık değişimleri. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

Köklerde ise 10 mM bor derişiminde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde kontrol grubuna göre %53 ve %43 oranında azalmalar gözlenmiştir. 10 mM bor derişimine karşı 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğday türünde %61, Kutluk 94 buğday türünde ise %52 oranında bir iyileşme gözlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.2. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) uzunluk değişimleri. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

Buğday gövdelerine 10 mM bor uyguladığımızda Bezostoya ve Kutluk 94 bitkilerinde sırasıyla kontrol gruplarına göre %39 ve %23 oranında gövde uzunluğunda azalmalar elde edildi. 10 mM bor konsantrasyonuna karşı 0,2 mM SNP eklediğimizde ise sırasıyla %12 ve %34 oranında iyileşmelerin olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.2.A).

Köklerde ise Bezostoya buğday türünde kontrol grubuna göre 10 mM bor konsantrasyonunda %47 oranında azalma gözlemlendi. Kutluk 94 buğdayda ise kontrol grubuna göre 10 mM bor stresinde %21 oranında bir azalma elde edildi. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday köklerinde sırasıyla %36 ve %53 oranında iyileşmeler gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.2.B).

Söylemezoğlu ve ark. (2009) iki üzüm türünde bor ve tuz stresini incelemişler ve bor konsantrasyonu arttıkça bitki ağırlığında da azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [128]. Malossiotis ve ark. (2006) apple rootstock bitkisinde 0,5 mM bor

ilavesiyle bitki ağırlığında azalmaların olduğunu belirtmişlerdir [160]. Ayrıca Kaya ve ark. (2015) domates bitkisinde 0,5, 3,5 ve 6,5 mg/L bor uygulamalarında kök ve gövde kuru ağırlıklarında azalmaların olduğunu saptamışlardır [129]. Yusuf ve ark (2011) börülce bitkisine bor stresi uyguladıklarında bitki boyunda ve ağırlığında azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [161]. Bor stresine karşı ilave ettiğimiz 0,2 mM SNP Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde gövde uzunluklarında sırasıyla %12 ve %34 oranında artış meydana getirdi (Şekil 4.2). İlave ettiğimiz 0,2 mM SNP bitkideki aşırı bor birikimini azalttı.

Aşırı bora maruz kalan bitkide bor, yaprak hücrelerinde birikim meydana getirir. Stoplazmaya sızarak stoplazmik metabolizmayı düzensizleştirir ve büyümede yavaşlamaya sebep olur [5]. Bizim sonuçlarımıza göre de 10 mM bor ilavesinde hem Bezostoya hem de Kutluk 94 buğday türlerinde büyümede ve ağırlıklarda azalma gözlemlendi. 10 mM düzeyindeki bor konsantrasyonunun buğday bitkisinde toksik etki yaratıp stoplazmanın yapısında bozulmalara neden olduğunu ve bundan dolayı hücrenin normal işlevlerini yerine getiremediğini söyleyebiliriz. Bu sonuçlardan yola çıkarak, 0,2 mM SNP ilavesiyle, buğdayda borun aşırı alınımının engellendiğini ve toksik olan 10 mM bor düzeyinin bitki tarafından tolere edilebilir duruma gelebileceğini düşünebiliriz. Benzer durum Kaya ve arkadaşlarının (2015) çalışmalarında da gözlenmiştir. Domates bitkisinde farklı konsantrasyonlarda bor stresi uyguladıklarında ilave ettikleri 0,1 mM SNP ile gövde kuru ağırlığı, kök kuru ağırlıkları artış göstermiş, % elektrolitik leakage azalmıştır [129].

Bu sonuçlardan yola çıkarak, 0,2 mM SNP ilavesiyle, buğdayda borun aşırı alınımının engellendiğini ve toksik olan 10 mM bor düzeyinin bitki tarafından tolere edilebilir duruma gelebileceğini düşünebiliriz. Benzer durum Kaya ve arkadaşlarının (2015) çalışmalarında da gözlenmiştir. Domates bitkisinde farklı konsantrasyonlarda bor stresi uyguladıklarında ilave ettikleri 0,1 mM SNP ile gövde kuru ağırlığı, kök kuru ağırlıkları artış göstermiş, % elektrolitik leakage azalmıştır [129].

4.2. Fotosentetik Pigment İçeriği ve % Elektrolitik İletkenlik Sonuçları

Bezostoya buğday türü gövdelerine 10 mM bor ilave edildiğinde klorofil a içeriğinde kontrol grubuna göre %36 oranında azalma olurken; Kutluk 94 buğday türünde bu oran %20 olarak elde edildi. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave edildiğinde toplam klorofil içeriği Bezostoya buğday türünde kontrol grubuna göre %30 oranında artarken, Kutluk 94 buğdayda ise %2,14 oranında artmıştır ($p<0.05$) (Tablo 4.1).

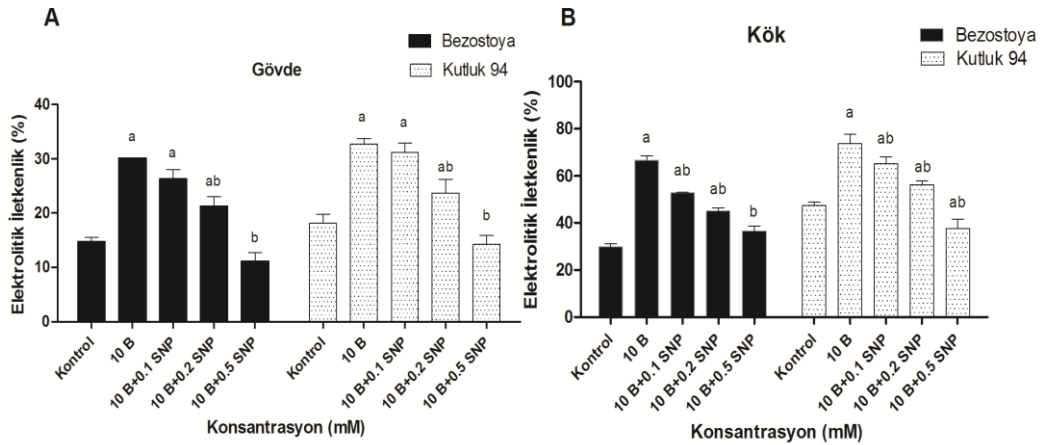
Tablo 4.1. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu fotosentetik pigment içeriği değişimi.

Konsantrasyon (mM)	Klorofil a (mg/g Taze Ağırlık)	Klorofil b (mg/g Taze Ağırlık)	Toplam Klorofil (mg/g Taze Ağırlık)	Toplam Karotenoid (mg/g Taze Ağırlık)
BEZOSTOYA				
Kontrol	3,08±0,08	1,37±0,05	4,45±0,07	0,59±0,005
10 B	1,95±0,02 ^a	0,97±0,02 ^a	2,92±0,05 ^a	0,25±0,003
10 B+0,1 SNP	2,20±0,03 ^{ab}	0,71±0,03 ^a	2,91±0,03 ^{ab}	0,44±0,006 ^a
10 B+0,2 SNP	2,73±0,02 ^{ab}	1,07±0,06 ^{ab}	3,80±0,05 ^{ab}	0,56±0,005 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	2,26±0,05 ^{ab}	1,46±0,04 ^{ab}	3,72±0,04 ^{ab}	0,39±0,007 ^{ab}
KUTLUK 94				
Kontrol	3,78±0,06	1,47±0,04	5,25±0,02	0,66±0,008
10 B	3,00±0,04 ^a	1,19±0,03 ^a	4,19±0,05 ^a	0,64±0,004 ^a
10 B+0,1 SNP	3,08±0,04 ^{ab}	1,21±0,05 ^{ab}	4,29±0,05 ^a	0,62±0,007 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	3,08±0,02 ^{ab}	1,20±0,08 ^{ab}	4,28±0,06 ^{ab}	0,51±0,006 ^b
10 B+0,5 SNP	2,81±0,07 ^{ab}	1,11±0,06 ^{ab}	3,92±0,04 ^{ab}	0,51±0,003 ^{ab}

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

Bor ve Al'un fazla miktardaki konsantrasyonlarının klorofil ve kloroplast membranlarının oksidasyonunu arttırdığı ve böylece klorofil miktarında azalmalara sebep olabileceği son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [162, 163]. Ortama 0,1 ve 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde fotosentetik pigment içeriklerinde artışların olduğu gözlenmiştir. Benzer bir sonuç olarak; klorofil azalmasını engellemek amacıyla ortama NO ilave edilebileceği Wang ve Yang, (2005), Hu ve ark. (2007) tarafından rapor edilmiştir [164, 165].

Bor stresi altında bitkilerin kloroplast yapılarında reaktif oksijen türleri birikimi artmaktadır. Artan bu reaktif oksijen türleri kloroplastların membran yapısında bozulmalara neden olur ve böylece klorofil sentezinden sorumlu proteinlerin ve enzimlerin inhibisyonu gerçekleşir. PS II kompleks proteinindeki dengesizlik sonucu hasar gören fotosentetik yapılarda hem klorofil a, hem klorofil b ve toplam klorofil sentezinde azalmalar gerçekleşir [146]. Deney sonuçlarımızdan elde edilen sonuçlara göre bor stresi ortamına eklenen 0,1 ve 0,2 mM SNP ile borun sebep olduğu oksidatif stresin zararları azaltılmıştır (Tablo 4.1).

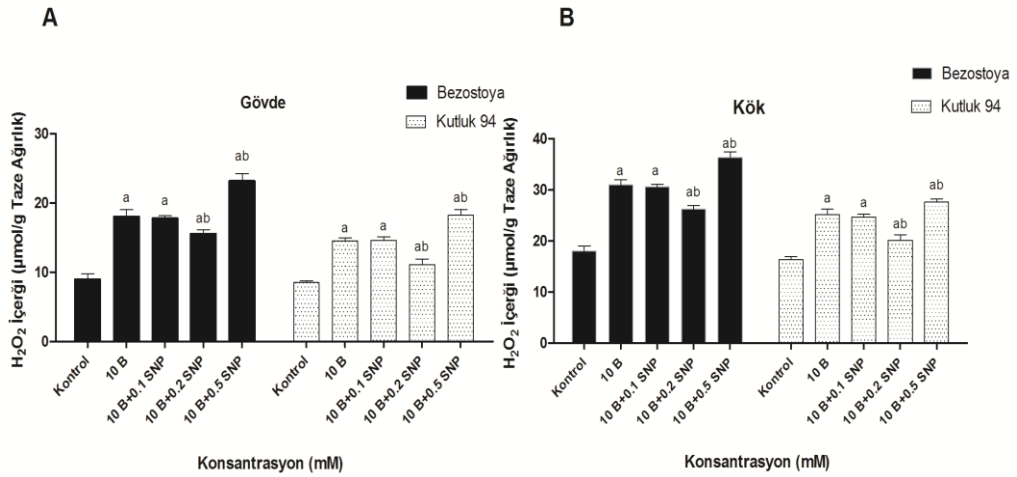


Şekil 4.3. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Elektrolitik İletkenlik değişimleri. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Bezostoya buğday türü gövdelerinde % elektrolitik iletkenlik değerinde 10 mM bor konsantrasyonunda kontrol grubuna göre %104,73 oranında bir artış gözlenirken Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde kontrol grubuna göre %80,01 oranında bir artış gözlendi (Şekil 4.3.A). 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğday türünde %29,29, Kutluk 94 buğday türünde ise %33,54 oranında bir azalma elde edildi. Köklerde ise her iki buğday türünde de 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğdayda sırasıyla %32,32 ve %29,88 oranında azalmanın olduğu gözlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.3.B).

4.3. H₂O₂, Prolin ve MDA İçeriği Sonuçları

Bezostoya buğday gövdelerinde H₂O₂ (hidrojen peroksit) içeriğinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre %102 oranında artış elde edildi. Kutluk 94 buğdayda ise bu artış %70 olarak bulundu.

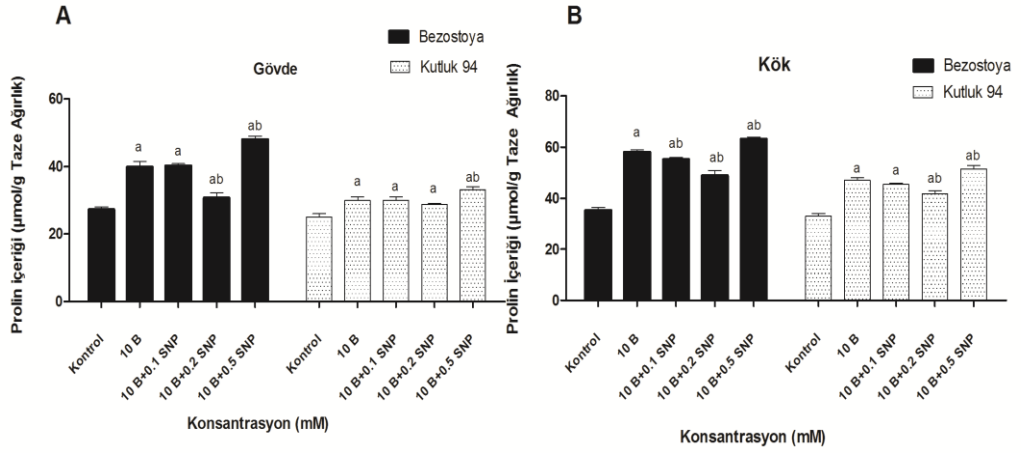


Şekil 4.4. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Hidrojen Peroksit İçeriği. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

On mM bor derişimine 0,2 mM SNP ilave edildiğinde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %13 ve %23 oranında azalmalar elde edildi. 0,5 mM SNP bitkide bor stresine ilave olarak stresi daha da arttırmıştır. 10 mM bor stresine

0,5 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğdayda %28, Kutluk 94 buğdayda ise %25 oranında H₂O₂ içeriğinde artışlar elde edildi (p<0.05) (Şekil 4.4.A).

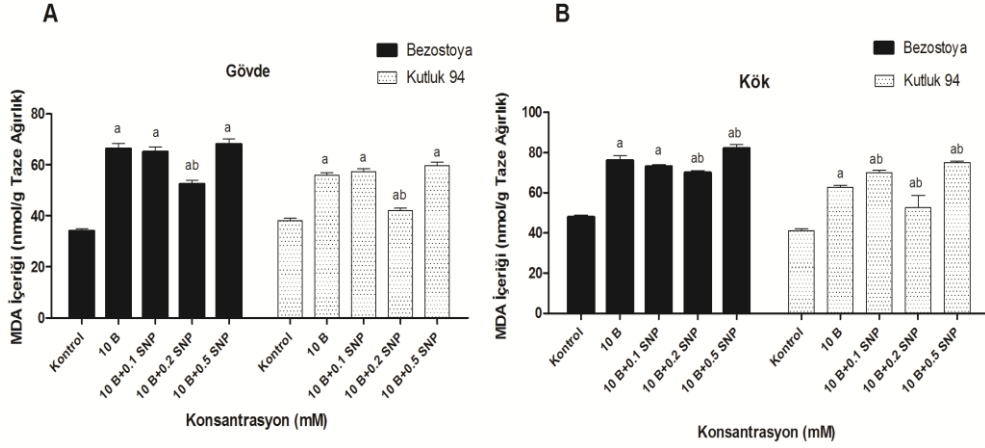
Köklerde ise 10 mM bor stresinde kontrol grubuna Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %72 ve %53 oranında artışlar elde edildi. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 türlerinde sırasıyla %15 ve %19 oranında azalmalar olduğu tespit edildi. 10 mM bor stresine 0,5 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %17 ve %9 oranında artışlar görüldü (p<0.05) (Şekil 4.4.B).



Şekil 4.5. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Prolin İçeriği. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

Bezostoya buğday gövdelerinde 10 mM bor uygulamalarında prolin değişiminde kontrol grubuna göre %46 oranında bir artışın olduğu bulundu. Kutluk 94 buğday da ise bu artış %20'dir. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğdayda %23, Kutluk 94 buğdayda ise %4 oranında bir azalma elde edildi (p<0.05) (Şekil 4.5.A).

Köklerde prolin miktarında Bezostoya buğday da 10 mM bor uygulandığında kontrol grubuna göre %64 oranında artış gözlemlendi. Kutluk 94 buğdayda ise 10 mM bor konsantrasyonundaki artış ise kontrole göre %42'dir. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %15 ve %11 oranında azalmalar elde edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.6. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) MDA içeriği. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Yaptığımız deneylerde elde edilen sonuçlara göre Bezostoya buğday türünün gövdelerinde MDA içeriği 10 mM bor stresine birlikte %94 oranında artarken Kutluk 94 türünde %47 oranında artış elde edildi. 10 mM bor stresine 0,1 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde anlamlı değişimler elde edilmezken 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya türünde %21, Kutluk 94 türünde ise %25 oranında bir iyileşme olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.6.A).

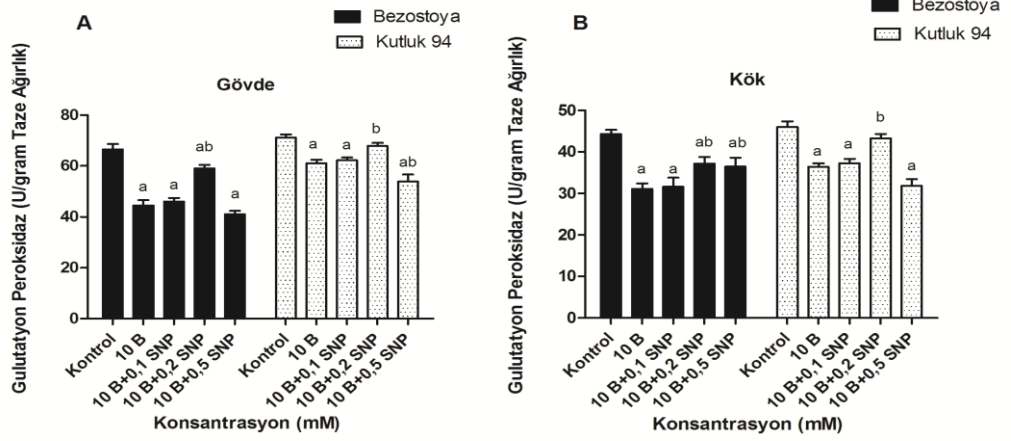
Köklerde MDA içeriğinde Bezostoya türünde 10 mM bor derişiminde kontrol grubuna göre %58 oranında artış olurken Kutluk 94 türünde ise %51 oranında artış olmuştur. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya ve Kutluk 94 türlerinde sırasıyla %7 ve %16 oranında iyileşmeler elde edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.6.B).

Esim ve Atıcı (2013) mısır bitkisine 2 ve 4 mM bor ilave ettiklerinde oksidatif davranışlarda değişim gözlenmiş, MDA ve hidrojen peroksit miktarlarında artışlar bulmuşlardır [166]. Jabeen ve Ahmad (2011) aşırı bor ilave ettikleri buğday bitkisinde verimde azalma, H₂O₂ ve MDA içeriklerinde artış gözlemlemiştir [167]. Bitkiler biyotik ve abiyotik strese maruz kaldıklarında yapılarında, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin arttığı gözlenir. Mittler (2012) membran hasarının aşırı seviyelerdeki hidrojen peroksitten kaynaklandığını belirtmiştir [168]. Hidrojen peroksit içeriğinin artması ile bitkinin hücre membranı yapısında lipid peroksidasyonu meydana gelir. MDA ise lipid peroksidasyonu ürünüdür. Bu çalışmada, bor stresiyle birlikte artan MDA, prolin ve H₂O₂ düzeylerinde eklediğimiz SNP ile kısmen bir iyileşme olmuştur. Aşırı bor bulunan ortama ilave ettiğimiz 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP uygulamalarıyla birlikte optimum miktar 0,2 mM SNP olarak gözlenmiştir.

Bitkilerdeki optimum H₂O₂ ve MDA seviyesi membran stabilitesi için önemlidir. Fakat bu moleküller stres durumlarında artar [169, 170]. Zhang ve arkadaşları tarafından (2014) yapılan çalışmada, NO'nun kireçli topraklarda yetişen bitkilere uygulanması sonucu MDA akümülesyonunu engellediği rapor edilmiştir [171]. Ayrıca Lin ve arkadaşları (2012) salatalık bitkisinde, NO'nun tuz stresinde H₂O₂ seviyesini azalttığını belirtmişlerdir [172]. NO biyoaktif haberci bir moleküldür ve bitki dokularını ağır metal içeren biyotik ve abiyotik stres çeşitlerine karşı korur [173]. NO oksidatif stres sırasında antioksidan aktivite gösterir ve ROS üretimini baskılar [174]. Aslında bitki dokularına dışarıdan ilave edilen NO, bakır ve alüminyum toksisitesine karşı koruma görevi de yapar [175, 164]. NO bitki dokularındaki iyon leakajı engeller ve lipid peroksidasyonundan kaynaklanan membran hasarlarına karşı bitkileri korur [172]. Bu çalışmaların çoğu stres durumunda NO in kullanılabilirliğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalar ROS'un atılımı konusunda bilgiler vererek NO'nun koruyucu bir etkisi olduğunu da göstermektedir.

4.4. Enzim Aktivite Sonuçları

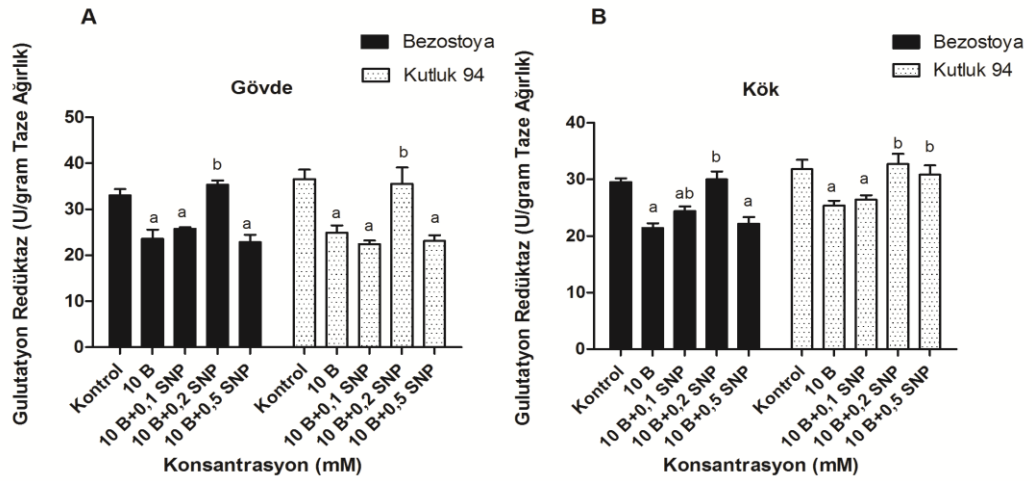
Glutasyon Peroksidaz (GPX), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon -S-Transferaz (GST) ve Nitrat Redüktaz (NR) enzimlerinin aktiviteleri tayin edilmiştir. Sonuçlar aşağıdadır.



Şekil 4.7. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde 10 mM bor konsantrasyonu ile birlikte kontrol gruplarına göre sırasıyla %33 ve %14 oranında azalmıştır. 0,1 mM SNP ilave ettiğimizde sırasıyla %3 ve %1 oranında artışlar elde edilmiştir. Fakat enzim aktivitesindeki en iyi artışa sebep olan konsantrasyon 0,2 mM SNP konsantrasyonu olup bu artışlar sırasıyla %32 ve %9,8'dir. 0,5 mM SNP konsantrasyonu 10 mM bor stresinde Bezostoya ve Kutluk 94 bitkisi gövdelerinde pozitif bir etki göstermemiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.7.A).

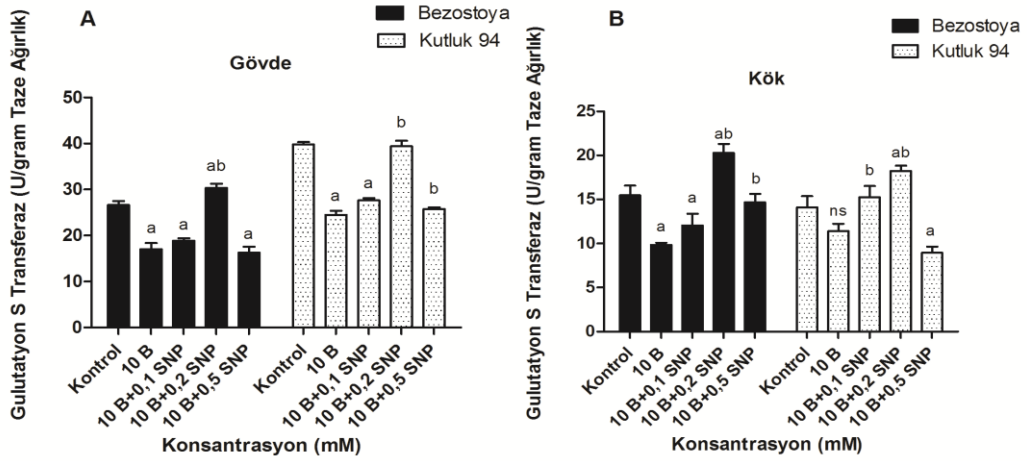
Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 köklerinde ise 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre sırasıyla %29 ve %21 oranında azalmaya neden olmuştur. 0,2 mM SNP ilavesiyle enzim aktivitesinde her iki buğday türünde de %19 oranında artış elde edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.7.B).



Şekil 4.8. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutasyon Redüktaz Aktivitesi. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Glutasyon Redüktaz aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde 10 mM bor stresiyle birlikte kontrol gruplarına göre sırasıyla %28 ve %31 oranında azalmaya neden olmuştur. 10 mM bor stresinin etkilerini azaltmak amacıyla ilave edilen 0,2 mM SNP bu enzimin aktivitesini Bezostoya ve Kutluk 94 buğday bitkilerinde sırasıyla, %50 ve %43 oranında arttırmıştır. İlave edilen 0,5 mM SNP, 10 mM bor konsantrasyonunda pozitif bir etki göstermemiş ve enzimin aktivitesinde herhangi bir artışa sebep olmamıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.8.A).

Köklerde ise Glutasyon Redüktaz aktivitesi, 10 mM bor stresiyle birlikte Bezostoya ve Kutluk 94 türlerinde sırasıyla kontrol grubuna göre %27 ve %20 oranında azalmıştır. Bezostoya türüne ilave edilen 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP konsantrasyonlarında enzim aktivite değişimi sırasıyla %14, %40 ve %3 şeklinde artmıştır. Kutluk 94 türünde ise bu oranlar %4, %28 ve %21'dir. Bu sonuçlardan göre 10 mM bor stresine en iyi cevap 0,2 mM SNP konsantrasyonudur ($p < 0.05$) (Şekil 4.8.B).



Şekil 4.9. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Glutatyon S Transferaz Aktivitesi. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi değişimlerinde ise Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde 10 mM bor konsantrasyonunda, kontrol grubuna göre sırasıyla %35 ve %38 oranında azalmalar gözlenmiştir. Bor stresine en iyi cevabı oluşturan SNP konsantrasyonu 0,2 mM bulunup bu değer Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövdelerinde sırasıyla %77 ve %59 oranında enzim aktivitesini arttırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.9.A).

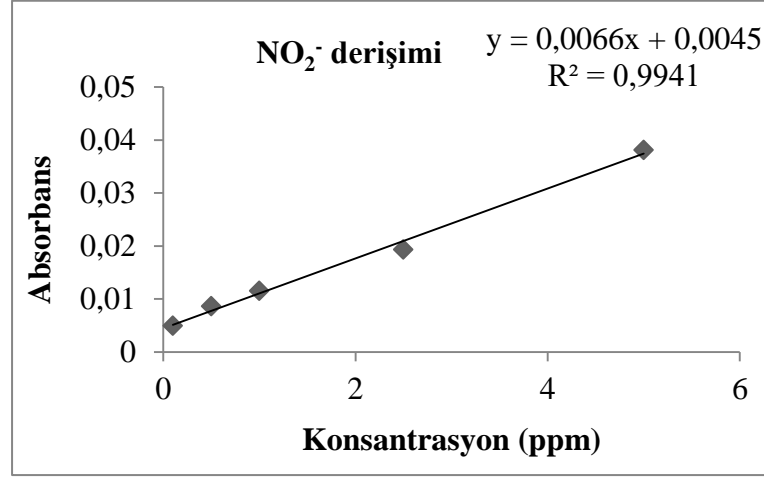
GST enzim aktivitesi köklerde; Bezostoya buğday türünde 10 mM bor stresiyile kontrol grubuna göre %36 oranında azalırken, Kutluk 94 türünde ise bu azalma %19 olarak gözlenmiştir. Bor stresine karşı ilave ettiğimiz 0,2 mM SNP ise Bezostoya buğday türünde %106, Kutluk 94 türünde %59 oranında enzim aktivitesini arttırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.9.B).

Antioksidan enzim olan Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon S Transferaz enzim aktiviteleri 10 mM bor stresiyle birlikte her iki buğday türünün gövde ve köklerinde kontrol gruplarına göre azalma göstermiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9). Sonuçlara göre bitkide stres durumunun oluşması ile birlikte bu enzimlerde azalma gözlenmiştir. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak Esfandiari ve ark. (2007) buğdayın iki türünde uyguladıkları tuz stresinde GR enzim aktivitelerinde azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir. Artan NaCl oranı ile birlikte ters orantılı bir şekilde GR enzim aktivitesi de azalma göstermiştir [176].

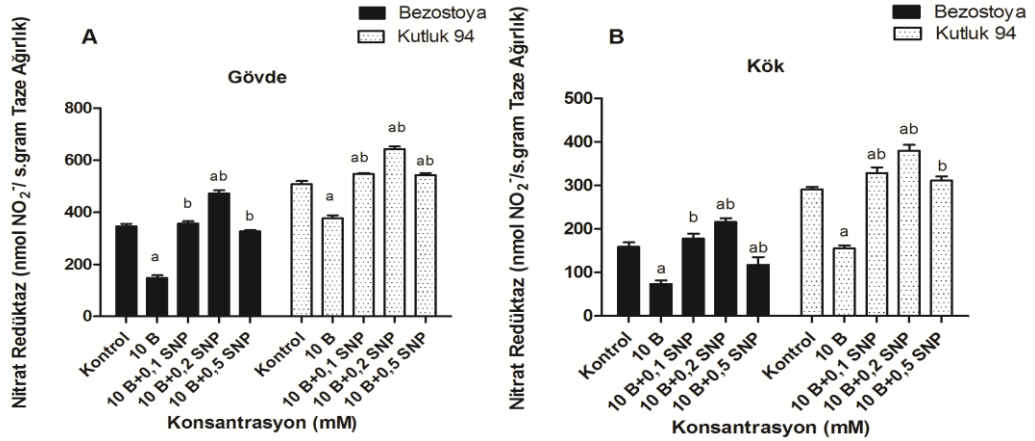
GR, glutasyon-askorbat döngüsünde görev yapar ve GSSG'yi GSH'a indirir. Ayrıca GSSG/GSH oranını da düzenler böylece Glutasyon Peroksidaz için ortama GSH salınımını yapar [177, 178]. Nepovim ve arkadaşları yaban turpu bitkisi köklerine 0,1 ve 0,5 mM konsantrasyonlarında Cd, Cu ve Ni uyguladıklarında GST aktivitesinde kontrol grubuna göre azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [179]. Saleh ve ark. (2009) tere bitkisine 150 mM NaCl stresi uyguladıklarında GR aktivitesinin inhibe olduğunu göstermişlerdir [180]. Ayrıca Oufdou ve ark. (2014) bakla bitkisine 75 mM ve 150 mM NaCl stresi uyguladıklarında Glutasyon Peoksidaz ve Glutasyon S Transferaz enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [181].

Bor stresine karşı ortama eksojen olarak ilave ettiğimiz SNP, enzim aktivitelerinin artmasında etkili olmuştur. Elde ettiğimiz bulgulara göre bor stresli ortama SNP ilave ettiğimizde; 0,1 mM SNP miktarının anlamlı değişimler yaratmadığı, 0,5 mM SNP miktarının ise toksik etki yarattığı gözlenmiştir. Fakat ortama ilave edilen 0,2 mM SNP'nin enzim aktivitelerini olumlu yönde arttırdığı deneylerimiz sonucunda elde edilmiştir. Liu ve ark. (2015) aküçgül bitkisine Cd stresi uyguladıklarında GR aktivitesinde azalma olduğunu ve daha sonra bu strese karşı ortama 50 µM SNP ilave ettiklerinde GR aktivitesinde tekrar artışların olduğunu gözlemlemişlerdir [182]. Birçok çalışmada NO'nun, ROS sönmüleyici enzim aktivitelerini indüklediği ve böylece oksidatif stresin etkilerini hafiflettiği bulunmuştur [183-185].

Nitrat Redüktaz aktivitesi, 540 nm de KNO₂ çözeltisinden hazırlanan NO₂⁻ standartlarının kalibrasyon grafiğine göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. NO₂⁻ kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.11. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Nitrat Redüktaz Aktivitesi. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0,05$, analiz sayısı (n):3)

Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövdelerinde 10 mM bor stresinde Nitrat Redüktaz enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %57,43 ve %25,76 oranında azalmaların olduğu gözlenmiştir. 10 mM bor konsantrasyonunna 0,1 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğday türünde %141,69 oranında enzim aktivite

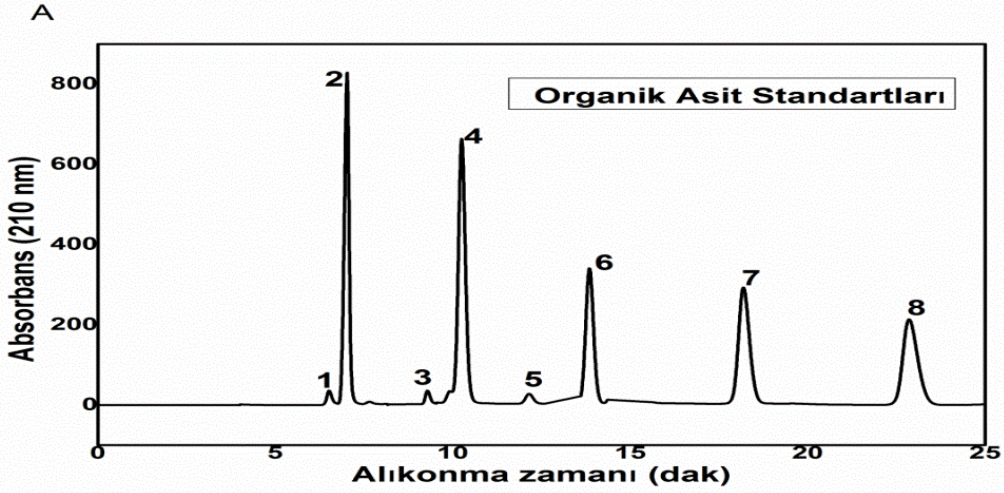
artışı tespit edilirken Kutluk 94 türünde %44,90 oranında bir artış gözlenmiştir. Ayrıca 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde ise enzim aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde sırasıyla %220,67 ve %70,33 oranında artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.11.A).

NR enzim aktivitesi köklerde; Bezostoya buğday türünde 10 mM bor stresiyle kontrol grubuna göre %53 oranında azalırken, Kutluk 94 türünde ise bu azalma %46 olarak gözlenmiştir. Bor stresine karşı ilave ettiğimiz 0,2 mM SNP ise Bezostoya buğday türünde %193, Kutluk 94 türünde %144 oranında enzim aktivitesini arttırmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.11.B).

Nitrat Redüktaz (NR) antioksidan bir enzim değildir fakat NO metabolizması ile yakından ilişkilidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre NR aktivitesi Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinin her ikisinde kök ve gövde de bor stresiyle birlikte azalma göstermiştir (Şekil 4.11). Bor stresi NR enziminin inhibe olmasına sebep olmuştur. Bor stresli ortama ilave edilen 0,2 mM SNP, NR aktivitesini kısmen artırmıştır. Fakat 0,5 mM SNP enzim aktivitesini arttırmamış hatta Bezostoya buğday türü köklerinde kontrol grubunun altına düşmesine sebep olmuştur. Khan ve ark. (2012) hardal bitkisine 0,2 mM SNP uyguladıklarında kontrol grubuna göre NR aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 150 mM NaCl uygulamasında NR aktivitesinin düştüğünü ve NaCl stresli ortama 0,2 mM SNP ilave ettiklerinde yine NR aktivitesinde artış gözlediklerini rapor etmişlerdir [186]. Sonuçlarımıza paralel olarak Aftab ve ark. (2012) tatlı pelin bitkisine 1 mmol bor uyguladıklarında NR aktivitesinde kontrol grubuna göre azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca 1 mmol bor miktarına ilave ettikleri 2 mmol SNP, NR aktivitesinde tekrar artışa sebep olmuştur [146].

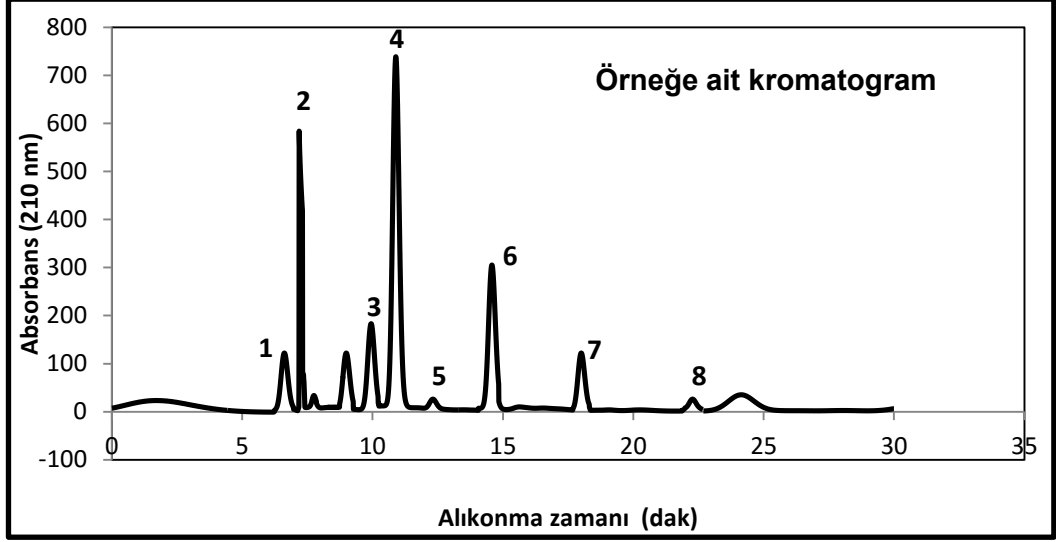
4.5. Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit (LMWOA) Sonuçları

Düşük molekül ağırlıklı organik asitler (benzoik asit, oksalik asit, malik asit, malonik asit, süksinik asit, formik asit, propiyonik asit, bütirik asit) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir.



Şekil 4.12. HPLC analizinde organik asit standartlarına ait piklerin absorbans değerleri ve alıkonma zamanları.

[1:Benzoik asit (6.63 dak), 2:Oksalik asit (7.19 dak), 3:Malik asit (9.94 dak), 4:Malonik asit (10.89 dak) 5:Süksinik asit (12.16 dak), 6:Formik asit (14.57 dak), 7:Propiyonik asit (18.00 dak), 8:Bütirik asit (22.27 dak)]



Şekil 4.13. Kutluk 94 buğday türü gövdesinde 10 B+0,2 SNP örneğine ait organik asit piklerinin absorbans değerleri ve alıkonma zamanları.

[1:Benzoik asit (6.63 dak), 2:Oksalik asit (7.19 dak), 3:Malik asit (9.94 dak), 4:Malonik asit (10.89 dak) 5:Süksinik asit (12.16 dak), 6:Formik asit (14.57 dak), 7:Propiyonik asit (18.00 dak), 8:Bütirik asit (22.27 dak)]

Tablo 4.2. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit içeriği değişimi.

Gövde Konsantrasyon (mM)	Benzoik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)	Oksalik Asit ($\mu\text{g/gTazeAğırlık}$)	Malik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)	Malonik Asit ($\mu\text{g/gTazeAğırlık}$)	Süksinik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)	Formik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)	Propiyonik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)	Bütirik Asit ($\mu\text{g/gTaze Ağırlık}$)
Bezostoya								
Kontrol	259,50 \pm 5	114,60 \pm 3	1285,80 \pm 5	1580,80 \pm 4	1372,60 \pm 8	26,86 \pm 0,2	17,00 \pm 0,1	5,39 \pm 0,03
10 B	129,65 \pm 3 ^a	67,80 \pm 8 ^a	811,70 \pm 6 ^a	626,40 \pm 3 ^a	1006,30 \pm 5 ^a	19,26 \pm 0,1 ^a	10,30 \pm 0,2 ^a	3,56 \pm 0,02 ^a
10 B+0,1 SNP	248,20 \pm 5 ^{ab}	99,00 \pm 7 ^{ab}	1133,10 \pm 4 ^{ab}	1122,90 \pm 3 ^{ab}	1538,30 \pm 6 ^{ab}	28,87 \pm 0,1 ^{ab}	10,40 \pm 0,2 ^a	5,87 \pm 0,04 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	283,00 \pm 5 ^{ab}	129,20 \pm 5 ^{ab}	1156,80 \pm 7 ^{ab}	1148,20 \pm 5 ^{ab}	1845,90 \pm 7 ^{ab}	30,44 \pm 0,1 ^{ab}	14,00 \pm 1,1 ^{ab}	8,47 \pm 0,05 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	88,30 \pm 5 ^{ab}	80,60 \pm 2 ^{ab}	1080,20 \pm 4 ^{ab}	1188,90 \pm 4 ^{ab}	1200,30 \pm 4 ^{ab}	27,43 \pm 0,3 ^{ab}	11,20 \pm 0,3 ^{ab}	3,87 \pm 0,03 ^{ab}
Kutluk 94								
Kontrol	435,20 \pm 8	243,20 \pm 4	1050,40 \pm 4	1287,90 \pm 6	3029,40 \pm 5	56,95 \pm 0,5	17,90 \pm 0,2	4,48 \pm 0,04
10 B	348,30 \pm 7 ^a	186,30 \pm 9 ^a	875,10 \pm 2 ^a	983,30 \pm 3 ^a	2138,80 \pm 4 ^a	41,22 \pm 0,4 ^a	12,00 \pm 0,4 ^a	3,40 \pm 0,02 ^a
10 B+0,1 SNP	378,10 \pm 6 ^{ab}	202,40 \pm 3 ^{ab}	1171,80 \pm 6 ^{ab}	999,40 \pm 5 ^{ab}	2716,40 \pm 6 ^{ab}	65,97 \pm 0,2 ^{ab}	14,90 \pm 0,4 ^{ab}	3,62 \pm 0,03 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	451,70 \pm 6 ^{ab}	260,50 \pm 1 ^{ab}	1351,70 \pm 5 ^{ab}	1194,00 \pm 7 ^{ab}	2830,40 \pm 5 ^{ab}	74,11 \pm 0,4 ^{ab}	16,60 \pm 0,3 ^{ab}	4,38 \pm 0,04 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	312,40 \pm 5 ^{ab}	127,90 \pm 6 ^{ab}	981,10 \pm 1 ^{ab}	957,90 \pm 4 ^{ab}	2596,00 \pm 4 ^{ab}	50,87 \pm 0,3 ^{ab}	5,42 \pm 0,05 ^{ab}	2,99 \pm 0,01 ^{ab}

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Tablo 4.3. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü köklerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Düşük Molekül Ağırlıklı Organik Asit içeriği değişimi.

Kök Konsantrasyon (mM)	Benzoik Asit (µg/gTaze Ağırlık)	Oksalik Asit (µg/gTaze Ağırlık)	Malik Asit (µg/gTazeAğırlık)	Malonik Asit (µg/gTaze Ağırlık)	Süksinik Asit (µg/gTaze Ağırlık)	Formik Asit (µg/gTazeAğırlık)	Propiyonik Asit (µg/gTazeAğırlık)	Bütirik Asit (µg/gTaze Ağırlık)
Bezostoya								
Kontrol	117,10±6	74,90±3	1963,70±5	1172,80±6	1010,90±3	99,90±3	48,00±0,3	40,40±0,3
10 B	67,00±9 ^a	43,10±7 ^a	1049,90±3 ^a	728,00±4 ^a	606,80±2	59,70±0,3 ^a	25,90 ±0,2 ^a	28,00±0,2 ^a
10 B+0,1 SNP	89,40±7 ^{ab}	94,20±2 ^{ab}	1716,20±2 ^{ab}	1112,30±8 ^{ab}	1450,20±5 ^{ab}	61,30±0,4 ^{ab}	39,90±0,3 ^{ab}	59,80±0,5 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	90,64±5 ^{ab}	116,00±4 ^{ab}	2196,70±7 ^{ab}	1220,90±6 ^{ab}	1603,70±2 ^{ab}	122,30±0,7 ^{ab}	58,50±0,4 ^{ab}	73,20±0,6 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	40,30±2 ^{ab}	62,90±7 ^{ab}	1018,13±4 ^{ab}	749,45 ±3 ^{ab}	1452,60±4 ^{ab}	69,10±0,5 ^{ab}	30,60±0,3 ^{ab}	32,30±0,2 ^{ab}
Kutluk 94								
Kontrol	415,70±7	53,00±5	1563,50±5	1483,10±4	1100,70±3	93,00±4	59,90±0,5	52,02±0,1
10 B	268,10±4 ^a	34,90±3 ^a	1086,70±5 ^a	962,60±3 ^a	760,50±3 ^a	66,50±2 ^a	39,50±0,3 ^a	39,96±0,1 ^a
10 B+0,1 SNP	408,70±3 ^{ab}	73,90±8 ^{ab}	1216,80±5 ^{ab}	1149,90±6 ^{ab}	849,89±2 ^{ab}	98,40±3 ^{ab}	29,50±0,4 ^{ab}	41,16±0,2 ^a
10 B+0,2 SNP	403,40±4 ^{ab}	93,10±4 ^{ab}	1704,00±5 ^{ab}	1551,60±4 ^{ab}	1504,50±7 ^{ab}	101,90±6 ^{ab}	50,90±0,7 ^{ab}	46,62±0,1 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	357,00±5 ^{ab}	68,50±4 ^{ab}	1086,80±5 ^{ab}	1274,90±5 ^{ab}	509,30±1 ^{ab}	81,30±5 ^{ab}	23,80±0,3 ^{ab}	32,82±0,2 ^{ab}

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

Bezostoya gövdelerinde 10 mM bor uyguladığımızda kontrol gurubuna göre benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %49, %36, %60, %26, %40, %28, %39 ve %33 oranında azalmalar elde edilmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde sırasıyla %118, %42, %83, %52, %90, %36, %26, %137 oranında artışlar elde edilmiştir (Tablo 4.2). Köklerde ise 10 mM bor uyguladığımızda kontrol gurubuna göre benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %42, %46, %37 %39, %42, %40 ve %46, %30 oranında azalmalar elde edilmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde sırasıyla %35, %63 %67 %164, %169, %104 %125 %161 oranında artışlar elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

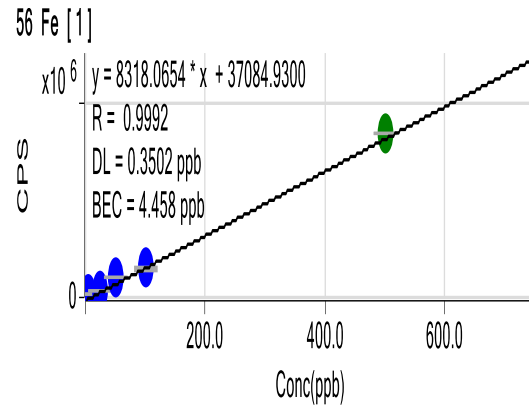
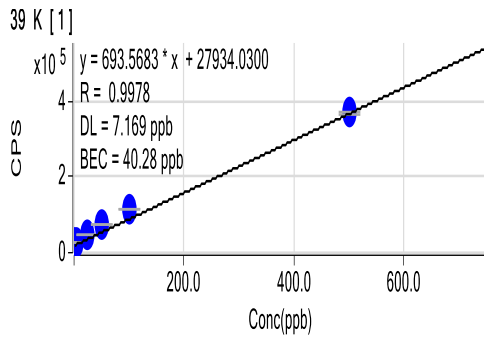
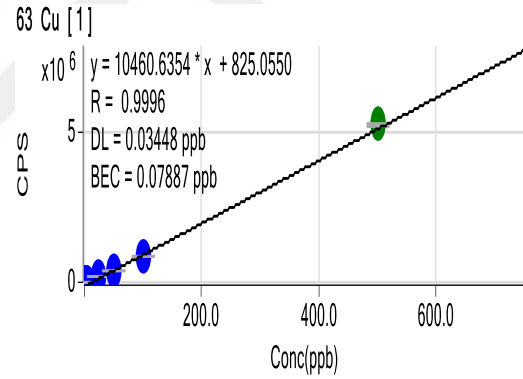
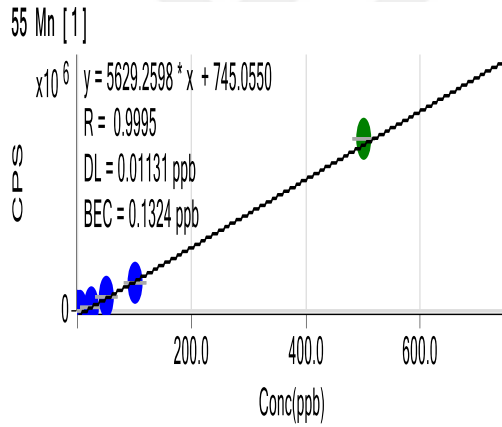
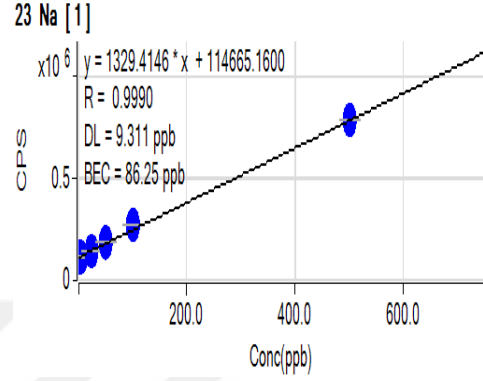
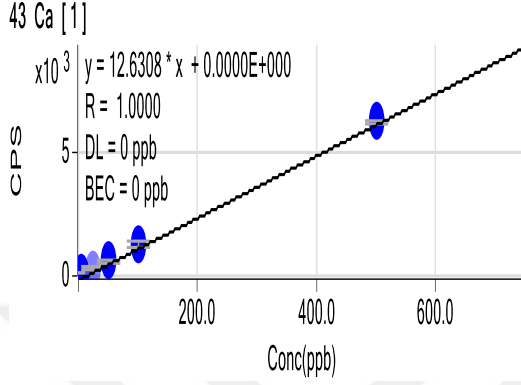
Kutluk 94 gövdelerinde 10 mM bor uyguladığımızda kontrol gurubuna göre benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %19, %16, %23 %29, %23 %27, %32 ve %24 oranında azalmalar elde edilmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %22, %54, %21, %32, %39, %79, %38, %29 oranında artışlar elde edilmiştir (Tablo 4.2). Kutluk 94 köklerinde ise 10 mM bor uyguladığımızda kontrol gurubuna göre benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %35, %30, %33 %30, %34 %28, %34 ve %23 oranında azalmalar elde edilmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %50, %56, %61, %97, %166, %53, %28, %16 oranında artışlar elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.3). Bor stresine karşı ilave ettiğimiz SNP konsantrasyonlarında 0,1 mM'da düşük molekülle organik asit bileşiminde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. 0,2 mM SNP'de ise Bezostoya buğday türü gövdelerinde süksinik ve bütirik asit içeriklerinde oldukça belirgin artışlar elde edilmiştir.

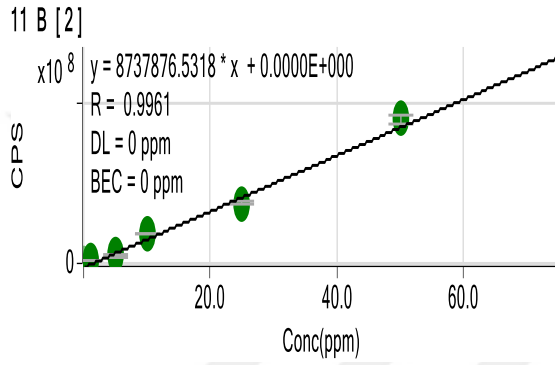
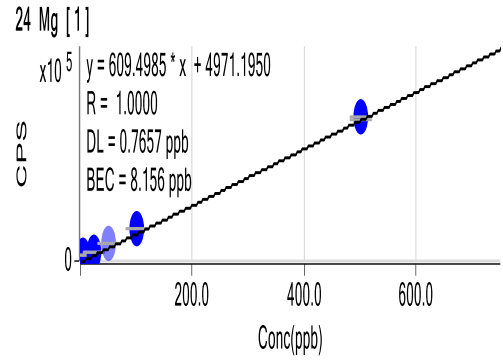
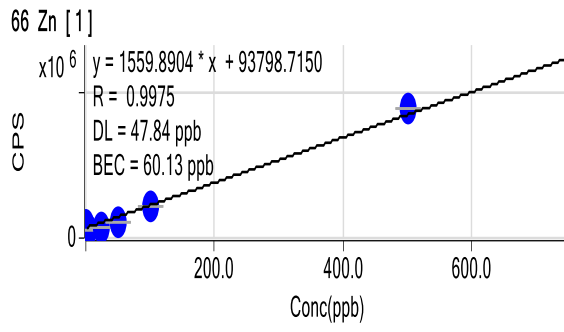
Bizim sonuçlarımıza paralel olarak Chen ve ark. (2009) yalancı iğde bitkisinde yaptıkları alkali stresinde, malik, sitrik, oksalik ve fumarik asit içeriklerinde kontrol gruplarına göre azalmaların olduğunu göstermişlerdir [187]. Tatar ve ark. (1999) salatalık bitkisine kurşun, nikel ve vanadyum stresleri uyguladıklarında sitrik, malik ve fumarik asit içeriklerinde farklı dozlarda azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [188]. Ksilem sıvısı içindeki organik asit bileşimi, incelenen bitki türüne bağlıdır. Çeşitli bitkilerin ksilem sıvısı içinde mevcut baskın organik asitler (örneğin, domates, soya fasulyesi, kayın, vb.) malik, sitrik, süksinik ve fumarik gibi Krebs döngüsü ara maddeleridir [189-191].

Düşük molekül ağırlıklı organik asit araştırmaları üzerine birçok tarla denemeleri yapılmıştır. Kök yapısı, toprak yapısı, toprak organik bileşimi, pH, nem ve mikrobiyal aktivite gibi faktörler, bulunulan bölgeye göre farklılık gösterebilir ve bu farklılıklar düşük molekül organik asit miktarında değişmelere ve modifikasyonlara neden olur [192-194]. Düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin, eser elementlerin kompleks ajanları gibi davrandığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [195]. Deney sonuçlarımıza göre köklerde malik, formik, benzoik, ve oksalik miktarlarında belirli düzeylerde azalma gözlenmiştir. Bunun sebebi çalışmamızda ortama ilave edilen 10 mM borun köklerden alınmasıyla birlikte ortamda bulunan özellikle malik, formik, benzoik ve oksalik asitlerin kompleks oluşturma durumu olabilir.

4.6. Metal İÇeriği SonuÇları

K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B analizleri ICP-MS cihazı ile gerÇekleştirdi. Metal analizine ait kalibrasyon grafikleri ve sonuÇları aşağıdadır.





Şekil 4.14. ICP-MS cihazında K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B metallerinin kalibrasyon grafikleri

Tablo 4.4. Bezostoya buğday türünde Bor ve SNP uygulaması sonucu K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B içeriğindeki değişimler.

BEZOSTOYA									
Konsantrasyon (mM)	K (mg/g Kuru Ağırlık)	Cu (mg/g Kuru Ağırlık)	Na (mg/g Kuru Ağırlık)	Ca (mg/g Kuru Ağırlık)	Mg (mg/g Kuru Ağırlık)	Mn (mg/g Kuru Ağırlık)	Fe (mg/g Kuru Ağırlık)	Zn (mg/g Kuru Ağırlık)	B (mg/g Kuru Ağırlık)
GÖVDE									
Kontrol	6,009±0,01	0,287±0,001	2,042±0,011	3,682±0,011	6,690±0,01	0,827±0,001	1,265±0,004	0,452±7.10 ⁻⁴	0,121±0,002
10 B	4,480±0,02 ^a	0,024±0,002 ^a	0,727±0,001 ^a	1,396±0,005 ^a	3,320±0,01 ^{ab}	0,064±0,007 ^a	0,322±0,002 ^a	0,010±1.10 ^{-4a}	0,752±0,003 ^a
10 B+0,1 SNP	6,132±0,16 ^b	0,037±0,003 ^a	0,964±0,014 ^{ab}	1,477±0,004 ^a	4,019±0,06 ^{ab}	0,132±0,003 ^a	0,361±0,001 ^a	0,012±1.10 ^{-4a}	0,702±0,003 ^a
10 B+0,2 SNP	6,401±0,05 ^{ab}	0,065±0,006 ^a	1,680±0,005 ^{ab}	1,649±0,001 ^{ab}	4,437±0,05 ^{ab}	0,509±0,002 ^{ab}	0,581±0,002 ^{ab}	0,017±2.10 ^{-4a}	0,622±0,002 ^a
10 B+0,5 SNP	4,231±0,02 ^{ab}	0,047±0,002 ^a	0,766±0,001 ^a	1,014±0,001 ^{ab}	2,715±0,04 ^{ab}	0,073±0,001 ^a	0,331±0,002 ^a	0,015±1.10 ^{-4a}	0,377±0,001 ^{ab}
KÖK									
Kontrol	3,930±0,04	0,249±0,001	1,579±0,001	2,262±0,017	3,482±0,03	0,758±0,002	1,233±0,003	0,371±1.10 ⁻³	0,061±0,001
10 B	2,481±0,04 ^a	0,034±0,002 ^a	0,581±0,004 ^a	1,181±0,001 ^a	2,745±0,04 ^a	0,056±0,001 ^a	0,312±0,002 ^a	0,017±2.10 ^{-4a}	0,505±0,002 ^a
10 B+0,1 SNP	2,530±0,04 ^a	0,083±0,002 ^{ab}	0,827±0,004 ^{ab}	1,274±0,001 ^a	3,552±0,04 ^b	0,326±0,002 ^{ab}	0,384±0,001 ^a	0,018±2.10 ^{-4a}	0,338±0,001 ^a
10 B+0,2 SNP	3,795±0,07 ^b	0,144±0,004 ^{ab}	1,027±0,003 ^{ab}	2,055±0,063 ^b	3,770±0,02 ^{ab}	0,451±0,002 ^{ab}	0,721±0,002 ^{ab}	0,084±1.10 ^{-3a}	0,278±0,001 ^b
10 B+0,5 SNP	1,950±0,09 ^{ab}	0,107±0,003 ^{ab}	0,789±0,005 ^a	1,642±0,025 ^{ab}	2,442±0,01 ^{ab}	0,045±0,001 ^a	0,310±0,001 ^a	0,053±1.10 ^{-3a}	0,257±0,001 ^b

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

Tablo 4.5. Kutluk 94 buğday türünde Bor ve SNP uygulaması sonucu K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn ve B içeriğindeki değişimler.

KUTLUK 94									
Konsantrason (mM)	K (mg/g Kuru Ağırlık)	Cu (mg/g Kuru Ağırlık)	Na (mg/g Kuru Ağırlık)	Ca (mg/g Kuru Ağırlık)	Mg (mg/g Kuru Ağırlık)	Mn (mg/g Kuru Ağırlık)	Fe (mg/g Kuru Ağırlık)	Zn (mg/g Kuru Ağırlık)	B (mg/g Kuru Ağırlık)
GÖVDE									
Kontrol	6,506±0,008	0,274±0,004	2,124±0,001	5,647±0,004	7,067±0,060	0,149±0,003	0,200±0,001	0,556±0,007	0,116±0,001
10 B	5,050±0,036 ^a	0,036±0,002 ^a	0,820±0,002 ^a	2,325±0,002 ^a	3,837±0,018 ^a	0,076±0,001 ^a	0,074±0,001 ^a	0,246±0,004 ^a	0,569±0,003 ^a
10 B+0,1 SNP	5,167±0,003 ^{ab}	0,041±0,001 ^a	0,759±0,002 ^{ab}	2,508±0,003 ^{ab}	4,775±0,004 ^{ab}	0,081±0,001 ^a	0,074±0,001 ^a	0,256±0,002 ^a	0,501±0,002 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	5,545±0,004 ^{ab}	0,064±0,002 ^a	1,255±0,013 ^{ab}	3,029±0,033 ^{ab}	5,744±0,001 ^{ab}	0,124±0,003 ^b	0,157±0,086 ^b	0,317±0,004 ^{ab}	0,384±0,001 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	4,352±0,002 ^{ab}	0,032±0,001 ^a	0,501±0,003 ^{ab}	2,247±0,032 ^{ab}	3,960±0,042 ^{ab}	0,062±0,001 ^a	0,053±0,001 ^a	0,129±0,002 ^{ab}	0,341±0,006 ^{ab}
KÖK									
Kontrol	3,156±0,002	0,268±0,005	4,083±0,001	2,507±0,001	2,652±0,004	0,249±0,004	0,227±0,004	0,258±0,002	0,054±0,001
10 B	0,652±0,002 ^a	0,093±0,003 ^a	1,741±0,002 ^a	0,632±0,004 ^a	1,592±0,004 ^a	0,077±0,001 ^a	0,112±0,003 ^a	0,123±0,001 ^a	0,335±0,003 ^a
10 B+0,1 SNP	0,885±0,004 ^{ab}	0,206±0,002 ^{ab}	2,226±0,002 ^{ab}	1,656±0,008 ^{ab}	3,334±0,006 ^{ab}	0,164±0,002 ^{ab}	0,137±0,002 ^a	0,143±0,005 ^a	0,277±0,002 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	1,316±0,002 ^{ab}	0,285±0,001 ^b	4,503±0,005 ^{ab}	3,507±0,005 ^{ab}	2,937±0,004 ^{ab}	0,208±0,006 ^b	0,141±0,001 ^a	0,163±0,003 ^a	0,203±0,004 ^{ab}
10 B+0,5 SNP	0,753±0,003 ^{ab}	0,135±0,002 ^a	1,653±0,003 ^{ab}	1,414±0,001 ^{ab}	1,081±0,001 ^{ab}	0,106±0,005 ^a	0,118±0,001 ^a	0,120±0,002 ^a	0,187±0,002 ^{ab}

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

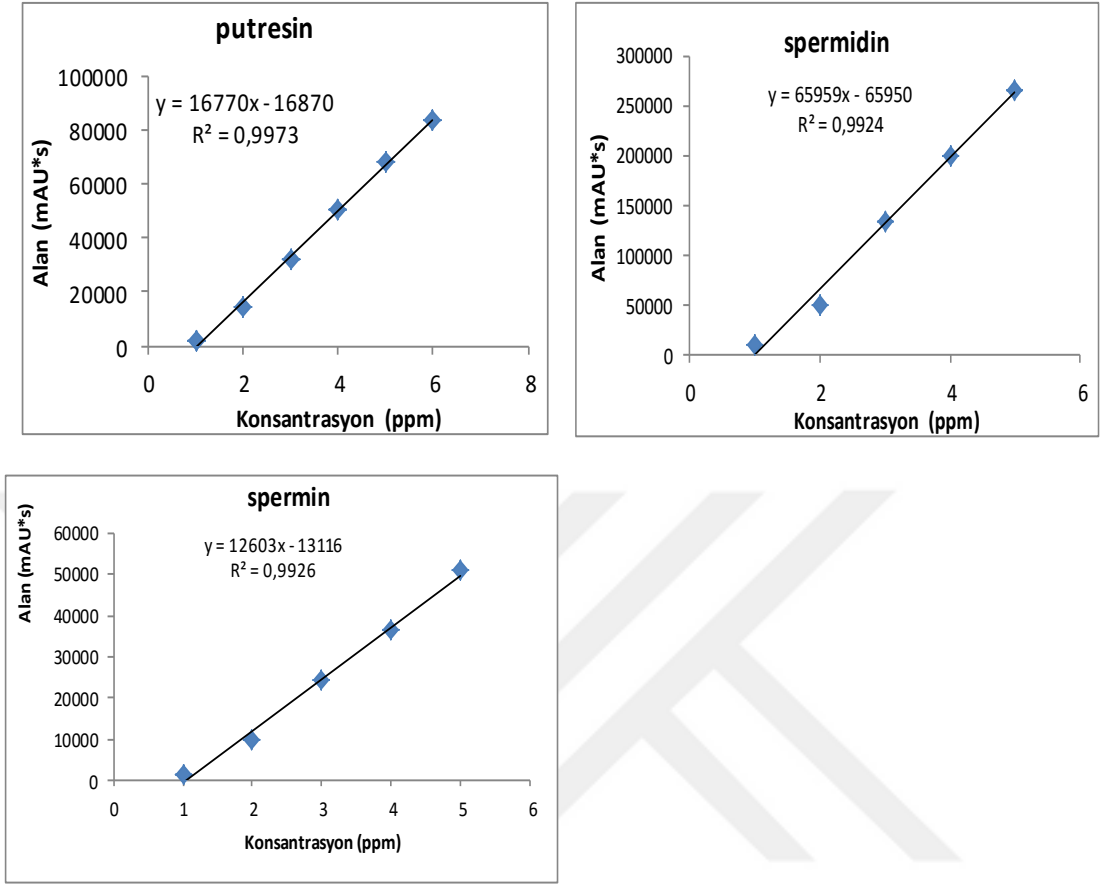
Elde edilen sonuçlara göre Bezostoya buğday türü gövdelerinde, 10 mM bor ilave edildiğinde kontrol grubuna göre B alınımının arttığı görülmektedir. 10 mM B ortamına 0,1 ve 0,2 mM SNP ilavesi anlamlı bir değişiklik göstermezken, 0,5 mM SNP eklenmesiyle birlikte B miktarı %49 oranında azalmıştır. Gövdede 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre, K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde sırasıyla %25,44, %91,63, %64,38, %62,07, %50,37, %92,20, %74,55, %97,75 oranında azalmalar gözlenmiştir. 10 mM stres grubuna 0,2 mM SNP ilave edildiğinde ise K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde sırasıyla %42,87, %170,83, %130,92, %18,08, %33,65, %689,92, %80,43, %73,89 oranında artışların olduğu tespit edilmiştir. 10 mM stres durumunda ortama ilave edilen 0,1 mM SNP de anlamlı etkilere rastlanmamıştır. Köklerde ise Bezostoya buğday türünde 10 mM bor ortamına 0,1 mM SNP ilave edildiğinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilavesiyle B miktarında sırasıyla %45 ve %49 oranında azalmalar gözlenmiştir. ($p<0.05$) (Tablo 4.4).

Kutluk 94 buğday türü gövdelerine ise 10 mM bor ilavesiyle bor oranında artış elde edilmiştir. 10 mM bor stresli ortama 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave edildiğinde bor içerikleri %12, %40 ve %32,5 oranında azalmıştır. 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde sırasıyla %22,37, %86,65, %61,37, %58,82, %45,70, %48,99, %63, %55,68 oranında azalmalar gözlenmiştir. 10 mM bor stresine karşı ilave edilen 0,2 mM SNP konsantrasyonunda, K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde sırasıyla %9,79, %75,34, %53,01, %30,25, %49,68, %63,15, %112,16, %28,80 oranında artışlar belirlenmiştir. Köklerde de benzer etkilere rastlanmıştır. Köklerde 10 mM B konsantrasyonuna 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave ettiğimizde bor içeriklerinde sırasıyla %32,2, %42,8 ve %47,3 oranında bor miktarlarında azalma bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.5). Tablo 4.4 ve Tablo 4.5 de görüldüğü gibi ortama 10 mM bor ilave edilmesiyle bor miktarında artışlar olmuştur. 0,2 mM SNP ilavesiyle bor miktarında Bezostoya (B hassas) türünde %17,27, Kutluk 94 (B toleranslı) türünde ise %40,0 oranında azalmalar elde edilmiştir.

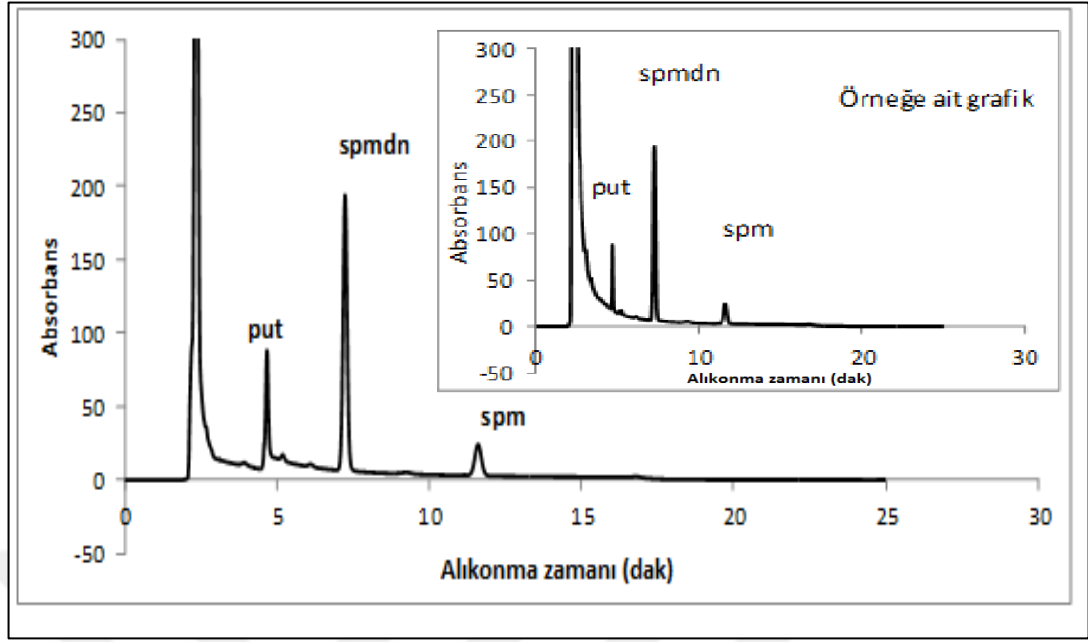
Kaya ve ark. (2015) domates bitkisine 0,5 ile 6,5 mg/L bor konsantrasyonu uyguladıklarında Ca ve K miktarlarında azalmaların olduğunu belirtmişlerdir [129]. 10 mM bor stresine 0,2 mM SNP ilave edildiğinde K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türü kök ve gövdelerinde anlamlı artışlar elde edilmiştir. 0,5 mM SNP metal içeriklerinde olumlu bir artış yaratmamıştır. Kaya ve ark. domateste bor stresine 0,1 mM SNP uyguladıklarında K ve Ca içeriklerinde artış elde etmişlerdir [129].

Bastias ve ark. (2010) domates bitkisinde yaptıkları bir çalışmada tuz stresi uyguladıkları bitkide Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn içeriklerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir [130]. Bezostoya (B hassas) ve Kutluk 94 (B toleranslı) buğday türlerinin kök ve gövdelerine ilave edilen 10 mM bor konsantrasyonu ile birlikte her iki türde de bor miktarında artışlar elde edilmiştir. Ancak Bezostoya buğday türünün gövde ve köklerinde bor konsantrasyonu daha fazla bulunmuştur. Bezostoya buğday türü gövdesinde 10 mM bor ilave edilmesiyle birlikte 0,752 mg/g bor bulunurken Kutluk 94 buğday türü gövdesinde bu miktar 0,569 mg/g'dır. Hassas tür olan Bezostoya türü B'ü bünyesinde Kutluk 94 türüne göre daha fazla biriktirmiştir. Nable (1988) arpa ve buğday genotiplerini incelediğinde B hassas kültürlerin, bor toleranslı kültürlerden boru bünyesinde daha fazla biriktirdiğini göstermiştir [131]. Bu da toleranslı genotiplerin ortamdaki yüksek miktardaki borun alınımını kısıtlayacak kök yeteneklerinin olduğunu gösterir. Bu yeteneğin toleranslı genotiplerin bor alınımını kontrol etmek için, borun pasif taşınımını kısıtlayan plazma zarının bileşimindeki değişikliklerden dolayı geliştiği öne sürülmektedir [131, 196- 199].

4.7. Poliamin (putresin, spermidin, spermin) Sonuçları



Şekil 4.15. Poliamin standartlarına ait (putresin, spermidin ve spermin) kalibrasyon grafikleri.



Şekil 4.16. Poliamin standartlarına (putresin, spermidin, spermin) ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10 B+0,2 SNP) ait absorbans ve alıkonma zamanı grafiği.
[Putresin (4.66 dak), spermidin (7.28 dak) ve spermin (11.506 dak)]

Tablo 4.6. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu poliamin (putresin, spermidin, spermin) değişimleri.

	Putresin (nmol/g Taze Ağırlık)		Spermidin (nmol/gTaze Ağırlık)		Spermin (nmol/g Taze Ağırlık)	
Konsantrasyon (mM)	Bezostoya	Kutluk 94	Bezostoya	Kutluk 94	Bezostoya	Kutluk 94
GÖVDE						
Kontrol	463,79±4,24	441,02±1,44	386,77±4,34	342,85±2,24	110,71±7,08	102,82±3,99
10 B	745,59±7,07 ^a	648,07±4,76 ^a	492,15±1,42 ^a	426,07±4,92 ^a	186,63±4,94 ^a	141,28±2,12 ^a
10 B+0,1 SNP	664,09±4,28 ^{ab}	552,27±3,21 ^{ab}	454,31±5,09 ^{ab}	405,47±7,05 ^{ab}	122,62±2,37 ^b	118,94±2,83 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	492,16±2,82 ^{ab}	453,40±4,82 ^b	328,02±2,96 ^{ab}	309,86±1,63 ^{ab}	103,23±4,73 ^b	95,12±7,02 ^b
10 B+0,5 SNP	680,79±14,15 ^b	565,68±7,06 ^{ab}	483,59±4,24 ^a	412,07±2,92 ^a	193,58±3,00 ^a	123,13±4,42 ^{ab}
KÖK						
Kontrol	1313,07±18,481	689,07±4,33	123,66±6,14	103,19±2,56	77,29±1,15	71,29±1,01
10 B	1720,45±28,92 ^a	788,78±2,82 ^a	192,59±3,65 ^a	156,29±3,24 ^a	122,67±3,29 ^a	106,44±5,03 ^a
10 B+0,1 SNP	846,02±5,62 ^{ab}	534,32±6,10 ^{ab}	186,64±2,31 ^a	141,17±1,17 ^{ab}	110,29±2,06 ^a	92,61±3,37 ^{ab}
10 B+0,2 SNP	621,59±4,82 ^{ab}	251,36±1,60 ^{ab}	171,12±1,25 ^a	126,62±2,29 ^{ab}	88,62±1,58 ^b	76,78±2,52 ^b
10 B+0,5 SNP	980,68±8,03 ^{ab}	646,36±1,92 ^{ab}	197,63±3,35 ^a	187,14±3,03 ^{ab}	131,13±2,58 ^a	97,17±3,06 ^a

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

Poliamin içeriklerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre Bezostoya buğday türünün gövdelerinde putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %60,47, %27,24 ve %68,57 oranında artışlar olduğu gözlenmiştir. Strese karşı ilave edilen 0,2 mM SNP de ise 10 mM bor konsantrasyonuna göre putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %33,99, %33,35 ve %44,68 oranında azalmalar elde edilmiştir. Kutluk 94 buğday türünde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %46,94, %24,27 ve %37,39 oranında artışlar olduğu gözlenmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna karşı 0,2 mM SNP ilave edilmesiyle poliamin içeriklerinde (putresin, spermidin ve spermin) sırasıyla %30,03, %27,36 ve %32,67 oranında azalmalar elde edilmiştir. Bor stresi ortamına ilave edilen SNP, stresten dolayı artan poliamin miktarlarını azaltmıştır. Ancak en iyi cevap 0,2 mM SNP konsantrasyonundan elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.6).

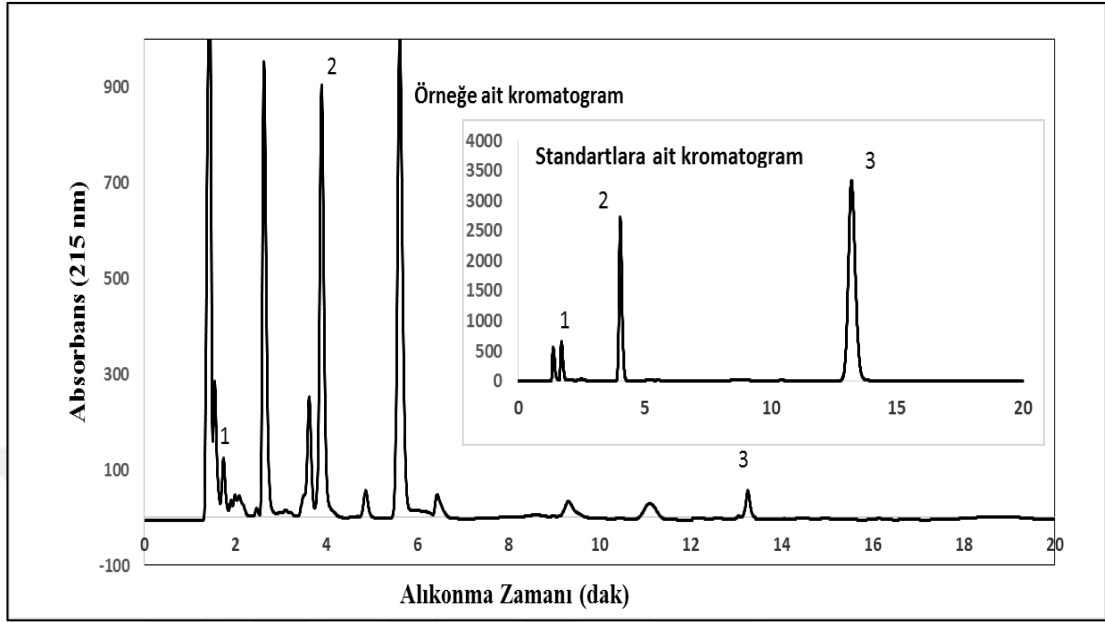
Köklerde ise değişimler şöyle bulunmuştur. 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre Bezostoya buğday türünde putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %31,02 %55,74 ve %58,70 oranında artışlar olduğu gözlenmiştir. Strese karşı ilave edilen 0,2 mM SNP de ise 10 mM bor konsantrasyonuna göre putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %63,87, %11,15 ve %27,75 oranında azalmalar elde edilmiştir. Kutluk 94 buğday türünde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde sırasıyla %14,47, %51,46 ve %49,30 oranında artışlar olduğu gözlenmiştir. 10 mM bor konsantrasyonuna karşı 0,2 mM SNP ilave edilmesiyle poliamin içeriklerinde (putresin, spermidin ve spermin) sırasıyla %68,13, %18,98 ve %27,86 oranında azalmalar elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.6).

Stres etkisiyle Bezostoya buğday türünün gövdelerinde poliamin artışı Kutluk 94 türüne oranla daha fazla olmuştur. Sonuçlara göre stresten etkilenme Bezostoya türünde daha fazla meydana gelmiştir. Bor stresli, ortama SNP ilave ettiğimizde poliamin içeriklerinde azalma meydana gelmiştir. 0,1 ve 0,5 mM SNP de çok anlamlı değişimler gözlenmezken 0,2 mM SNP de bor stresinde yükselen poliamin içeriklerinde azalmalar gözlenmiştir. NO ve poliaminler, kuraklık, sıcaklık, mineral fazlalığı ve eksikliği gibi bazı abiyotik stres koşullarında düzenleyici olarak

fonksiyon göstermektedir [200-202]. Örneğin buğday yaprakları ve filizleri kuraklığa maruz kaldığında NO donörü olan SNP uygulandığında, stoma kapanmasının uyarılmasıyla terleme oranının azaltıldığı ve böylece su kaybında azalma olduğu rapor edilmiştir. Son yapılan çalışmalar poliamin ve NO sinyal metabolizmasının diğer metabolik yollarla ortak düşünülmesi gerektiğini göstermiştir [132].

Poliaminlerin oksidatif strese bazı fonksiyonları olduğu bilinmektedir. Poliaminlerin antioksidatif etkileri onların, anyonik ve katyonik bağlayıcı özelliklerinin bir arada olmasından ileri gelmektedir. Bu özelliklerinden dolayı radikal sönmüleyici olarak davranabilir, lipid peroksidasyonunu azaltabilir, metal katalizli reaksiyonlara girebilir ve diamin oksidaz (DAO), poliamin oksidaz (PAO) sayesinde hidrojen peroksit üretimini gerçekleştirebilirler [132]. Poliamin birikimindeki değişimler, UV radyasyonun sebep olduğu strese karşı bir cevap olarak ortaya çıktığı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Bitkilerin kendilerini ozon ve ozon kaynaklı stresten korumak için poliamin düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir [132]. Bazı oksidatif streslerde poliamin katabolizmasının ürettiği hidrojen peroksitin antioksidan savunma sistemini aktive ettiği de gösterilmiştir. Ayrıca fenil propanoid ve poliamin konjugatları da ROS ve NOS'lara karşı stres koşullarında bir antioksidan cevap oluşturacak şekilde hareket edebildiği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur [133].

4.8. Sistein, GSH ve GSSG Sonuçları



Şekil 4.17. Standartlara ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10 B+0,2 SNP) ait absorbans ve alıkonma zamanı grafiği. [1: sistein (1.716 dak), 2: GSH (4.048 dak), 3: GSSG (13.208 dak)].

Tablo 4.7. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu Sistein, GSH ve GSSG değişimleri.

	Konsantrasyon (mM)	Sistein (ng/g Taze Ağırlık)	GSH (ng/g Taze Ağırlık)	GSSG (ng/g Taze Ağırlık)
Gövde				
Bezostoya	Kontrol	124,24±5,34	187,79±6,33	24,65±1,98
	10 B	63,11±2,65 ^a	105,70±7,15 ^a	11,90±0,058 ^a
	10 B+0,1 SNP	104,59±1,99 ^{ab}	131,71±2,18 ^{ab}	16,91±0,95 ^{ab}
	10 B+0,2 SNP	211,85±9,69 ^{ab}	160,24±3,65 ^{ab}	21,61±1,46 ^{ab}
	10 B+0,5 SNP	96,02±2,79 ^{ab}	122,66±2,38 ^{ab}	18,59±1,05 ^{ab}
Kutluk 94	Kontrol	207,96±4,28	265,03±4,35	44,75±3,46
	10 B	107,39±9,04 ^a	171,12±3,24 ^a	22,93±2,15 ^a
	10 B+0,1 SNP	119,05±1,33 ^a	209,67±4,46 ^{ab}	31,71±2,58 ^{ab}
	10 B+0,2 SNP	307,10±6,53 ^{ab}	248,09±4,35 ^{ab}	37,79±2,12 ^{ab}
	10 B+0,5 SNP	105,84±8,88 ^a	191,10±6,28 ^{ab}	25,58±1,68 ^{ab}
Kök				
Bezostoya	Kontrol	108,62±3,53	102,86±2,98	15,29±1,54
	10 B	65,63±2,51 ^a	59,79±1,28 ^a	6,59±0,47 ^a
	10 B+0,1 SNP	124,68±5,73 ^{ab}	116,97±7,65 ^{ab}	8,42±0,55 ^{ab}
	10 B+0,2 SNP	132,44±4,14 ^{ab}	159,00±8,18 ^{ab}	11,59±0,78 ^{ab}
	10 B+0,5 SNP	100,53±3,65 ^{ab}	98,50±5,35 ^b	9,00±0,62 ^{ab}
Kutluk 94	Kontrol	134,00±1,14	126,46±3,25	16,87±0,85
	10 B	82,52±3,52 ^a	87,18±2,17 ^a	7,95±0,65 ^a
	10 B+0,1 SNP	106,50±2,12 ^{ab}	119,77±3,65 ^b	9,85±0,84 ^{ab}
	10 B+0,2 SNP	151,58±2,47 ^{ab}	196,89±6,87 ^{ab}	14,56±1,15 ^{ab}
	10 B+0,5 SNP	103,50±2,24 ^{ab}	104,59±3,28 ^{ab}	10,88±1,07 ^{ab}

(a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. p<0.05, analiz sayısı (n):3)

Kutluk 94 ve Bezostoya buğday türlerinde sistein, GSH ve GSSG miktarları kök ve gövde de şöyle bulunmuştur. 10 mM bor konsantrasyonunda kontrol grubuna göre Kutluk 94 buğday gövdelerinde sistein, GSH ve GSSG miktarları sırasıyla %48,36, %35,43 ve %48,75 oranında azalmıştır. Bezostoya türü buğday gövdelerinde ise bu moleküllerdeki azalma sırasıyla %49,20, %43,85 ve %51,00 olarak gözlenmiştir. Kutluk 94 türü buğday gövdelerinde, 10 mM bor konsantrasyonuna 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave ettiğimizde GSH içeriklerinde sırasıyla %22,52, %44,98 ve %11,67 oranında artışların olduğu tespit edilmiştir. Bezostoya buğday türü gövdelerinde ise bu artış oranları sırasıyla %24,60, %51,59 ve %16,04 olarak bulunmuştur. Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde GSSG miktarında 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde %64,80 oranında bir artış gözlenirken Bezostoya türünde bu artış %81,59 olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.7).

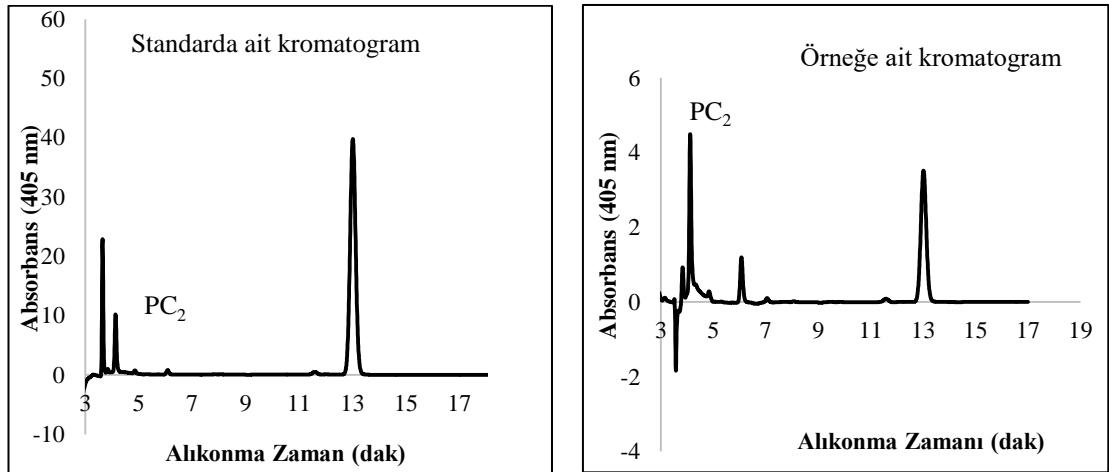
Köklerde ise Kutluk 94 türünde sistein, GSH ve GSSG oranları 10 mM bor konsantrasyonunda kontrol grubuna göre %38,80, %31,06 ve %52,87 oranında azalmıştır. Bezostoya buğday türünde ise kontrol grubuna göre bor stresiyle birlikte bu moleküllerin azalma oranları %39,60, %41,87 ve %56,89 olarak bulunmuştur. Kutluk 94 buğday türü köklerinde 10 mM bor konsantrasyonuna ilave edilen 0,1 0,2 ve 0,5 mM SNP sonucunda GSH içeriklerinde sırasıyla %37,38, %125,84 ve %19,70 oranında artışların olduğu gözlenmiştir. Bezostoya buğday türü gövdelerinde ise sırasıyla GSH miktarları %95,63, %165,93 ve %64,74 oranında artmıştır. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Kutluk 94 ve Bezostoya buğday türü köklerinde GSSG içeriklerinde sırasıyla %83,14 ve %75,87 oranında artışların olduğu deneylerimiz sonucundaki verilerden elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.7).

Ruiz ve ark. (2003) ayçiçeği bitkisinde aşırı borun GSH sentezini inhibe ettiğini söylemiştir. Ayrıca dışarıdan ilave edilen antioksidanların borun oluşturduğu zararları azalttığını de bildirmiştir [134]. Bor stresine karşı ilave ettiğimiz 0,1 ve 0,2 mM SNP konsantrasyonunda, sistein, GSH ve GSSG oranlarında artış gözlenirken, 0,5 mM SNP konsantrasyonunda anlamlı değişiklikler elde edilmemiştir.

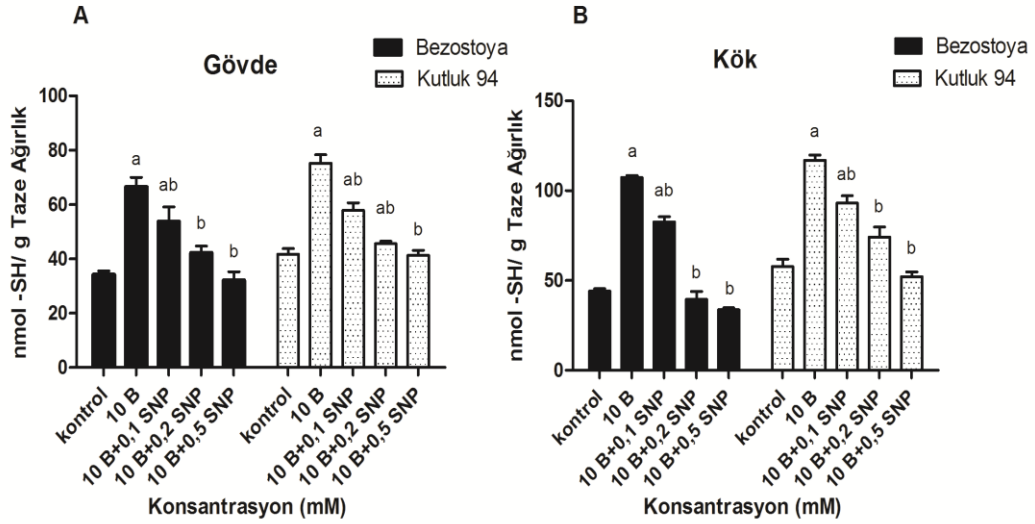
GSH'nin sentezlenmesi, birden fazla hücrel reaksiyonlar için substrat elde edilmesini sağlar. Bu reaksiyonlardan biri de iki glutatyonun (GSH) bir disülfit bağıyla bağlanıp GSSG molekülünü oluşturma reaksiyonudur. GSH ve GSSG arasındaki bu denge hücrel redoks durumunun korunması için çok önemlidir [135]. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklı oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmak için hücrelerin normal indirgen durumda kalmaları gerekir ve bunun için ortamda GSH'a ihtiyaç vardır [203].

Bitkilerde glutatyon (GSH), glutaredoksin, glutatyon S transferaz, glutatyonilasyon proteinlerinin yapısında görev alır. Hücrede birçok metabolik yolakta görevli olduğu için GSH'ın üretimi hücre fonksiyonlarında hayati önem taşır. 10 mM bor ile bitkide oluşan oksidatif stresten dolayı sistein, GSH ve GSSG içeriklerinde büyük ölçüde azalmalar olmuştur. Çünkü GSH, biyotik ve abiyotik streslerde oksidatif strese cevap oluşturur. $^1\text{O}_2$, H_2O_2 ve birçok tehlikeli ROS (OH^\cdot gibi) türlerine karşı potansiyel sönmüleyici görevi yapar [204]. Ortamda üretilen GSH moleküllerinin oluşan bu stres koşullarında antioksidan ara maddeleri gibi kullanıldığı deney sonuçlarımıza göre yorumlanabilmektedir.

4.9. Fitoşelatin (PC_2) Sonuçları



Şekil 4.18. Standart ve örneğe (Kutluk 94 gövde 10B+0,2 SNP) ait Fitoşelatin 2 (PC_2) absorbans ve alıkonma zamanları (4.11 dak.).



Şekil 4.19. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Fitoşelatin (PC_2) değişimleri. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p<0.05$, analiz sayısı (n):3)

Yaptığımız deneyler sonucu elde ettiğimiz verilere göre Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde fitoşelatin içerikleri şöyle değişmiştir. Bezostoya buğday türü gövdelerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre fitoşelatin içeriği %94,49 oranında artış göstermiştir. Bu artış kutluk 94 buğday türünde %80,44 olarak bulunmuştur. Bezostoya buğday türüne 10 mM bor stresine 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP uyguladığımızda 10 mM bor stresine göre fitoşelatin içeriklerinde sırasıyla %19,02, %36,42 ve %51,60 oranında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Bu değişimler Kutluk 94 türünde sırasıyla, %22,98, %39,35 ve %45,08 olarak bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.19.A).

Köklerde ise fitoşelatin içeriklerindeki değişimler şöyledir. Bezostoya buğday türü köklerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre fitoşelatin içeriği %142,62 oranında artış göstermiştir. Bu artış Kutluk 94 buğday türünde %102,24 olarak bulunmuştur. Bezostoya buğday türüne 10 mM bor stresine 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP uyguladığımızda 10 mM bor stresine göre fitoşelatin içeriklerinde sırasıyla %22,92, %63,35 ve %68,51 oranında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Bu değişimler

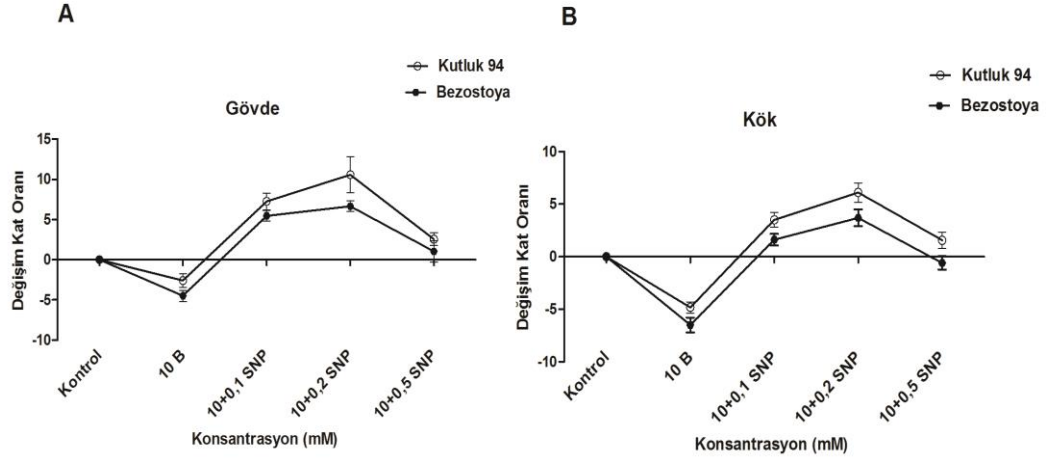
Kutluk 94 türünde sırasıyla, %20,49, %36,74 ve %55,54 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.19.B).

Glutasyon biyotik ve abiyotik streslerde bitkinin çevreye adaptasyonlarında hayati rol oynamaktadır. Fitoşelatin formuna geçerek ağır metallere kompleks oluşturabilmesi bu duruma örnek olarak verilebilir. GSH'lar, (Y-Glu-Cys)₂₋₅-Gly formülünden de anlaşılacağı gibi fitoşelatin biyosentezinin substrat molekülleridir. Ağır metal taşınması ve detoksifikasyonu süreçlerinde önemli bir rol oynarlar [90, 92, 205]. Fitoşelatinler, Ni gibi taşınım gerektiren metallere varlığında yoğun sentezlenir. Sonuçlarımıza göre bor miktarının artmasıyla PC₂ düzeylerinde de artış olurken, sistein, GSH ve GSSG içeriklerinde ters orantılı bir şekilde azalma meydana gelmiştir. Bu ters orantı bize fitoşelatin biyosentezi gerçekleşirken GSH'ların substrat olarak kullanıldığını göstermektedir. Metal kaynaklı fitoşelatinler bitkilerde özellikle tahıllarda metal toksisitesinin bir göstergesi olarak fonksiyon gösterir [136]. Pb, Cd ve Cu gibi metallere artışı, gıvışkan otu, buğday, mısır ve mikroalgler de metal toksisitesine sebep olur. Bitki büyümesini engeller ve fitoşelatin birikimini artırır [136-140].

Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda Cd varlığında fitoşelatinler artarken GSH oranında azalmaların olduğu gözlenmiştir. Üstelik gerek bitkilerle gerek hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda bitkiler glutasyon inhibitörlerine (butiyonin sülfoksimin) maruz bırakıldıklarında fitoşelatin sentezinin inhibisyonunun gerçekleştiği ve bitkide Cd hassasiyetinin olduğu gösterilmiştir. Bu hassasiyet ortama glutasyon ilavesi yapılarak ortadan kaldırılmıştır [92].

4.10. Real Time PCR Sonuçları

Nitrat redüktaz enzimine ait RT-PCR analizi sonucu elde edilen enzim kat artış oranı grafikleri aşağıdadır.



Şekil 4.20. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde Bor ve SNP uygulaması sonucu gövde (A) ve kök (B) Nitrat Redüktaz Enzim aktivitesinin Real Time PCR analizi. (a: kontrole göre, b:10 B'a göre, ab: hem kontrol hem de 10 B'a göre anlamlılığı ifade eder. $p < 0.05$, analiz sayısı (n):3)

Nitrat redüktaz enziminin bor stresinden nasıl etkilendiğini ve daha sonra ortama eksojen olarak ilave ettiğimiz NO'nun enzim aktivitesine ve ekspresyonuna etkilerini inceledik. Nitrat redüktaz enzimi NO metabolizmasında önemli rol oynayan bir enzim olduğundan bu enzimin davranışlarını incelemek çalışmamız açısından büyük önem taşımaktadır. Bu enzimin hem aktivitesini hem de mRNA düzeyinde sentezlenip sentezlenmediğini deneylerimiz sonucu elde ettiğimiz verilerle yorumladık.

Nitrat Redüktaz enzimini Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinin gövde ve kök örneklerinin real time PCR analizi yapıldı. Sonuçlar, konsantrasyona karşı enzimin ekspresyonundaki değişim (kat) olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.20). Kontrol grubunun ekspresyon sayısı sıfır kabul edilerek diğer örnekler için değişimler kontrol grubu referans alınarak yorumlanmıştır. Gövdelerde kontrol grubuna göre değişim 10 mM bor ilavesiyle Bezostoya türünde 4,5 kat, Kutluk 94 türünde 2,6 kat oranında azalmıştır. Bezostoya türüne ait buğday gövdelerinde 10 mM bor konsantrasyonuna

0,1 mM SNP, 0,2 mM SNP ve 0,5 mM SNP ilaveleriyle sırasıyla kontrol grubuna göre; 7,2, 10,57, 2,55 kat olarak artış gözlenmiştir. Kutluk 94 türü gövdelerinde ise 10mM bor konsantrasyonuna 0,1 mM SNP, 0,2 mM SNP ve 0,5 mM SNP ilaveleriyle sırasıyla kontrol grubuna göre; 5,46, 6,65, 1,03 kat oranında artışlar elde edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.20.A).

Köklerde ise; Bezostoya buğday türünde 10 mM bor konsantrasyonunda kontrole göre enzim ekspresyonunda 6,5 kat oranında azalma olurken, Kutluk 94 türünde 4,8 kat oranında azalma olmuştur. Bezostoya buğday türü köklerinde 10 mM bor stresine 0,1 ve 0,2 mM SNP uygulamaları da ekspresyon oranları sırasıyla kontrol grubuna 1,6 ve 3,6 kat artmıştır. Kutluk 94 buğday türü köklerinde ise 10 mM bor stresine 0,1 ve 0,2 mM SNP uygulamalarında ekspresyon oranları sırasıyla kontrol grubuna 3,5 ve 6,1 kat artmıştır. 10 mM bor stresine 0,5 mM bor uygulandığında kontrol grubuna göre Bezostoya köklerinde 0,68 kat oranında azalma olurken, Kutluk 94 buğday köklerinde 1,55 kat oranında artış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.20.B).

Nitrat redüktaz aktivitesi hem transkripsiyon hem de translasyon sonrası düzeyde modüle edilebilir. Örneğin buğday ve salatalıkta NR'ın mRNA düzeylerinin soğuk ve NO_3^- stresinden etkilendiği belirtilmiştir [145]. Tütün bitkisinde kuraklık stresiyle birlikte bu enzimin hem mRNA düzeyi hem de aktivitesi azalmıştır [206]. NR'ın fosforilasyonu enzimin post translasyonunu değiştiren en yaygın örnektir [207, 208]. Bu fiziksel ve metabolik efektörlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması ile bor stresi ve NO varlığındaki nitrat redüktaz aktivitesinin değişimi aydınlatılabilir.

Nitrat redüktaz (NR), nitrat asimilasyon metabolik yolunun birincil enzimidir. Bitkilerde stoplazmada nitratın nitrite indirgenmesini katalizler [141]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NR proteinlerinin düzenleyici özellikleri ve yapılarının karakterizasyonu üzerine odaklanılmıştır [141, 142]. Fakat bor stresi üzerine NO ilavesini baz alan ve NR gen ekspresyonunu inceleyen bir çalışma henüz yapılmamıştır. NR geninin ekspresyonunu arttıran birincil etken ışıktır. Işığın protein

seviyesinde NR aktivitesini indüklediği belirtilmiştir. Fotosentez gibi nitrat asimilasyonu da enerji tüketen bir metabolik yoldur ve ışık gerektirir [141, 143]. Diğer çevresel faktörler, yüksek sıcaklık, kuraklık, soğuk olarak gösterilebilir [205]. Biz ise bu çalışmamızda bor toksisitesinin NR gen ekspresyonuna etkisini inceledik.

Yaptığımız deneyler sonucu elde edilen verilere göre Nitrat Redüktaz (NR) gen ekspresyonu 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre azalmıştır. Bezostoya türündeki azalma 4,5 kat iken, Kutluk 94 türünde ise 2,6 kat bulunmuştur (Şekil 4.20). Bezostoya buğday türü bor stresinden daha fazla etkilenmiştir. Soğuk stresi uygulanan domates bitkisinde NR gen ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir [144]. Ayrıca kuraklığın mısır yapraklarında NR'ın mRNA seviyelerini azalttığı da yapılan araştırmalar sonucu belirtilmiştir [145]. Bor stresine ilave olarak ortama eklediğimiz SNP (NO donörü) ekspresyon seviyesini 0,1 ve 0,2 mM derişimlerinde arttırmış fakat 0,5 mM düzeyinde toksik etki yaratmış ve NR gen ekspresyonunda azalmalara neden olmuştur.

Bu sonuçlar, NO'nun B stresine karşı buğday bitkisinin büyümesi ve gelişmesinde hayati önem taşıyan birçok metabolik süreçte iyileşmelere neden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, NO uygulaması, B toksisitesinin problem teşkil ettiği buğday tarımının yapıldığı alanlarda iyileştirici olarak kullanılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu doktora çalışmasında bor stresine maruz bırakılmış iki buğday türüne iyileştirici olarak Nitrik Oksit (NO) donörü olan sodyum nitroprussid (SNP) verildi.
2. Çalışmada buğday bitkisinin Bezostoya (bora hassas) ve Kutluk 94 (bora toleranslı) iki tescilli türü kullanıldı.
3. Bor konsantrasyonu 10 mM (toksik düzey), SNP (NO donörü) konsantrasyonu 0,1, 0,2 ve 0,5 mM olarak belirlendi. Sonuçlar kontrol grubu (borsuz) ve 10 mM'a göre kıyaslanarak yorumlandı.
4. Deneyleerde iki buğday türünün gövde ve kök kısımları bitki materyali olarak kullanıldı.
5. Bor stresiyle birlikte her iki buğday türünde, gövde, kök uzunluklarında ve ağırlıklarında, LMWOA, metal içeriklerinde ve sistein, GSH, GSSG içeriklerinde, enzim aktivitelerinde azalmalar belirlendi.
6. Bor stresi arttıkça ayrıca MDA, % EL, prolin, H₂O₂, PA, PC₂, içeriklerinde artışlar elde edildi.
7. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday gövde ve köklerinde 10 mM bor derişiminde taze ağırlık miktarında kontrol grubuna azalma gözlenirken 10 mM bor derişimine 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde her iki buğdayda sırasıyla %64 ve %103 oranlarında artışların olduğu belirlendi.
8. 10 mM bor stresiyle birlikte Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinin kök ve gövdelerinde, prolin, H₂O₂ ve MDA içeriklerinde artış olduğu belirlendi. Ortama iyileştirici olarak ilave edilen SNP konsantrasyonlarından 0,2 mM'ın strese en iyi cevap oluşturduğu belirlendi.
9. Her iki buğday türünün gövde ve köklerinde Glutasyon Peroksidaz (GPX), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon -S-Transferaz (GST), Nitrat Redüktaz (NR) enzimlerinin aktiviteleri tayin edilmiştir. Enzim aktivitelerinde 10 mM bor stresiyle birlikte azalma olduğu tespit edildi.
10. Strese karşı ilave edilen SNP konsantrasyonlarından 0,1 mM da fazla bir değişim gözlenmezken 0,5 mM'ın da bitki için toksik düzey olduğu belirlenmiştir. En etkin sonuç 0,2 mM SNP'de elde edilmiştir.

11. Düşük molekül ağırlıklı organik asit (LMWOA) içerikleri, poliamin düzeyleri, fitoşelatin içerikleri HPLC cihazı ile tayin edildi. Metal içerikleri ise ICP-MS cihazı ile tayin edildi.
12. Düşük molekül ağırlıklı organik asitler (LMWOA) olan miktarları bor stresıyla birlikte azalma gösterdi.
13. 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde Bezostoya buğday türü gövdelerinde sırasıyla, benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit %118, %42, %83, %52, %90, %36, %26, %137 oranında artışlar elde edildi.
14. Kutluk 94 buğday türü gövdelerinde 10 mM bor konsantrasyonuna 0,2 mM SNP ilave ettiğimizde benzoik, malik, molanik, süksinik, oksalik, formik, propiyonik ve bütirik asit miktarlarında sırasıyla %22, %54, %21, %32, %39, %79, %38, %29 oranında artışlar elde edildi.
15. Elde edilen sonuçlara göre Bezostoya buğday türü gövdelerinde, 10 mM bor ilave edildiğinde kontrol grubuna göre B alınımının arttığı görülmektedir. 10 mM B ortamına 0,1 ve 0,2 mM SNP ilavesi anlamlı bir değişiklik göstermezken, 0,5 mM SNP eklenmesiyle birlikte B miktarı %49 oranında azalmıştır.
16. Bezostoya buğday türü köklerin de ise 10 mM bor ortamına 0,1 mM SNP ilave edildiğinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilavesiyle bor miktarında sırasıyla %45 ve %49 oranında azalmalar gözlenmiştir.
17. Kutluk 94 buğday türü gövdelerine ise 10 mM bor ilavesiyle bor oranında artış elde edilmiştir. 10 mM bor stresli ortama 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave edildiğinde bor içerikleri %12, %40 ve %32,5 oranında azalmıştır.
18. Kutluk 94 buğday türü köklerinde 10 mM B konsantrasyonuna 0,1, 0,2 ve 0,5 mM SNP ilave ettiğimizde bor içeriklerinde sırasıyla %32,2, %42,8 ve %47,3 oranında bor miktarlarında azalma bulunmuştur.
19. Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre K, Cu, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn içeriklerinde azalmalar elde edildi.
20. Poliamin içeriklerinde 10 mM bor stresinde kontrol grubuna göre Bezostoya ve Kutluk 94 buğday türlerinde putresin, spermidin ve spermin içeriklerinde

artışlar olduğu gözlemlendi. Ortama ilave edilen 0,2 mM SNP poliamin içeriğinin azalmasına yol açtı.

- 21.** Bezostoya ve Kutluk 94 türlerinde sistein, GSH ve GSSG oranları 10 mM bor konsantrasyonunda kontrol grubuna göre azalırken, Fitoşelatin miktarları artış gösterdi.
- 22.** Real Time PCR sonuçlarımıza göre Nitrat Redüktaz enzimine ait gen ekspresyonu 10 mM bor stresiyle birlikte azaldı. SNP ilavesiyle 0,1 ve 0,2 mM da artış gözlenirken, 0,5 mM'ın toksik düzeyde etki yarattığı belirlendi.
- 23.** Yaptığımız bu doktora çalışmasında Türkiye'de tarımda tahıl üretiminde önemli bir yeri olan buğday bitkisini inceledik. Bu bitkinin borlu topraklarda yetiştirilebilmesine yardımcı olmak için eksojen olarak toprağa verilebilecek SNP (NO donörü) düzeylerini belirledik.
- 24.** Yaptığımız deneyler sonucunda 0,1 mM SNP düzeyinin bitkide çok etkin biçimde sonuç vermediğini gözlemledik. 0,2 mM SNP düzeyinin buğday bitkisi için optimum etki gösterdiğini belirledik. 0,5 mM'ın ise buğday bitkisi için toksik düzey olduğunu ve bitkideki bor stresine olumlu bir katkı yapmadığını belirledik.
- 25.** Elde edilen verilere göre, NO'nun B stresine karşı buğday bitkisinin büyümesi ve gelişmesinde hayati önem taşıyan birçok metabolik süreçte iyileşmelere neden olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre, B toksisitesinin problem oluşturduğu buğday tarımının yapıldığı alanlarda, NO'nun bitkiye dışarıdan uygulanması ile bitkideki B kaynaklı stresin negatif etkileri ortadan kaldırılabılır.

KAYNAKLAR

- 1- Büyük, İ., Soydam, S., Aras, S. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2012, 69, 97-110.
- 2- Smirnoff, N. Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions. Ed. Smirnoff N. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 2005, 53-86.
- 3- Madencilik özel ihtisas komisyonu raporu, Devlet Planlama Teşkilatı, Ankara, 2001.
- 4- Bor Tuzları – Trona – Kaya Tuzu – Sodyum Sülfat – Stronsiyum. Devlet Planlama Teşkilatı. Ankara, 2001,
- 5- Matoh, T. Boron in plant cell walls, *Plant Soil*. 1997, 193, 59–70.
- 6- Reid, R.J., Hayes, J., Post, A., Stangoulis, J., Graham, R. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant Cell Environment*. 2004, 27, 1405–1414.
- 7- Nozawa, K., Miwa, K., Kobayashi, M., Fujiwara, T. Isolation of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that confer yeast boric acid tolerance, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006, 70, 1724–1730.
- 8- Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N., Yorgancılar, M., Ceyhan, E., Çiftçi, N., Acar, B., Gültekin, İ., Işık, Y., Şeker, C., Babaoglu, M. Determination of B Contents of Soils in Central Anatolian Cultivated Lands and Its Relations Between Soil and Water Characteristics. in *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Ed: Goldbach, H.E., Brawn, P.H., Rerkasem, B., Thellier, M., Wimmer, M.A., Ben, R.W. Kluwer Academic Publishers, New York, 2002, 391-400.
- 9- Lichtenhaler, H.K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*. 1996, 148, 4-14.
- 10- Raychaudhuri, S. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Botanical Review*. 2000, 66(1), 89-98.
- 11- McKersie, B.D., Leshem, Y. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishers. 1994, 256, 0-7923-2827-2.
- 12- Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review. Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 1999, 50, 601-639.
- 13- Alonso, R., Elvira, S., Castillo, F.J., Gimeno, B. S. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environment*. 2001, 24, 905-916.
- 14- Akkuş, İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Mimoza Yayınları. Konya. 1995.
- 15- Fry, S.C., Miller, J.G., Dumville, J.C. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant Soil*. 2002, 247, 57–67.

- 16- Zagorchev, L., Seal, C.E., Kranner, I., Odjakova, M. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14, 7405–7432.
- 17- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H., Karenlampi, S.O. Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity?. *Plant Biology*. 2011, 13, 225–232
- 18- Cobbett, C., Goldsbrough, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review. Plant Biology*. 2002, 53, 159–182.
- 19- Anjum, N.A., Umar S., Ed: Chan, M.T. Ascorbate Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer, 2010.
- 20- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. Glutathione in plants: an integrated overview, *Plant Cell Environment*. 2012, 35, 454, 484.
- 21- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Foyer, C.H. Glutathione, *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*. 2011, 9.
- 22- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodriguez-Serrano, M., del Rio, L.A., Palma, J.M. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist*. 2006, 170, 43-52.
- 23- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*. 1990, 180, 278-284.
- 24- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular B., Reynolds H., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 1994, 102, 167-175.
- 25- Chalapathi Rao, A.S.V., Reddy, A.R. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. Ed: Khan, N.A., Singh, S., Umar, S. *Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants*. Springer, The Netherlands, 2008, 111-147.
- 26- Bashir, K., Nagasaka, S., Itai, R.N., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K. Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. *Plant Molecular Biology*. 2007, 65, 277-284.
- 27- Reddy, A.R., Raghavendra, A.S. Photooxidative stress. Ed: Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Reddy K.J. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer. The Netherlands. 2006, 157-186.
- 28- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53, 1283-1304.

- 29- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. *Plant Physiology*. 2003, 133, 443-447.
- 30- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 2010, 12, 012.
- 31- Sen, C.K., Packer, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000, 72, 653-669.
- 32- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Zanden, J.V., Bladeren, P.J.V. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001, 10, 141-152.
- 33- Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü Yıllık Faaliyet Raporu. Ankara, 2007.
- 34- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V. Boron in plant biology. *Plant Biology*. 2002, 4, 205-223.
- 35- Reid, R. Boron toxicity and tolerance in crop plants. Ed: Tuteja, N., Gill, S. *Crop Improvement Under Adverse Conditions*. Springer. New York. 2013, 15.
- 36- Tsadilas, C.D., Soil Contamination with Boron due to Irrigation with Treated Municipal Waste Water Boron in Soils and Plants. Ed: Bell, R.W., Rerkasem, B. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 1997, 265–270.
- 37- Nable, R.O., Banuelos, G.S., Paull, J.G. Boron toxicity. *Plant Soil*. 1997, 193, 181–198.
- 38- Alpaslan, M., Gunes, A. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant Soil*. 2001, 236, 123–128.
- 39- Francois, L.E. Effect of excess boron on tomato yield, fruit size, and vegetative growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1984, 109, 322–324.
- 40- Cervilla, L.M., Blasco, B.A., Rios, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany*. 2007, 100, 747–756.
- 41- Paull, J.G., Nable, R.O., Rathjen, A.J. Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. *Plant Soil*. 1992, 146, 251–260.
- 42- Hayes, J.E., Reid, R.J.. Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiology*. 2004, 136, 3376–3382.
- 43- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S., Sahin, O. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae*. 2006, 10, 279–284.

- 44- Mittler, R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 2002, 7, 405–410.
- 45- Mahboobi, H., Yucel, M., Oktem, H.A. Cell wall uronic acid concentrations of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition*. 2001, 24, 1965–1973.
- 46- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Gianna-koula, A. Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany*. 2004, 51, 247–257.
- 47- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I. Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple root stock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*. 2006, 56, 54–62.
- 48- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S., Sahin, O. Silicon increases boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron. *Biologia Plantarum*. 2007, 51, 571–574.
- 49- Inal, A., Pilbeam, D.J., Gunes, A. Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley. *Journal of Plant Nutrition*. 2009, 32, 112–128.
- 50- Karabal, E., Yucel, M., Oktem, H.A. Antioxidants responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*. 2003, 164, 925–933.
- 51- Emebiri, L., Michael, P., Moody, D. Enhanced tolerance to boron toxicity in two-rowed barley by marker-assisted introgression of favourable alleles derived from Sahara 3771. *Plant Soil*. 2009, 314, 77–85.
- 52- McDonald, G., Eglinton, J., Barr, A. Assessment of the agronomic value of QTL on chromosomes 2H and 4H linked to tolerance to boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Soil*. 2009, 10, 1007, 11104-009-0006-1.
- 53- Reid R. Can we really increase yields by making crop plants tolerant to boron toxicity? *Plant Science*. 2010, 178, 9–11.
- 54- Seçkin, B. Mannitolün tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinin antioksidant enzim düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2005. (Yüksek Lisans Tezi).
- 55- Eraydın, E. Topraklarda bor adsorpsiyonu üzerine bazı anyonların etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2000. (Yüksek Lisans Tezi).
- 56- Nebiler, H., Erdoğan, Y., Olgun, A., Yerlikaya, C. The effect of Boron in vineyard. 1st. Symposium on protection of environmental and Erhami Karaçam, Kütahya. 1999.
- 57- Özkurt, Ş. Boron accumulation in carps tissues (*Cypriks carpio* L., (1758) in dam lakes Çatören and Kunduzlar (Kırka- Eskişehir). *Turkish Journal of Biology*. 2000, 24, 663-676.

- 58- Stryer, L. *Biochemistry*, third ed. W.H. Freeman and Company. 1995, 732.
- 59- Beligni, M.V., Lamattina, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environment*. 2001, 24, 267–278.
- 60- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Barroso, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*. 2004, 65, 783–792.
- 61- Arasimovic, M., Floryszak-Wieczorek, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Science*. 2007, 172, 876–887.
- 62- Wink, D.A., Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998, 25, 434–456.
- 63- Shi, H.T., Li, R.J., Cai, W., Liu, W., Fu, Z.W., Lu, Y.T. In vivo role of nitric oxide in plant response to abiotic and biotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. 2012, 7, 437–439.
- 64- Radi, R., Beckam, J.S., Bash, K.M., Freeman, R.A. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1991, 228, 481–487.
- 65- Misra, A.N., Misra M., Singh, R. Nitric oxide: a ubiquitous signaling molecule with diverse role in plants. *African Journal of Plant Science*. 2011, 2, 57–74.
- 66- Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., Nims, R.W. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide regulating agent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 300, 115–123.
- 67- Besson-Bard, A., Astier, J., Rasul, S., Wawer, I., Dubreuil-Maurizi, C., Jeandroz, S., Wen-dehenne, D.. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science*. 2009, 177, 302–309.
- 68- Zhang, L.P., Mehta, S.K., Liu, Z.P., Yang, Z.M. Copper-induced proline synthesis associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*. 2008, 49, 411–419.
- 69- Sun, B.T., Jing, Y., Chen, K.M., Song, L.L., Chen, F.J., Zhang, L.X. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). *Journal of Plant Physiology*. 2007, 164, 536–543.
- 70- Crawford, N.M., Guo, F.Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science*. 2005, 10, 195–200.
- 71- Corpas, F.J., Palma, J.M., del Río, L.A., Barroso, J.B. Evidence supporting the existence of L-arginine dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist*. 2009, 184, 9–14.
- 72- Yamasaki, H., Sakihama, Yç, Takahashi, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Sciences*. 1999, 4, 128–129.

- 73-Yamasaki, H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. Philosophical Transactions of the Royal Society (B: Biological Sciences). 2000, 355, 1477-1488.
- 74- Shangguan, Z.P., Li, S.Q. Nitrogen Nutritional Physio- Ecology on Dryland Crop. Science Press. Beijing, Chinese, 2004.
- 75-Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 2002, 53, 103-110
- 76 – Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. Biochemistry and Molecular Biology in Plants, American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA, 2000,1–90.
- 77- Martin-Tanguy, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches), Plant Growth Regulation. 2001, 34, 135–148.
- 78- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. Botanica Acta. 1997, 110, 197–207.
- 79- Evans, P.T., Malmberg R.L. Do polyamines have roles in plant development?. Annual Review. 1989, 40, 235–269.
- 80- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, I.S., Scherer, G.F.E. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings, Plant Cell Physiology. 2006, 47, 346–354.
- 81- Kireççi, O.A. Bazı Sentetik Hormonların (Gibberellik Asit, Spermin, Spermidin, Putresin) Fesleğen (*Ocimum basilicum*) Bitkisinde Morfolojik Yapı ve Uçucu Yağ Kalitesine Etkisi. Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2006, 64 s. (Yüksek Lisans Tezi)
- 82- Kalac, P., Krausova, P. A. Review of Dietary Polyamines : Formation, Implications for Growth and Healthy and Occurrence in Foods. Food Chemistry. 2004, 90, 219-230.
- 83- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology. 2007, 24, 117–126.
- 84- Wi, S.J., Kim, W.T., Park, K.Y. Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. Plant Cell Reports. 2006, 25, 1111–1121.
- 85-Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid raintreated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science. 2000, 151, 5966.
- 86- Larher, F.R., Aziz, A., Gibon, Y., Trotel-Aziz, P., Sulpice, R., Bouchereau, A. An assessment of the physiological properties of the so-called compatible solutes using *in vitro* experiments with leaf discs. Plant Physiology and Biochemistry. 2003, 41, 657–666.

- 87- Verma, S., Mishra, S.N. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*. 2005, 162, 669–677.
- 88- Dean, J.V., Delaney, S.P. Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyl-transferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 2008, 132, 417–425.
- 89- Chai, Y.Y., Jiang, C.D., Shi, L., Shi, T.S., Gu, W.B. Effects of exogenous spermine on sweet sorghum during germination under salinity. *Biologia Plantarum*. 2010, 54, 145–148.
- 90- Cobbett, C.S. Phytochelatins and Their Role in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology*. 2000, 123, 825-832.
- 91- Clemens, S. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants. *Biochimie*. 2006, 88, 1707-1719.
- 92- Rauser, W.E. Phytochelatins and Related Peptides. Structure, Biosynthesis and Function. *Plant Physiology*. 1995, 109, 1141-1149.
- 93- Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., HernándezNavarro, A., Moreno-Sánchez, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29, 653-671.
- 94- Liang, G., Lia, X., Du, G., Chen, J. A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 350-355.
- 95- Xiang, C., Oliver, D. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998, 10, 1539- 1550.
- 96- Ramos, J., Clemente, M.R., Naya, L., Commer, P. Phytochelatin Synthases of the Model Legume *Lotus japonicus*. A Small Multigene Family With Different Responses to Cadmium and Alternatively Spiced Variants. *Plant Physiology*. 2007, 143, 1110-1118.
- 97- Mendoza-Cózatl, D.G., Butko, E., Springer, F. ve Harper, L. Identification of High Levels of Phytochelatins, Glutathione and Cadmium in the Phloem Sap of *Brassica napus*. A Role for Thiol-Peptides in the Long-Distance Transport of Cadmium and the Effect of Cadmium on Iron Translocation. *Plant Journal*. 2008, 54, 249-259.
- 98- Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. Phytochelatins: the principal heavymetal complexing peptides of higher plants. *Science*. 1985, 230, 674–676.
- 99- Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*. 2000, 122, 793–801.
- 100- Zhao, F.J., Wang, J.R., Barker, J.H.A., Schat, H., Bleeker, P.M., McGrath, S.P. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*. 2003, 159, 403–410.

- 101- Reina, S.V., Esteban, E., Goldsbrough, P. Arsenate-induced phytochelatin in white lupine: influence of phosphate status. *Physiologia Plantarum*. 2005, 124, 41–49.
- 102- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. Mechanisms to cope with arsenic or cd excess in plants. *current opinion in plant biology*. 2009, 12, 364-372.
- 103- Yadav, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 2010, 76, 167-179.
- 104- Singh, S., Lee, W., Dasilva, N.A., Mulchandani, A., Chen, W. Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 99, 333-340.
- 105- Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., Cobbett, C.S. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*. 1999, 11, 1153-1163.
- 106- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal*. 1999, 18, 3325-3333.
- 107- Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z., Ma, M. Coordinated responses of phytochelatin and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science*. 2005, 169, 1059-1065.
- 108- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C., Rausch, T. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*. 2003, 54, 1833- 1839.
- 109- De Knecht, J.A., Van Dillen, M., Koevoets, P., Schat, H., Verkleij, J., Ernst, W. Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris* (chain length distribution and sulfide incorporation). *Plant Physiology*. 1994, 104, 255-261.
- 110- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J & C. Presl). *Planta*. 2002, 214, 635-640.
- 111- Qin, F., Shan, X., Wei, B. Effects of low-molecular-weight organic acids and residence time on desorption of Cu, Cd and Pb from soils. *Chemosphere*. 2004, 57, 253–263.
- 112- Najeeb, U., Xu, L., Ali, S., Jilani, G., Gong, H.J., Shen, W.Q., Zhou, W.J. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 170, 1156–1163.
- 113- Van Hees, P.A.W., Jones, D.L., Jentschke, G., Godbold, D.L. Organic acid concentrations in soil solution: effects of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005, 37, 771-776.

- 114- Jones, D.L., Darrah, P.R., Kochian, L.V. Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant Soil*. 1996, 180, 57-66.
- 115- Landi, L., Valori, F., Ascher, J., Renella, G., Falchini, L., Nannipieri, P. Root exudate effects on the bacterial communities, CO₂ evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. *Soil Biol. Biochem.* 2006, 38, 509–516.
- 116- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*. 2001, 6, 273-278.
- 117- Neumann, G., Massoneau, A., Martinoia, E., Römheld, V. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in White lupin. *Planta*. 1999, 208, 373-382.
- 118- Jones, D.L. Organic acids in the rhizosphere e a critical review. *Plant and Soil*. 1998, 205, 25-44.
- 119- Cawthray, G.R. An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1011, 233–240.
- 120- Xu, R., Li, J., Ji, G. Effect of anions of low molecular weight organic acids on adsorption and desorption of aluminum by and from a kaolinite at different pH. *Soil Science*. 2003, 168, 39–44.
- 121- Wu, L.H., Luo, Y.M., Christie, P., Wong, M.H. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil. *Chemosphere*. 2003, 50, 819–822.
- 122- Collins, R.N. Separation of low-molecular mass organic acid–metal complexes by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1059, 1–12.
- 123- Liao, Y.C., Chang Chien, S.W., Wang, M.C., Shen, Y., Hung, P.L., Das, B. Effect of transpiration on Pb uptake by lettuce and on water soluble low molecular weight organic acids in rhizosphere. *Chemosphere*. 2006, 65, 343–351.
- 124- Albert, D.B., Martens, C.S. Determination of low molecular weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Marine Chemistry*. 1997, 56, 27–37.
- 125- Strobel, B.W.. Influence of vegetation on low-molecularweight carboxylic acids in soil solution–A review. *Geoderma*. 2001, 99, 169–198.
- 126- Xiao, M., Wu, F.C., Liao, H.Q. Vertical profiles of low molecular weight organic acids in sediment porewaters of six Chinese lakes. *Journal of Hydrology*. 2009, 365, 37–45.
- 127- <http://www.zmo.org.tr/> (TMMOB Ziraat Mühendsileri Odası,2015).
- 128- Söylemezoğlu, G., Demir, K., Inal, A., Gunes, A., Effect of silicon on antioxidant and stomatal response of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) rootstocks

grown in boron toxic, saline and boron toxic-saline soil. *Scientia Horticulturae*. 2009, 123, 240–246.

129- Kaya, C., Ashraf, M. Exogenous application of nitric oxide promotes growth and oxidative defense system in highly boron stressed tomato plants bearing fruit. *Scientia Horticulturae*. 2015, 185, 43–47.

130- Bastias, E., Alcaraz-Lopez, C., Bonilla, I., Martinez-Ballesta M.C., Bolanos, L., Carvajal, M. Interactions between salinity and boron toxicity in tomato plants involve apoplastic calcium. *Journal of Plant Physiology*. 2010, 167, 54–60.

131- Nable, R.O. Effects of boron toxicity amongst several barley wheat cultivars, a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant Soil*. 1988, 112, 45–52.

132- Groppa, M.D., Benavides, M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*. 2008, 34, 35–45.

133- Yamasaki, H., Cohen, M.F. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants. *Trends in Plant Science*. 2006, 11, 522–524.

134- Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Romero, L. Preliminary studies on the involvement of biosynthesis of cysteine and glutathione in the resistance to boron toxicity in sunflower plants. *Plant Science*. 2003, 165, 811–817.

135- Foyer, C.H., Noctor, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 2005, 17, 1866–1875.

136- Keltjens, W.G., Van Beusichem, M.L. Phytochelatins as biomarker for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium. *Plant Soil*. 1998, 203, 119–126.

137- Schat, H., Kalff, M.M.A. Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain?. *Plant Physiology*. 1992, 99, 1475–1480.

138- De Knecht, J.A., Van Baren, N., Ten Bookum, W.M., Wong Fong Sang, H.W., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Science*. 1995, 106, 9–18.

139- Sneller, F.E.C., Noordover, E.C.M. Ten Bookum, W.M., Schat, H., Bedaux, J.J.M., Verkleij, J.A.C. Quantitative relationship between phytochelatin accumulation and growth inhibition during prolonged exposure to cadmium in *Silene vulgaris*. *Ecotoxicology*. 1999, 8, 167–175.

140- Pawlik-Skowronska, B. Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*. *Environmental Pollution*. 2002, 119, 119–127.

141- Hoff, T., Truong, H.N., Caboche, M. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell and Environment*. 1994, 17, 489–506.

- 142- Crawford, N.M., Nitrate nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*. 1995, 7, 859–868.
- 143- MacKintosh, C. Meek. S.E.M. Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001, 58, 205–214.
- 144- Jones, T., Tucker, D.E., Ort, D.R., Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. *Plant Physiology*. 1998, 118, 149–158.
- 145- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.W. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology*. 1998, 117, 283–292.
- 146- Aftab T., Khan, M.M.A., Naeem, M., Idrees, M., Moinuddin., Teixeira da Silva, J.A., Ram, M. Exogenous nitric oxide donor protects *Artemisia annua* from oxidative stress generated by boron and aluminium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012, 80, 60–68.
- 147- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Publications*. 1938, 347.
- 148- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11. 1983, 591–592.
- 149- Masood, A., Shah, N.A., Zeeshan, M., Abraham, G. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *Environmental and Experimental Botany*. 2006, 58, 216-222.
- 150- Jana, S., Choudhuri, M. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquatic Botany*. 1981, 12, 345–354.
- 151- Bates, L., Waldren, R.P., Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973, 39, 205-207.
- 152- Heath, R.L., Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968, 125, 189-198.
- 153- Jaworski, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1971, 43, 1274-1279.
- 154- Beutler, E. *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. 3th Ed. Grune & Stratton. Orlando. 1984, 72-75, 105-106.
- 155- Mannervik, B. Guthenberg, C. Glutathione transferase (human plasenta). *Methods in Enzymology*. 1981, 77, 231-235.
- 156- Bevilacqua, A.E., Califano, A.N. Determination of organic acids in dairy products by highperformance liquid chromatography. *Journal of Food Science*. 1989, 54, 1076-1079.

- 157- Duan, J.J., Li, J., Guo, S.R., Kang, Y.Y. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances shortterm salinity tolerance, *Journal of Plant Physiology*. 2008, 165,1620-1635.
- 158- Yilmaz, O., Keser, S., Tuzcu, M., Guvenc, M., Cetintas, B., Irtegun, S., Tastan, H., Sahin, K. A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009, 8, 343-347.
- 159- Hawrylak-Nowaka, B., Dresler, S., Wójcik, M. Selenium affects physiological parameters and phytochelatins accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants grown under cadmium exposure. *Scientia Horticulturae*. 2014, 172, 10–18.
- 160- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*. 2006, 56, 54–62.
- 161- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A. 28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants. *Chemosphere*. 2011, 85 1574–1584.
- 162- Peixoto, P.H., Da Matta, F.M., Cambraia, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminium stress in two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*. 2002, 25, 821–832.
- 163- Ardic, M., Sekmen, A.H., Tokur, S., Ozdemir, F., Turkan, I. Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity. *Plant Biology*. 2009, 11, 328–338.
- 164- Wang, Y.S., Yang, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology*. 2005, 46, 1915–1923.
- 165- Hu, K.D., Hu, L.Y., Li, Y.H., Zhang, F.Q., Zhang, H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regulation*. 2007, 53, 173–183.
- 166- Esim, N., Atici, O. Nitric oxide alleviates boron toxicity by reducing oxidativedamage and growth inhibition in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Australian Journal of Crop Science*. 2013,7, 1085–1092.
- 167- Jabeen, N., Ahmad, R. Effect of foliar-applied boron and manganese on growthand biochemical activities in sunflower under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*. 2011, 43,1271–1282.
- 168- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 2002, 7, 405–410.
- 169- Ashraf, M., Ali, Q. Relative membrane permeability and activities of someantioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassicanaapus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 2008, 63, 266–273.

- 170- Shafiq, S., Akram, N.A., Ashraf, M., Arshad, A. Synergistic effects of drought and ascorbic acid on growth, mineral nutrients and oxidative defense system in canola (*Brassica napus* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014, 36, 1539–1553.
- 171- Zhang, X.W., Dong, Y.J., Kong, J., Wang, Q.H. Exogenous Nitric Oxide effect on physiological characteristics of a peanut cultivar growing on calcareous soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2014, 45, 1011–1024.
- 172- Lin, Y., Liu, Z., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress. *Scientia Horticulturae*. 2012, 142, 118–127.
- 173- Wendehenne, D., Gould, K., Lamotte, O., Durner, J., Vandelle, E., Lecourieux, D., Courtois, C., Barnavon, L., Bent'ejac, M., Pugin, A. NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*. 2005, 5, 1-35.
- 174- Beligni, M.V., Lamattina, L. Nitric oxide interferes with plant photooxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environment*. 2002, 25, 737–748.
- 175- Yu, C.C., Hung, K.T., Kao, C.H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2005, 162, 1319–1330.
- 176- Esfandiari, E., Shekari, F. The Effect of Salt Stress on Antioxidant Enzymes' Activity And Lipid Peroxidation on the Wheat Seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*. 2007, 35, 1.
- 177- Asada, K. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2000, 355, 1419-1431.
- 178- Vega, D. L., Fernandez, R.P., Mateo, M.C.M., Bustamante, J., Bustamante, A., Herrero, A.M., Munguira, E.B. Study of activity of glutathione-peroxidase, glutathione-transferase and glutathione reductase in renal transplants, *Transplantation Proceedings*. 2003, 35, 1346-1350.
- 179- Nepovim, A., Podlipna, R., Soudek, P., Schröder, P., Vanek, T. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere*. 2004, 57, 1007–1015.
- 180- Saleh, L., Plieth, C. Fingerprinting antioxidative activities in plants, *Plant Methods*. 2009, 5, 2.
- 181- Oufdou, K., Benidire, L., Lyubenova, L., Daoui, K., Fatemi, Z.E.A., Schröder, P. Enzymes of the glutathione-ascorbate cycle in leaves and roots of rhizobia-inoculated faba bean plants (*Vicia faba* L.) under salinity stress. *European Journal of Soil Biology*. 2014, 60 98-103.
- 182- Liu S., Yang, R., Pan, Y., Mingdong, M., Pan, J., Zhao, Y., Cheng, Q., Wu, M., Wang, M., Zhang, L., Nitric oxide contributes to minerals absorption, proton pumps and hormone equilibrium under cadmium excess in *Trifolium repens* L. *Plants. Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015, 119, 35–46.

- 183- Foyer, C.H., Halliwell, B. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role on ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976, 133, 21-25.
- 184- Kopyra, M., Gwozdz E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003. 41, 1011- 1017.
- 185- Veselov, A.P., Kurganova, L.N., Likhacheva, A.V., Sushkova, U.A. Possible regulation effect of lipid peroxidation on the H₂O₂-ATPase activity of the plasmalemma under stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2002,49, 385-389.
- 186- Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Naeem, M. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide*. 2012, 27, 210–218.
- 187- Chen, W., Cui, P., Sun, H., Guo, W., Chunwu, Y., Jin, H., Fang, B., Shi, D. Comparative effects of salt and alkali stresses on organic acid accumulation and ionic balance of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Industrial Crops and Products*. 2009, 30, 351–358.
- 188- Tatar E., Mihucz, V.G., Varga, A., Zaray, G., Cseh, E. Effect of lead, nickel and vanadium contamination on organic acid transport in xylem sap of cucumber. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1999. 75, 219–223.
- 189- Touraine, B., Astruc, S., *Chromatographia*. 1990, 30, 388.
- 190- White, M.C., Decker, A.M., Chaney, R.L. *Plant Physiology*. 1981, 67, 292.
- 191- Prima-Putra, D., Botton, B. J. *Plant Physiology*. 1998, 153, 670.
- 192- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G., Van Hees, P.A.W. Organic acid behavior in soils misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil*. 2003, 248, 31–41.
- 193- Yang, J.Y., Yang, X.E., He, Z.L., Li, T.Q., Shentu, J.L., Stoffella, P.J. Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils. *Environmental Pollution Journal*. 2006, 143, 9–15.
- 194- Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*. 2009, 176, 20–30.
- 195- Mucha, A.P., Almeida, C.M.R., Bordalo, A.A., Vasconcelos, M.T.S.D. LMWOA (low molecular weight organic acid) exudation by salt marsh plants: natural variation and response to Cu contamination. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 2010, 88, 63–70.
- 196- Nable, R.O., Paul, G. Mechanism and genetics of tolerance to boron toxicity in plants. *Current topics in plant biochemistry and physiology*. 1991, 10, 257–273.
- 197- Paull, J.G., Nable, R.O., Lake, A.W.H., Materne, M.A., Rathjen, A.J. Response of annual medics (*Medicago* spp) and field peas (*Pisum sativum*) to high concentration of boron: genetic variation and the mechanism of tolerance. *Austr. J. Agri. Res.* 1992, 43, 203–213.

- 198- Nable, R.O., Lance, R.C.M., Cartwright, B. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. *Annals of Botany*. 1990, 66, 83–90.
- 199- Huang, C., Graham, R.D. Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at cellular level. *Plant Soil*. 1990, 126, 295–300.
- 200- Qiao, W., Fan, L.M. Nitric oxide signalling in plant responses to abiotic stresses, *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008, 50, 1238–1246.
- 201- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival, *Planta*. 2008, 228, 367–381.
- 202- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I., Roubelakis-Angelakis, K.A.. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell*. 2008, 20, 1708–1724.
- 203- Meyer A.J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology*. 2008, 165, 1390-1403.
- 204- Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988, 27, 969-978.
- 205- Steffens, J.C. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 1990, 41, 553-575.
- 206- Ferrario-Mery, S., Valadier, M.H., Foyer, C.H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiol*. 1998, 117, 293-302.
- 207- Athwal, G.S., Huber, J.L., Huber, S.C. Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. *Plant Cell Physiol*. 1998, 39, 1065-1072.
- 208- Chen, Q., Kan, Q., Wang, P., Yu, W., Yu, Y., Zhao, Y., Yu, Y., Li, K., Chen, L. Phosphorylation and interaction with the 14-3-3 protein of the plasma membrane h⁺-atpase are involved in the regulation of magnesium-mediated increases in aluminum-induced citrate exudation in broad bean (*vicia faba*. L.). *Plant Cell Physiol*. 2015, 56, 1144-1153.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hafize DİLEK TEPE
Doğum Yeri ve Yılı : Manisa, 1983
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : hafize.dilek@cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise: Manisa Lisesi, 2001
Lisans: Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2006
Yüksek Lisans: Celal Bayar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü, 2008

Mesleki Deneyim

Celal Bayar Hastanesinde tıbbi cihaz sorumlusu, 2002-2004.

Celal Bayar Üniversitesi-Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEFAM), 2011-..... (Halen)

Yayımları

1- Dilek Tepe, H., Aydemir, T. Protective effects of Ca²⁺ against NaCl induced salt stress in two lentil (*Lens culinaris*) cultivars. African Journal of Agricultural Research. 2015, 23,2389-2398.

2- Dilek Tepe, H., Aydemir, T. Investigation of the Changes in Low Molecular Weight Organic Acids and other Physiological Parameters by Nitric Oxide Application in two Wheat Cultivars Exposed to Boron Stress. Journal of Plant Nutrition. 2016. (accepted).

3- Dilek Tepe, H., Aydemir, T. Application of Exogenous Sodium Nitroprussid Alleviates Boron Toxicity in Wheat Seedlings: Investigation of Thiol Compounds, Macro/micronutrient and Polyamine Contents. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 2016. (accepted).

Araştırma Projeleri

1- Tuz Stresi Altındaki Yeşil ve Kırmızı Mercimek Bitkisinde Bazı Fizyolojik ve Enzimatik Parametreler Üzerine Farklı Konsantrasyonlarda İlave Edilen Kalsiyum ve Borun Etkisinin İncelenmesi ve Karşılaştırılması. C.B.Ü. BAP Projesi Fen Edebiyat Fakültesi / Kimya Bölümü. Proje no: 2008-085.

2- Bor stresine maruz kalmış buğday bitkisine eksojen nitrik oksit ilavesinin fizyolojik etkilerinin incelenmesi. C.B.Ü. BAP Projesi. Fen Edebiyat Fakültesi/Kimya Bölümü. Proje no: 2013-094.

3- Manisa'daki Tarımsal Bitkilerin Etken Maddelerinin Karakterizasyonu ve Tarım Ürünlerindeki Sağlığa Zararlı Kimyasalları Ölçmenin Standardizasyonu. . C.B.Ü. BAP Alt Yapı Projesi. DEFAM. Proje no: 2014-026.