

BOR'UN BUĞDAY TOHUMLARININ ÇİMLENME
SÜRECİNE BAĞLI OLARAK EMBRİYO VE
ENDOSPERM DOKULARINDAKİ POLİFENOL
OKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİSİ

Berna MECİT

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2008

**BOR'UN BUĞDAY TOHUMLARININ ÇİMLENME SÜRECİNE BAĞLI OLARAK
EMBRIYO VE ENDOSPERM DOKULARINDAKİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNE ETKİSİ**

Berna MECİT

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Hülya ÖLÇER

Temmuz-2008

KABUL ve ONAY SAYFASI

Berna MECİT'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Borun buğday tohumlarının çimlenme sürecine bağlı olarak embriyo ve endosperm dokularındaki polifenol oksidaz enzim aktivitelerine etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

...../...../.....

Üye :

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. M. Sabri ÖZYURT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**BOR'UN BUĞDAY TOHUMLARININ ÇİMLENME SÜRECİNE BAĞLI OLARAK
EMBRYO VE ENDOSPERM DOKULARINDAKİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNE ETKİSİ**

Berna MECİT

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hülya ÖLÇER

ÖZET

Bor'un (B) iki buğday varyetesinde (*Triticum aestivum* L. cv. Kıraç-66 ve cv. Sultan-95) çimlenme oranı ve embriyo ve endosperm dokularındaki polifenol oksidaz enzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Buğday tohumlarının çimlenme oranı 50 mM' a kadar olan B konsantrasyonlarından etkilenmemiş, 100 ve 150 mM B' da ise düşmüştür. Saf su ve düşük B konsantrasyonları (0.1 ve 50 mM) polifenol oksidaz aktivitelerini embriyo ve endosperm dokularında çimlenmenin başından itibaren Kıraç-66 da 6. saat, Sultan-95 de ise 9. saate kadar artırmış fakat yüksek B seviyeleri (100 ve 150 mM) ise düşürmüştür. Her iki buğday varyetesinde de embriyo ve endosperm dokularında *o*-difenolik substratlarla (katekol, dopa ve kafeik asit) belirlenen polifenol oksidaz aktivitelerinin monofenolik substratla (tirozin) belirlenen aktiviteden yüksek olduğu bulunmuştur.

Sultan-95 varyetesinde difenolik substratlarla belirlenen polifenol oksidaz aktivitesi embriyoda endospermden yüksek olup dopayı okside eden enzim diğer substratlardan daha yüksek aktivite göstermiştir. Monofenolik substratla belirlenen polifenol oksidaz aktivitesi ise endospermde embriyodan daha yüksektir. Diğer taraftan Kıraç-66 varyetesinde dopa ve kafeik asidi okside eden polifenol oksidaz enzimi hem embriyo hem de endosperm dokularında yüksek aktivite göstermiştir. Benzer şekilde monofenolik substratla belirlenen polifenol oksidaz aktivitesi ise embriyo ve endosperm dokularında benzer orandadır. Sonuç olarak yüksek B konsantrasyonlarının çimlenme oranını ve tohum dokularındaki polifenol oksidaz aktivitesini düşürdüğü, ve Kıraç-66 varyetesinin yüksek B' a karşı Sultan-95' den daha toleranslı olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bor, buğday, çimlenme, embriyo, endosperm, polifenol oksidaz

THE EFFECTS OF BORON ON POLIPHENOL OXIDASE ACTIVITIES IN EMBRYO AND ENDOSPERM TISSUES OF WHEAT SEEDS DURING GERMINATION

Berna MECİT

Biology Department, MSc thesis, 2008

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya ÖLÇER

SUMMARY

The effects of boron (B) on the germination rate and polyphenol oxidase activities in embryo and endosperm tissues of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L. cv. Kıraç-66 and cv. Sultan-95) were investigated. The germination percentage of both seeds was not effected by boron concentrations up to 50 mM, and decreased by 100 and 150 mM. Distilled water and lower B concentrations (0.1 and 50 mM) increased polyphenol oxidase activities at the beginning of germination up to 6 hours in Kıraç-66 and 9 hours in Sultan-95 whereas its excess levels (100 and 150 mM) decreased polyphenol oxidase activities in embryos and endosperm during germination. In the both cultivars, polyphenol oxidase activities with *o*-diphenolic substrates (catechol, dopa and caffeic acid) were found to be higher than with a monophenolic substrate (tyrosine) in both embryos and endosperms.

In Sultan-95 cultivar, polyphenol oxidase activities with *o*-diphenolic substrates were higher in embryo than endosperm, and dopa oxidizing polyphenol oxidase was found to show more activity than other substrates. Polyphenol oxidase activity with monophenolic substrate was higher in endosperm than embryo. On the other hand, in Kıraç-66 cultivar dopa and caffeic acid oxidizing polyphenol oxidase activities were high both in the embryo and endosperm tissues. In conclusion, high concentrations of boron decreases germination rate and polyphenol oxidase activities in seed tissues, and Kıraç-66 cultivar was more tolerant to high boron than Sultan-95 cultivar.

Key Words: Boron, embryo, endosperm, germination, polyphenol oxidase, wheat

TEŐEKKÜR

Bu çalıőmanın yürütülmesinde büyük emeği geçen, hiçbir zaman ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Hülya ÖLÇER'e Őukranlarımı sunarım.

Çalıőmalarım sırasında desteğinden ve yayınlarından yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. İsmail KACAALIŐKAN'a ve tüm bölüm elemanlarına teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalıőmalarım esnasında maddi manevi her türlü desteğinden dolayı eőime ve aileme teőekkür ederim.

Berna MECİT

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ŞEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkiler ve Bor.....	1
1.1.1. Bitkide borun dağılımı.....	3
1.1.2. Bitkilerde bor eksikliği.....	3
1.1.3. Bitkilerde bor toksikliği.....	5
1.1.3.1. Bitkiler ve bor toksikliğine duyarlılıkları.....	6
1.2. Borun Bitki Metabolizmasındaki Önemi.....	7
1.3. Bor ve Fenol Metabolizması.....	8
1.3.1. Polifenol oksidazlar.....	10
1.3.1.1. Polifenol oksidaz genleri ve protein molekül ağırlığı.....	10
1.3.1.2. Polifenol oksidazların hücrede bulunduğu yerler.....	12
1.3.1.3. Farklı bitki cinslerinde PFO' ların varlığı.....	12
1.3.1.4. Kararma reaksiyonları ve PFO' lar.....	13
1.3.1.5. Bitkilerin patojen, herbivor veya strese dayanıklılığında PFO' ların rolü.....	15
1.4. Amaç.....	17
2. MATERYAL VE METOD.....	18
2.1. Çalışmada Kullanılan Tohumların Özellikleri.....	18
2.2. Çalışmada Kullanılan Kültür Çözeltileri.....	19
2.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
2.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisinin Hazırlanması.....	19
2.3.2. NaOH Çözeltisinin Hazırlanışı.....	19
2.3.3. Katekol Substratının Hazırlanışı.....	19
2.3.4. Dopa Substratının Hazırlanışı.....	19
2.3.5. Kafeik asit Substratının Hazırlanışı.....	19
2.3.6. Tirozin Substratının Hazırlanışı.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4. Tohum Çimlendirme Yöntemi.....	20
2.5. Kök ve Gövde Analizleri.....	20
2.6. Enzim Özütünün Hazırlanması ve PFO Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	20
2.7. İstatistiki Ölçümler.....	21
3.SONUÇLAR.....	22
3.1. Farklı B Konsantrasyonunun Buğday Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri.	22
3.2. Farklı B Konsantrasyonlarının Buğday Tohumlarının Fide Gelişimi Üzerine Etkileri	25
3.3. Borun Buğday Tohumlarının Çimlenmesi Sırasında Embriyo ve Endospermdeki PFO Aktivitelerine Etkisi.....	30
4.TARTIŞMA.....	39
KAYNAKLAR.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.3.1. Borun fenol metabolizması üzerine etkileri.....	9
1.3.1.1. Fenollerin difenollere dönüşümü.....	11
1.3.1.2. Kinonların oluşumunu sağlayan difenol oksidaz reaksiyonu.....	11
3.1.1. Farklı B uygulamalarının buğday tohumlarında %50 çimlenme saatleri üzerine etkileri.....	24
3.1.2. Farklı B uygulamalarının buğday tohumlarında zamana bağlı çimlenme ve hipokotil gelişimi üzerine etkileri.....	25
3.3.1. Bor uygulamalarına tabii tutulan Kıraç-66 buğday tohumlarının çimlenme sürecinde embriyo ve endosperm dokularındaki PPO aktivitesinin zamana göre değişimi.....	37
3.3.2. Bor uygulamalarına tabii tutulan Sultan-95 buğday tohumlarının çimlenme sürecinde embriyo ve endosperm dokularındaki PPO aktivitesinin zamana göre değişimi.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Tarımda Yaygın Olarak Kullanılan Boratlar.....	2
1.1.1. Çeşitli bitki gruplarında bor içeriği.....	2
1.1.2. Bor eksikliğine en hassas ve B uygulamasına en iyi cevap veren türler.....	3
3.1.1. Kıraç-66 tohumlarının çimlenmesi üzerinde etkili olan borik asit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	22
3.1.2. Sultan-95 tohumlarının çimlenmesi üzerinde etkili olan borik asit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	23
3.2.1. Farklı B uygulamalarının Kıraç-66 tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine etkileri.....	27
3.2.2. Farklı B uygulamalarının Sultan-95 tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine Etkileri.....	28
3.2.3. Farklı B uygulamalarının Kıraç-66 tohumlarında zaman bağlı olarak tek ve Çoklu kök oluşturma yüzdesi üzerine etkileri.....	29
3.2.4. Farklı B uygulamalarının Sultan-95 tohumlarında zaman bağlı olarak tek ve çoklu kök oluşturma yüzdesi üzerine etkileri.....	31

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Buğday tohumunun şematize edilmiş yapısı.....	18
3.1.1. Kıraç-66 tohumlarının 3., 6., 9., 12.,24.,48.,72. ve 96. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi.....	32-33
3.1.2. Sultan-95 tohumlarının 3., 6., 9., 12.,24.,48.,72. ve 96. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi.....	34-35

1.GİRİŞ

Bor (B) oldukça ilginç bir element olup doğada tek başına bulunmaz. Oksijenle bağ yapmaya yatkın olduğundan pek çok değişik oksijen bileşimi oluşturur. Basitten karmaşığa, sonsuz sayıda değişik molekül yapılarına sahip olabilen bor-oksijen bileşimlerine “borat” denilmektedir. Borun bu özelliğinden dolayı doğada yaklaşık olarak 230 değişik B minerali bulunduğu bilinmektedir [1, 2].

Dünyada en büyük borat yatakları, kimyasal çökeltme sonucu gölsel ortamlarda meydana gelmiştir. Borat oluşumlarına, gölsel ortamlar dışında deniz ortamında oluşan tuz yatakları içinde de rastlanır. Bundan başka B mineralleri, yeraltındaki magmanın yeryüzüne doğru yükselirken kristalleşmesi sonucu da oluşabilir. Kirletilmiş sular, B madenlerinden çıkan artıklar ve kimyasal atıklar da topraktaki B’ un en yaygın kaynakları arasındadır [2].

Günümüzde B’ un çok değişik kullanım alanları vardır. Bunlardan bazıları, cam sanayi, seramik sanayi, temizleme ve beyazlatma sanayi, metalurji, nükleer uygulamalar, fotoğrafçılık, boya ve kağıt endüstrisi, tekstil kimyasalları, deri giysiler, kozmetik sanayi, böcek öldürücüler ve tarımdır [2,3]. Tarımda inorganik gübre olarak kullanılacak B formlarına örnekler çizelge 1.1 de verilmiş olup bunlardan borik asit ve boraks toprakta en kolay çözünebilen ve bitkiler tarafından kolaylıkla alınabilen formlardır. Bununla beraber suda borik asit ve boraks’tan çok daha hızlı çözünebilen sulubor ise genellikle B ‘un direk olarak bitki yapraklarına uygulanan formudur [4].

1.1. Bitkiler ve Bor

Bor tohumlu bitkiler, diatomeler ve bazı yeşil alg türleri için gerekli bir mikro element olmasına karşın fungi ve bakteriler tarafından ihtiyaç duyulmayan bir mikro elementtir ve bitkilerin B ihtiyacı molar konsantrasyon temel alındığında diğer mikro elementlerden en fazla olanıdır [5].

Bitkiler arasında B isteği açısından oldukça büyük farklılıklar vardır. Bitkiler B ihtiyaçları temel alınarak gruplandırıldığında; 1) Gramineler; B ihtiyacı en az, 2) Diğer monokotiledon ve dikotiledon bitkiler; orta derecede; 3) Lateks üreten bitkiler; en yüksek B ihtiyacı olan bitkiler olarak 3 gruba ayrılabilir. Bu gruplara ait bazı bitki örnekleri çizelge 1.1.1.’de verilmiştir. Diğer bir sınıflandırmada ise, dikotiledon ve monokotiledonlar büyüme evreleri ve B eksikliği semptomlarının görüldüğü yerler temel alınarak gruplandırılmıştır. Bor eksikliğinde bazı dikotiledonlarda (ayçiçeği, domates, bal kabağı, yonca) kök büyümesinin inhibisyonu ve meristematik bölgenin dejenerasyonu ilk görülen etkiler olmasına rağmen diğer

Çizelge 1.1. Tarımda Yaygın Olarak Kullanılan Boratlar [3]

			B (%)
Rafine Ürünler	$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sodyum tetraborat pentahidrat	14.9
	$\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Solubor	20.8
	$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Sodyum tetraborat dekahidrat	11.3
	NaB_4O_7	Sodyum tetraborat	21.4
	H_3BO_3	Borik asit	17.5
Maden Cevheri	$2\text{CaO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Kolemanit	Değişken
	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{CaO} \cdot 5\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	Üleksit	Değişken
	$2\text{CaO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Datolit	Değişken
	$\text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 3\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Hidroborasit	Değişken
	$2\text{MgO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Askarit	Değişken

bazı dikotiledonlarda (bezelye, soya fasulyesi, acı bakla) ise büyüme noktalarında görülen bu dejenerasyon daha sonra ortaya çıkar. Ortamda B' un bulunmadığı koşullarda bazı monokotiledonlar (mısır, sorgum, darı, soğan) dikotiledonlara göre normal kök büyümesi ve vejetatif büyümeyi daha uzun bir süre devam ettirebilirler. Buğday, arpa, yulaf ve çavdar gibi monokotiledonlar B eksikliği semptomlarını sadece reproduktif organların gelişimi sırasında gösterirler [6, 7].

Dikotiledonlar arasında B eksikliğine en duyarlı familyaların Cruciferae ve Chenopodiaceae olduğu bildirilmiştir. Örneğin Cruciferae'den *Brassica sp.* ve *Raphanus sp.* ile Chenopodiaceae'den *Beta sp.*'nin B eksikliğine en duyarlı türler olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Bor eksikliğine en hassas ve B uygulamasına en iyi cevabı veren türler çizelge 1.1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.1.1. Çeşitli bitki gruplarında bor içeriği (B, ppm kuru ağırlık) [7].

Monokotiller		Dikotiller		Latekse sahip Dikotiller	
Arpa	2.3	Bezelye	22	Karahindiba	80
Buğday	3.3	Pancar	49	Sütleşen	93
Mısır	5.0	Marul	70	Haşhaş	94

Çizelge 1.1.2. Bor eksikliğine en hassas ve B uygulamasına en iyi cevap veren türler [3].

Bitki Türü	Bitki Türü	Bitki Türü	Bitki Türü
<i>Apium graveolens</i> var. <i>Dulce</i>	Kereviz	<i>Eucalyptus</i> sp.	Ökalyptus
<i>Arachis hypogaea</i>	Yerfıstığı	<i>Gossypium</i> sp.	Pamuk
<i>Beta vulgaris</i>	Şeker pancarı	<i>Helianthus annuus</i>	Ayçiçeği
<i>Brassica</i> sp.	Brasica	<i>Malus domestica</i>	Elma
<i>Brassica rutabaga</i>	Turp	<i>Medicago sativa</i>	Yonca
<i>Coffea</i> sp.	Kahve	<i>Olea europaea</i>	Zeytin
<i>Daucus carota</i>	Havuç	<i>Pinus</i> sp.	Çam
<i>Elaeis guineensis</i>	Hurma	<i>Vitis vinifera</i>	Asma

1.1.1. Bitkide borun dağılımı

Bor bitkilerin değişik organları içerisinde en fazla yapraklar ve üreme organlarında, en az da kök, meyve ve tohumlarda bulunur [8, 9]. *Citrus*'da B' un en fazla bazal yapraklarda en az ise odun bölgesinde bulunduğu tespit edilmiştir (bazal yaprak > üst yaprak > kabuk > kök > gövde > odun) [8]. Benzer şekilde pamukta [9], buğday [10] ve fıstık [11] yapılan diğer çalışmalar sonucunda da B' un en fazla yapraklarda bulunduğu ve yaprağın bitkinin diğer kısımlarına göre en duyarlı bölge olduğu tespit edilmiştir.

Bununla beraber tek bir yaprak ayasında bile B miktarı bakımından farklılık vardır. Örneğin arpada yaprak tabanından ucuna doğru B miktarının gittikçe arttığı, yaprak tabanındaki B miktarı 0.75 mg g^{-1} iken yaprak ucunda ise bu değer 23.5 mg g^{-1} 'a yükseldiği bulunmuştur [12].

1.1.2. Bitkilerde bor eksikliği

Bor eksikliği bitkilerde metabolik aktif dokular üzerinde belirgin bir şekilde görülmektedir. Bitkilerde en aktif dokuların yerleri farklılık gösterdiği için B eksikliği belirtileri de bitkiden bitkiye değişik olmaktadır. Bor eksikliğini kesin olarak bilinemediği çok önceleri, bitkilerde B eksikliği ile ortaya çıkan belirtiler bir tür hastalık olarak kabul edilmiştir. Bor eksikliğinde bitkilerde büyüme uçları ölmekte, çiçeklenme önemli ölçüde gerilemekte, ksilem boruları içerisinde taşıma düzensiz olmakta ve özellikle, floem borularını oluşturan hücrelerin duvarları kırılmakta ve renklerini yitirmektedir [13].

Bitkilerde bor eksikliğinde, kök gelişmeleri enine ve boyuna büyük ölçüde geriler. Köklerde genel sararma ile birlikte ana kökler zarar görür ve kökler olağan şekillerini yitirirler. Yumru köklerde de çeşitli isimlerle tanımlanan düzensizlikler ortaya çıkar [13].

Bitkilerde B immobildir ve bitkinin bir organından ötekine taşınmaz. B eksiliği belirtileri ilkbahar ve sonbahar aylarına göre yaz aylarında daha fazla görülür. Bu durum, sıcaklık ve büyüme durumundan daha öncelikle gün uzunluğu ve başka bir değişle ışıklandırma süresinin uzun yada kısa olması ile açıklanmıştır. Kabuk çatlaması, zamk akıtma, sürgünlerin ölmeleri, çiçek ve meyvelerde onormal durumların ortaya çıkması da B eksikliği ile ilgilidir. Şeker pancarında görülen “Öz çürüklüğü”, turplarda görülen “Esmer öz”, karnabaharlarda görülen “İçi boş gövde”, kerevizde görülen “Çatlak gövde”, elmalarda görülen “Mantarlaşmış çekirdek evi”, narenciyelerde görülen “Katı meyve” ve tütünde “Tepe çürümesi” hep B eksikliği ile ilgili olarak ortaya çıkan belirtilerdir [13].

Bor yaşlı bitki bölümlerinden genç bölümlere taşınmadığı için ilk belirtiler büyüme noktalarında olur. Örneğin; gövde uçları, çiçek tomurcukları, tepe tomurcukları gibi. Bor eksikliğiyle ya büyüyen uç dokularda çökme olur veya gövdede kısalmalar gözlenir. Rozet gövde bitkinin bükülmesi, büyüyen uçların kıvrılması ve çok genç yapraklarda şekil bozulması görülür. Çoğu durumlarda (domatesde) apikal meristematik dokudaki B eksikliği hücre boyutu genişlemesine ve doku parçalanmasına neden olur [14].

Hudak [15] B eksik besin solüsyonun 72 saat sonra *Vicia faba* kök uçlarında mitoz bölünmeyi inhibe ettiğini bulmuştur. 10 mg B/l solüsyonunda optimum hücre bölünmesinin gerçekleştiğini ve kök uçlarının uzadığını tespit etmiş fakat 50 mg B/l solüsyonun 24 saat sonrasında mitoz bölünmeyi azalttığını bulmuştur.

Yapılan çalışmalar; B'un birçok bitki türünde polisakkarit hücre duvarına sıkıca bağlandığını göstermiştir. Bor eksikliğinin hücre duvarı morfolojisinde çeşitli değişikliklere yol açması B'un hücre duvarının büyümesinde kritik bir rolü olduğu görüşünü desteklemektedir. Bor, bu etkisini pektin parçalarının kompleksleşmesini sağlayarak göstermektedir [16]. Kırk bitki türü üzerinde yapılan çalışma sonucunda yüksek pektin içeriğinin hücre duvarı oluşturmak için daha fazla B' a ihtiyaç duyduğunu veya pektinin B kompleksiyle birleşerek sıkı bir yapı kazandığı, B miktarı azaldığı zaman diğer önemli fonksiyonlarda azalma olduğu görülmüştür [17].

1.1.3. Bitkilerde bor toksikliği

Bor toksitesinde en önemli kaynak sulama suyudur. Endüstriyel kimyasallar ve yüzeysel madenciliğinin atıkları da önemlidir. Çürümüş organik madde içeren gübrelerin uygulanması, toprak pH'sını arttırmak amacıyla yüksek oranda B uygulanması yüksek B konsantrasyonlarının meydana gelmesine sebep olmaktadır [18]. Ayrıca B'un yüksek konsantrasyonları doğal olarak yer altı sularında ve toprakta da bulunabilmektedir [19].

Bitkiler çok az miktarda B' a ihtiyaç gösterirler. Genellikle monokotiledon bitkilerin bor ihtiyacı, dikotiledon bitkilerin B ihtiyacından daha azdır. Bitkilerin büyük bir bölümünde B toksitesi zararı, 100-1000 mg / kg B mevcudiyetinde ortaya çıkarken, monokotillerden *Triticum spp.* ve *Hordeum vulgare L.*'de B zararı 50 mg / kg B düzeyinde bile görülebilmektedir [20]. İhtiyaç duyulan B'un çok azda olsa fazlası, bitki gelişmesi üzerine olumsuz etki yapmakta ve gelişmeyi durdurmaktadır. Bor toksitesinin buğdayda özellikle bitki boyunun uzamasını ve yeşil aksam gelişmesini durduran, büyümeyi geciktiren [21] ve kök gelişimini azaltan [22] bir problem olduğu da çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir.

Shopova ve arkadaşları [23] borun topraktaki 16, 24 ve 32 mg/kg konsantrasyonlarının *Papever somniferum* bitkisinde bitki gelişiminin azalmasına, yaprakların sararmasına, çiçek açma zamanının gecikmesine, kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme sıklığının azalmasına ve mayoz bölünme sırasında anormalliklere neden olduğunu belirlemişlerdir.

Kluge ve Podlesak 1985 yılında yapmış oldukları çalışmada; B fazlalığının, yapraklarda birikerek nekrozlara neden olduğunu ve yaprak kuru ağırlığındaki B miktarının 60-80 mg/kg'a yaklaştığını belirtmişlerdir [24].

Sage ve arkadaşları *Streptanthus morrisonii* bitkisini B' un 0, 20, 60, 240, 650, 1200 ve 2400 µmol/l konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. 240 ve 650 µmol/l konsantrasyonlarının hafif toksite semptomları meydana getirdiklerini, 1200 ve 2400 µmol/l konsantrasyonlarının ise büyük ölçüde yaprak kaybı gibi ciddi toksite semptomları meydana getirdiklerini bulmuşlardır [25].

Marschner tarafından da belirtildiği gibi B birikimi, bitkinin yaşlı kısımlarında genç kısımlarına göre daha fazladır [26]. Dolayısıyla B toksitesine bağlı ilk belirtiler, yaşlı yapraklarda ortaya çıkmaktadır [20]. Bor toksitesinin ilk görünür belirtilerini yapraklar göstermekte ve yaprak uçlarında sararma ile başlayan, yaprak kenarları boyunca ilerleyen ve sonra yaprak ayasına yayılan klorozis şeklinde görülmektedir. Bunu klorotik dokuların nekrozu izlemekte, yaprak apsisiyonu ile sonuçlanmaktadır [27]. Böylece B toksitesi bitkilerde verimlilik kaybına neden olabilmektedir. Bor toksitesinden ciddi olarak etkilenen çam ağaçlarında

nekrozis en fazla sürgünlerin bitiminin yanlarındaki iğne yapraklarda ve ağaçların yukarı yarısında görülür [26]. Yaprakta B toksitesi sonucu meydana gelen toksite semptomları hakkında pek çok literatür olduğu halde B' un bitkiler için hangi konsantrasyonun toksik olduğu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Bor toksitesinin yaygın görülen semptomları kuru madde kaybı, kök uzamasının engellenmesi, meyve çürümesi, yapraklarda öncelikle uç ve kenarlarda başlayan kahverengi lekeler ile klorozla başlayıp nekrozla devam eden bozulmalar [26], kabuk nekrozları ve kambiyum ölümüne bağlı olarak oluşan gövde ölümü, yaşlı yaprakların yanık bir görünüm alıp erken dökülmesidir [17].

1.1.3.1. Bitkiler ve bor toksikliğine duyarlılıkları

Günümüzde yapılan çalışmalarda bitki türleri arasında olduğu gibi aynı türün çeşitleri arasında da B toksitesine duyarlılıkta büyük farklılıkların olduğu ve bu farklılıkların nedeninin bitkilerin B toksitesine aynı derecede fizyolojik ve morfolojik olarak etkilenmemesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir [26]. Paul ve arkadaşları tarafından kritik toksite düzeyinin; buğday genotiplerinde 100-270 mg kg⁻¹, mısırdaki 100 mg kg⁻¹, salatalıkta 400 mg kg⁻¹ ve kabakta 1000 mg kg⁻¹ olarak ifade edilmektedir [21].

Bitkiler toksik B konsantrasyonlarına farklı tepkiler verirler. Nitekim Paul ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma, B toksitesine direnç gösteren buğday çeşitlerinin, 150 mg kg⁻¹ B uygulanan topraklarda yetiştirildiklerinde üründe önemli bir azalma görmeksizin gelişirken; duyarlı çeşitlerin 25 mg kg⁻¹ B uygulamasında dahi kuru madde ve ürün veriminde önemli oranda azalma gösterdiği saptanmıştır. Aynı denemede buğday çeşitleri B toksitesi semptomları açısından da önemli farklılıklar göstermiş ve B toksitesi koşullarında dayanıklı çeşitlerde en az semptom ortaya çıkarken, duyarlı çeşitlerde şiddetli toksite semptomlarıyla birlikte bitki gelişiminin durduğu gözlenmiştir. Toprağa artan miktarda B ilavesi başlanma öncesi dokuların B miktarında doğrusal bir artışa neden olurken, yüksek B miktarına en fazla tolerans gösteren çeşitlerin her B uygulamasında en düşük düzeyde B içerdiği, B miktarının duyarlı olan çeşitlerinkine oranla yarısı kadar olduğu belirlenmiştir [21].

Paul ve arkadaşları tarla bezelyesi ve tek yıllık yonca türleri için yüksek B konsantrasyonuna tolerans mekanizmasını incelemişlerdir. Kök ve gövdenin toleransında, B alınmaması şeklinde bir tolerans mekanizmasının oluştuğunu ifade etmişlerdir [28].

Köklerdeki B miktarı üzerine çok az bilgi olduğu için, B' a toleranslı çeşitlerde (tüm bitki aksamında) B birikiminin azalması ile sonuçlanan B' un absorpsiyonundaki engellenme mekanizmasının tam olarak çalışıp çalışmadığı netlik kazanamamıştır. Bununla birlikte, hem

yeşil aksam hem de kökün birlikte değerlendirdiği su kültürü denemelerinde B alımını sınırlayan mekanizmanın çok sayıda bitki türü için çalıştığı gösterilmiştir. Örneğin buğdayın, arpanın [29], bezelyenin ve yoncanın [28] B toksitesine dayanıklı çeşitleri duyarlı çeşitlerine göre hem kökte hem de yeşil aksamalarında daha düşük B miktarına sahip olmuşlardır. Bor toksitesine dayanıklılıkta söz konusu çeşitlerin büyük bir kısmı yüksek B konsantrasyonu içeren su kültürü, sera ve tarla koşullarında yapılan çalışmalarda benzer gelişimini göstermişlerdir ve tüm büyüme ortamlarında dayanıklı çeşitlerde B absorpsiyonunu sınırladığı gösterilmiştir [19].

1.2. Borun Bitki Metabolizmasındaki Önemi

Bor bitkiler için gerekli olan esas mikro besin elementlerinden birisidir. Pek çok vasküler bitki için gerekli bir mikro besin elementi olduğu da kanıtlanmıştır. Borun, birçok bitki çeşidinde yapısal, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda yer aldığı bilinmektedir. Borun şeker taşınımı, hücre çeperi sentezi, ligninleşme, hücre çeperi yapısı, karbonhidrat metabolizması, RNA metabolizması, solunum, IAA metabolizması, fenol metabolizması gibi pek çok metabolik olayda rol aldığı ileri sürülmektedir. Ancak yüksek B konsantrasyonlarında B toksite ve toleransının fizyolojik metabolizmasının çok iyi anlaşamadığı da ifade edilmektedir [26].

Borun diol ve polioller ile kompleks oluşturma kapasitesi yüksektir. Bu kompleksler şeker ve şeker türevleri (şeker alkoller ve üronik asitler gibi) özellikle de mannitol, mannan ve polimannurik asit bileşiklerinin oluşumu için gerekmektedir. Bu bileşikler hücre çeperindeki hemiselülozun bileşenleridir. Çift çeneklilerde; lignin biyosentezinin önemli yapıtaşlarından olan kafeik asit ve hidrosiferulik asit gibi bazı *o*-difenollerde cis-diol komplekslerini oluşturabilmektedir [26].

Plazma membranının dayanıklılığı ve fonksiyonunda B' un önemli rollere sahip olduğu fakat tonoplast veya kloroplast zarı gibi membranları etkilemediği hususunda fazla miktarda literatür bulunmaktadır. Membran potansiyelinin oluşumu ve kurulması için ortamda B'un bulunmasının gerekli olduğu belirtilmektedir [3].

Bor, hücre bölünmesinden çok hücre büyümesi için gereklidir. Kök uzaması, hücre çeperindeki karşılıklı bağları yeniden şekillenmesi sonucu hücre büyümesi ve bölünmesi gibi olaylar sonucunda gerçekleşmektedir [26].

Bitkilerde ligninleşme ve ksilem farklılaşması için B' a ihtiyaç duyulması nedeniyle B' un IAA metabolizması, lignin biyosentezinin düzenlenmesi ve ksilem farklılaşmasında anahtar rol oynadığı belirtilmektedir [19].

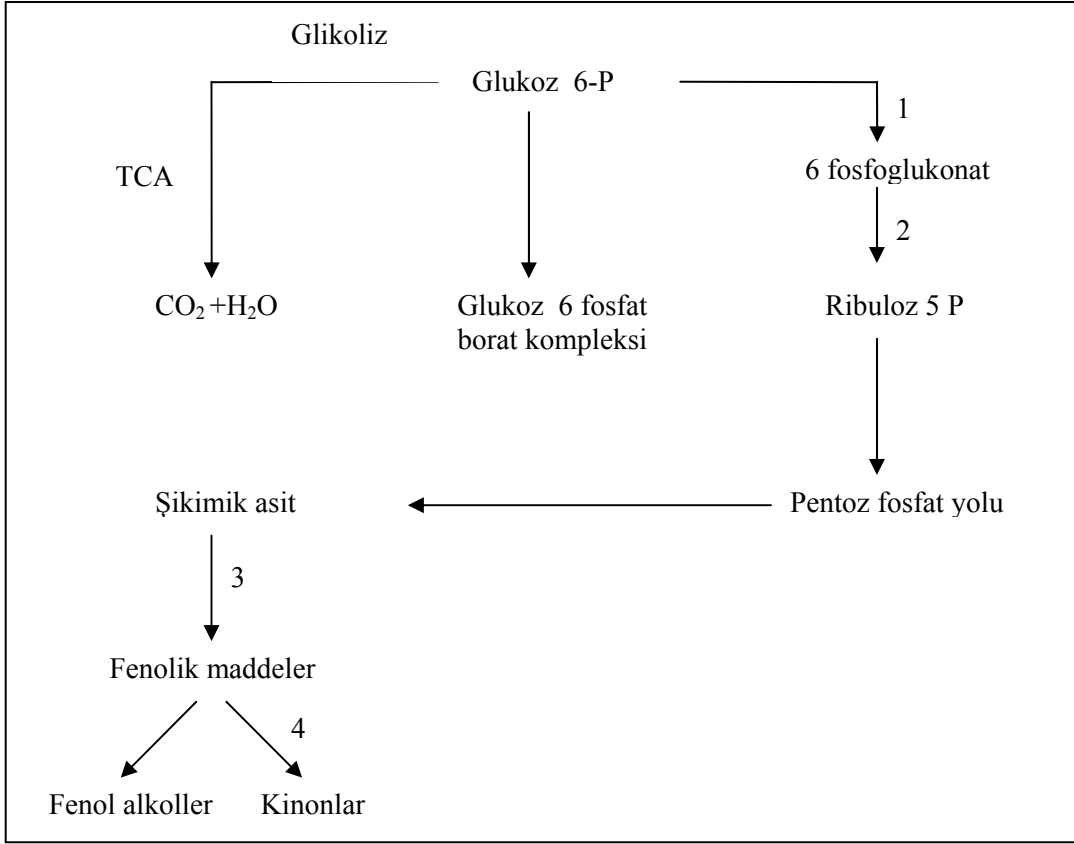
Borun hücre çeperi sentezi ve membran dayanıklılığındaki rolü polen tüpü büyümesinde de etkili olmaktadır. Çimlenmeden sonra polen tüpleri uzamaya başlamaktadır. Burada, hücre çeperlerinin genişlemesinden çok büyüme uçlarında yeni hücre çeperi materyallerinin ilavesi söz konusu olmaktadır. Büyüyen polen tüplerine B akışı durdurulduktan 2-3 dk sonra anormal bir kayganlaşma ve uç bölgelerinde patlama oluşmaktadır [3].

Borun polen tüpü büyümesindeki özel rolü; vejetatif büyümeden çok, reproduktif büyümede etkili olduğu yani tohum ve tane üretimi için daha fazla B'a gereksinim olduğu açıklanmaktadır. Döllenme süresince düşük sıcaklıkların sebep olduğu düzensiz veya periyodik meyve tutumu, pistil ve polen tanelerinin B kapsamını artırarak belli bir düzeye kadar önlenebilmektedir [30]. Bor anterlerin polen üretim kapasitesini ve polen tanelerinin canlılığını artırarak döllenmeyi de etkileyebilmektedir. Borun nektarlardaki şekerlerin miktar ve bileşimini artırarak, çiçekleri böcekler için çekici hale getirerek; döllenmenin sağlanmasındaki dolaylı etkileri de oldukça önemlidir [26].

Bor bitkilerde B-şeker kompleksi oluşturarak şekerlerin kısa ve uzun mesafede taşınımında önemli rol oynamaktadır. Bor, yaprakların şeker alımını artırmasına rağmen yapraktan fotosentez ürünlerinin taşınımını etkilemekte ya da kalburlu borularda kallus oluşturarak bu taşınımı engelleyebilmektedir [26]. Şeker kapsamının çok yüksek olması durumunda fruktoz da borat kompleksi oluşturabilmekte ve böylece B toksitesinin polen tüplerine zararı önlenebilmektedir. Bu şekilde oluşan toksiteyi önleme mekanizması engellenirse sitoplazmadaki B miktarı oldukça artmakta ve NAD^+ ve RNA'nın ribozu ile kompleks oluşturarak metabolik bozukluk yaratabilmektedir [31]. Bunun sonucu olarak da örneğin nodül oluşturan soya fasulyesinde üre metabolizması, dolayısıyla da azot fiksasyonu engellenebilmektedir [26].

1.3. Bor ve Fenol Metabolizması

Bor fenol metabolizması ve fenolik maddeleri etkileyen önemli elementlerden birisidir. Fenolik maddeler pentoz fosfat yolunu takiben şikimik asit yolu üzerinden sentezlenir. Ortamda yeterli miktarda B bulunduğunda, B pentoz fosfat yoluna giren 6-fosfoglukonatla kompleks yaparak 6-fosfoglukonat dehidrojenaz enzimini inhibe eder. Dolayısıyla ortamda yeterli B bulunduğunda fenolik maddeler birikmez. Çünkü substrat akışı pentoz fosfat yoluna değil glikoliz yoluna kayar. Buna karşın ortamda yeterli B bulunmadığında ise substrat akışı pentoz fosfat yoluna kayar. Bunun bir sonucu olarak fenolik maddelerin birikmesi B'un fenol metabolizması üzerindeki en önemli etkisidir (şekil 1.3.1.) [26, 32, 33, 34].



Şekil 1.3.1. Borun fenol metabolizması üzerine etkileri. 1. Glukoz 6-P dehidrojenaz, 2. 6-fosfoglukonat dehidrojenaz, 3. Fenil alanin amonia liyaz (PAL), 4. Polifenol oksidaz (PFO) [26].

Fenolik esterler, kumarinler, flavanoidler ve lignin fenilpraponoid yoluyla sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Tüm fenilpraponoidler L-fenil alaninden oluşan trans-cinnamik asitten sentezlenir. L-fenilalaninin trans-cinnamik asite dönüşümünden sorumlu olan fenil alanin amonia liyaz (PAL) fenolik maddelerin biyosentezinde rol alan anahtar bir enzimdir. Bu enzim çeşitli stres koşullarına cevap olarak aktive edilir ve fenolik maddelerin birikimine rol açar. Bor eksikliği ve fazlalığı [35] altında fenolik maddelerde görülen artışın sebebi bu maddenin sentezinden sorumlu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin aktivitesinde görülen değişimlerdir. Bor eksikliği görülen yapraklarda polifenol oksidaz (PFO) tarafından fenolik maddelerin oksitlenmesi kinonların oluşumuna sebep olabilir. Kinonlar, O₂ ile reaksiyona girerek toksik, süper oksit radikallerini oluşturur. Bor eksikliğine hassas bitki türlerinde kinonların birikmesi hücrede meydana gelen zararın ana sebebidir [36]. Bununla beraber B eksikliğinde dışarıdan uygulanan askorbik asitin kök gelişimini iyileştirdiği ve bu etkiyi PFO aktivitesini inhibe edip kinonların oluşumunu engelleyerek sağladığı bulunmuştur [37, 38].

Bor eksikliğinde olduğu gibi toksikliğinde de PAL, peroksidaz (POD) aktivitesi ve lignin miktarı artmaktadır. Soya fasulyesinin köklerinde yapılan bir çalışmada bitkilere 0.01, 0.05 ve 5 mM B uygulandığında bir hafta sonunda PAL, POD aktivitelerinde ve lignin miktarındaki artışın yanı sıra süberin [35] miktarının da arttığı bulunmuştur [34]. Dolayısıyla PAL [26, 34], PFO [26, 34, 37] ve POD; B eksikliği ve toksikliğinde [34, 37] fenol metabolizmasında rol alan enzimlerdir. Nitekim B eksikliği görülen dokularda bu enzimlerin aktivitesindeki artış bitkinin bu strese karşı gösterdiği en önemli cevaptır.

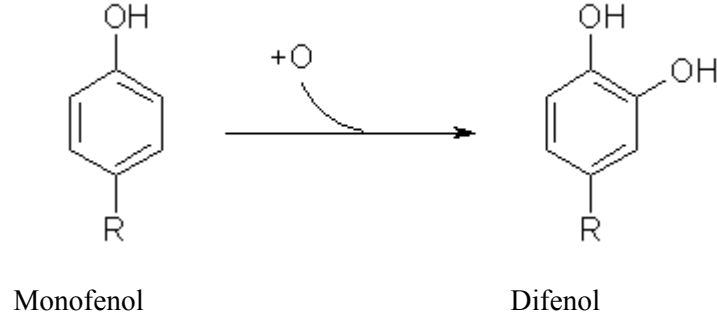
1.3.1. Polifenol oksidazlar

Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir. Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalizleyebilir. Bunlardan birisi, monofenolik bileşiklerin *o*-difenollere hidroksilasyonu (E.C.1.14.18.1), diğeri ise *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonudur (E.C.1.10.3.2), (Şekil 1.3.1.1 ve 1.3.1.2). Monofenol oksidazlar, hayvansal sistemlerde L-tirozin temel monofenolik substrat olduğu için tirozinaz aktivitesi olarak isimlendirilir. Bitkisel sistemlerde L-tirozin enzim için temel substrat olmasa da aynı isim kullanılmaktadır. Bu enzim birden fazla fenolik yapıdaki substrata etki ettiği için PFO, tek bir enzim değil bir enzim grubunun ortak adıdır. Örneğin, monofenollerden tirozin'e etki edene tirozinaz, dihidroksifenollerden dopa, katekol ve kafeik asite etki edenlere de sırasıyla dopa oksidaz, katekol oksidaz ve kafeik asit oksidaz denilmekle birlikte bu enzimlerin hepsine yaygın olarak PFO adı verilmektedir [39].

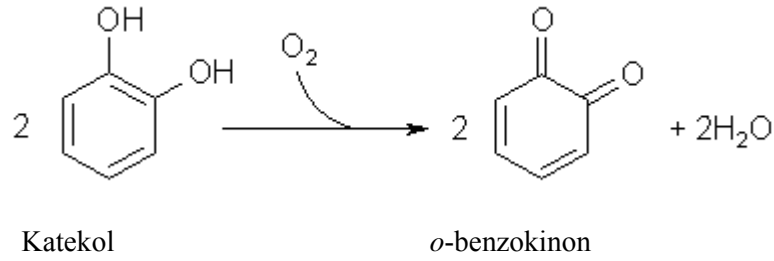
1.3.1.1. Polifenol oksidaz genleri ve protein molekül ağırlığı

Polifenol oksidaz proteinini kodlayan genler pek çok bitki türünde araştırılmış ve PFO' ların bitki genomunda bir gen ailesi tarafından kodlandığı bulunmuştur. Örneğin; muzda 4, patatesten 6 ve domateste 7 farklı genin PFO sentezinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Buna karşın üzümde ve bir bryofit olan *Physcomitrella patens* de tek bir genin PFO sentezinde rol aldığı bulunmuştur [40].

Bitki, fungi ve diğer organizmalardan elde edilen verilerle pek çok PFO'nun aminoasit dizilimi ortaya çıkarılmıştır. Fakat aktif bölge hariç, aminoasit asit diziliminde oldukça farklılıklar olduğu ve PFO' ların bitki ve funguslardaki rollerinin anlaşılmasında bu dizi analizlerinin yeterli olmadığı önerilmiştir. Polifenol oksidazların primer yapısının birbirine yakın akraba olan domates ve patatesten; %91 homoloji gösterdiği fakat domates ve bakla arasında bu homolojinin sadece %40 olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber elma çiçek gelişiminin farklı evrelerinde iki genin ekspresyon verdiği ve bunlardan birinin sadece post-antesis evresinde çalıştığı bulunmuştur. Bu iki genin aminoasit dizilerinin de sadece %55 oranında homoloji gösterdiği bildirilmiştir [41].



Şekil 1.3.1.1. Fenollerin difenollere dönüşümü (monofenolaz aktivitesi)



Şekil 1.3.1.2. Kinonların oluşumunu sağlayan difenol oksidaz reaksiyonu

Genel olarak bakıldığında PFO genleri arasındaki farklılıklar, bitkinin farklı bölge ve gelişim evrelerinde farklı ekspresyon vermeleri, bitki PFO' larının kompleksliğini ortaya koymaktadır.

Polifenol oksidazların molekül ağırlığının 57-62 kDa arasında olduğu düşünülmektedir ve nükleer DNA tarafından kodlanan bitki PFO' larının kloroplastlar içine nasıl taşındığı ve işlendiği üzerine yapılan bazı çalışmalar vardır. Nükleer DNA tarafından kodlanan öncül PFO proteinlerini kloroplast içine transit peptit taşır ve bu peptit PFO kloroplast içindeki yerine ulaşıncaya kadar uzaklaştırılmalıdır. Bezelye kloroplastlarında yapılan *in vitro* bir çalışmada, molekül ağırlığı 67 kDa olan öncül proteinin ATP kullanılarak kloroplast stromasına geçtiği, stromada bulunan peptidazlar tarafından işleme tabi tutularak molekül ağırlığı 62 kDa olan proteine dönüştürüldüğü bulunmuştur. Bundan sonraki tilakoid lümenine taşınımının ışığa bağlı olduğu ve sonuçta olgun formdaki PFO' nun 59 kDa olduğu bildirilmiştir [42]. Polifenol oksidazların kloroplast içine taşınması ve daha sonra işlenmesi olaylarında Cu^{2+} a ihtiyaç duyulmaz ve Cu^{2+} in varlığı PFO' nun kloroplast içine taşınmasını inhibe eder. Bununda Cu^{2+}

in öncül proteinin işlenmesinde rol alan stromal peptidazları inhibe etmesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür [43].

1.3.1.2. Polifenol oksidazların bitkide ve hücrede bulunduğu yerler

Bitkide PFO gen ekspresyonunun en yüksek düzeyde görüldüğü yerler genellikle genç dokular (yaprak, çiçek, meyve, yumru) ve hastalıklara ve böceklere karşı hassas olan meristematik bölgelerdir. Polifenol oksidaz gen ekspresyonu bitki dokularının gelişip olgunluğa ulaştığı dönemlerde genellikle düşmeye başlar. Bazı bitki türlerinde PFO enzimi büyüme ve gelişme dönemlerinde, PFO transkripsiyonu olmasa bile olgun dokularda devamlı olarak bulunur fakat aktif değildir [44].

Genel olarak PFO' ların; kloroplastların tilakoid membranlarında bulunduğu kabul edilse de, bu durum patates yumrularında tam olarak açıklanamamıştır. Zarara uğramamış dokularda nişasta granüllerine bağlı olarak ve stoplazmada bulunduğu, mekanik bir yaralanmadan sonra ise PFO ların genel bir yayılış gösterip vakuollerde de yer aldığı bildirilmiştir. Bununla membran bütünlüğünün bozulmasından kaynaklanabileceği önerilmiştir.

Ispanak köklerinde ise PFO aktivitesi plastit membranlarında ve mitokondrilerde oldukça yüksektir. Buğday, yulaf, yonca ve seker kamışı gibi bazı bitki türlerinde ise enzim kloroplastlarda lokalize olmuştur. Olgunlaşmış elmalarda ise; PFO' ın daha çok kloroplastlarda ve mitokondrilerde aktif olduğu gözlenmiştir. Çeşitli muz türlerinde PFO aktivitesinin meyvenin dokularına göre değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı zeytin türlerinde enzim kloroplastlara sıkı sıkıya bağlyken siyah zeytin türlerinde enzim çözünebilir bir formda bulunur [45].

1.3.1.3. Farklı bitki cinslerinde PFO' ların varlığı

Pek çok bitki cinsinde, egzotik bitkiler dahil, PFO' ların varlığı üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğu molekül ağırlıkları ve fonksiyonları üzerinedir. Bir orkide olan *Aranda* da, PFO' nun 4 farklı izoforma sahip olduğu ve hava köklerinin kloroplastlarında bulunduğu bildirilmiştir [46]. Kahve tohum ve yapraklarında, parazitik *Cuscuta* bitkisinde ve bir *Cruciferae* olan çin lahanasında ise 2 PFO izoformunun var olduğu bulunmuştur [47, 48]. Bununla beraber, güvey otu, kekik, Trabzon hurması, enginar, marul ve malta eriği meyvelerinde de PFO aktivitesine rastlanmıştır [49]. Ayrıca kayısı meyvelerinde yapılan bir çalışmada, meyvede PFO mRNA' sının tespit edilemediği bir evrede, PFO aktivitesinin oldukça yüksek olduğu bulunmuş ve bu proteinin uzun periodlarda dahi kararlılığını koruyabildiği gösterilmiştir [50].

Cano ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise; tropik bitkilerden biri olan papaya meyvelerinde de PFO enziminin varlığı bildirilmiştir. Bu meyvelerden kısmen izole edilen PFO enziminin türlere göre değişimi incelenmiş ve toplam PFO enzim aktivitesinin dişi meyvelerde diğerlerine göre çok daha yüksek olduğunu belirtilmiştir. Bu meyvelerden elde edilen enzimlerin elektroforetik özellikleri incelendiğinde, hermafrodit meyvelerde 6 izoenzimin varlığı gözlenmesine rağmen dişi meyvelerde dört izoenzimin varlığını gösteren bandlar belirlenmiştir [51].

Allium sp. den izole edilen PFO'nun aktivitesi çeşitli substratlarla incelenmiş ve enzimin en fazla katekole karşı spesifite gösterdiği gözlenmiştir. İzole edilen enzimin pH 7.5'te en iyi aktiviteye sahip olduğu ve 40 °C'nin üzerinde PFO aktivitesinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Bu bitkiden elde edilen PFO, askorbik asit, 2-merkaptotanol ve sodyum metabisülfid gibi genel PFO inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu da bulunmuştur [52].

Elmadaki PFO'nun monofenolaz aktivitesi, difenolaz aktivitesi ve bu aktivitelere çeşitli inhibitörlerin etkisi detaylı bir şekilde çalışılmıştır [53]. Monofenolaz aktivitesi, enzimin izolasyon işlemlerine duyarlı olmasından dolayı ekstraksiyonu sırasında çok düşük oranlarda ve NMR spektroskopisi ya da HPLC gibi oldukça pahalı teknikler yardımıyla tespit edilebilmiştir. Ancak son yıllarda geliştirilen bir spektrofotometrik teknik yardımıyla elmada aktivitenin çeşitli faktörlere bağımlılığı izlenebilmiştir [54].

Monofenolaz aktivitesi, avokado bitkisinde tespit edilmiş olup, bu bitkideki PFO hem suda çözünür hem de membrana bağlı formlarda bulunmaktadır. Avokadoda monofenolaz aktivitesi, aseton ile toz haline getirilen örneklerle hazırlanan özütler kullanılarak tayin edilmiş ve p-kresol varlığında yapılan denemelerde enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur [55].

1.3.1.4. Kararma reaksiyonları ve PFO'lar

Meyve ve sebzelerde, ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Açık kahverengiden-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişmelerine "esmerleşme" denir. Enzimatik olarak renk değişimi oksijen varlığında PFO'nun monofenolik ve difenolik maddeleri kinolik bileşiklere yükseltgemesinden kaynaklanır. Gerçekte, PFO'larla katalizlenen esmerleşme reaksiyonlarında oluşan kinonlar oldukça reaktif olup, esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşirler [56, 57]. Besinlerin depolanması ve endüstriyel olarak işlenmesi esnasında; bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan renk değişimleri, çoğu kez istenilen seviyede durdurulamamaktadır. Bunun sonucunda besinlerin fiziksel görünüşlerinde ve besinsel değerlerinde değişimler meydana

gelmektedir. Bu da besinin hem ekonomik ve besinsel değerini kaybetmesine hem de raf ömrünün azalmasına sebep olduğundan ciddi bir problem teşkil etmektedir.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları bitkilerde iki farklı şekilde gözlenebilir [58, 59]. Bunlardan birisi meyve ve sebzelerde bulunan fenol bileşiklerin PFO ile katalizlenerek kinonları verdiği oksidasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan kinon yapılı bileşikler, daha sonra siyah melanin pigmentlerine polimerleşir. Meyve ve sebzeler soyulduğunda veya kesildiğinde enzim içeren bitki dokusu serbest hale gelir. Havadaki oksijen varlığında PFO enzimi hücre fenolik bileşiklerinin *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler. Oluşan bu kinonlar oldukça reaktif olup esmerleşmenin bir karakteristiği olan esmer pigmentin oluşumuna sebep olmak üzere polimerleşir. Meyve paslı bir bıçakla kesildiğinde veya bakır bir kasede karıştırıldığında bu olay kolayca gözlenebilir. Armut, muz, patates, marul ve meyve sularında klorojenik asidin böyle oksidasyonu ile oluşan kahverengi ve siyah lekeler bu tür pigment oluşumunu gösterir. Diğer enzimatik esmerleşme türü ise fenolik bileşiklerden türemiş kinonların serbest aminoasit ve proteinlerle esmer polimerleri oluşturmasıdır. Patateste ve kazein içeren besinlerde okside olmuş klorojenik asidin, kazein ile olan reaksiyonları bu türden işlemlerdir.

Malatya kayısı (*Prunus armeniaca L.*) Türkiye’de yetiştirilen çeşitler içinde en iyisidir ancak depolama esnasında dış yüzeyi kararmaktadır ve bu ticari olarak istenmeyen bir durumdur. Bu durum oksijen varlığında PFO’nun fenolik substratları kinonik bileşiklere okside etmesiyle ortaya çıkmaktadır. Malatya kayısından elde edilen enzimin aktivitesinin pH 8.5’te maksimuma ulaştığı gözlenmiştir [58].

PFO’nun etkili olduğu canlı türlerinden birisi de mantarlardır. Endüstriyel olarak en az düzeyde islenmiş mantarın; raf ömrü saklama esnasındaki enzimatik esmerleşmeden dolayı birkaç gün ile sınırlıdır. Mantardaki esmerleşmeye sebep olabilecek enzimler olan PFO, lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri çeşitli mantarlarda çalışılmış ve PFO’nun mantar dokularındaki en bol enzim olduğu ve kinetik ve inhibisyon çalışmaları sonucu mantardaki esmerleşmenin büyük bir oranının PFO’dan kaynaklandığı belirtilmiştir [59, 60].

Enzimatik kararma; elma, armut, şeftali ve muz gibi meyvelerde, patates ve yemeklik mantar gibi sebzelerde daha fazla görülür. Ancak yeterli seviyede fenolik madde ve PFO enzimi içermeyen domates, limon, turunçgillerde yüksek asit nedeniyle enzimatik kararma problem oluşturmamaktadır. Öte yandan bazı tahıllardan elde edilen unlardaki yüksek PFO enzim aktivitesinden dolayı, ekmek ve makarna ürünlerinin kararma gösterdiği ve oluşan kinonların

proteinlerle birleşerek gıdaların sindirimini zorlaştırdığı ve bu arada lizin amino asidinin etkisini azalttığı bildirilmiştir.

Ancak enzimatik esmerleşme her zaman istenmeyen bir durum değildir. Bu reaksiyonlar kuru üzüm, kuru erik, kakao, çay ve kahvede istenilen renk ve lezzetin kazanılmasında oldukça etkilidir. Siyah çay üretiminde enzimatik kararın istenen bir olaydır. Benzer şekilde çekirdeksiz kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen güzel renkleri enzimatik esmerleşme sonucudur. Kakao ve kahvenin renk ve aroması, siyah zeytinin renk ve lezzetinde enzimatik kararmanın rolü büyüktür [61].

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının tamamı bitkinin türüne, yetiştiği bölgeye ve bitkinin fizyolojik olgunluğuna göre değişim gösterirken, esmerleşmenin rengi ise ortamdaki mevcut fenolik substratların türüne bağlıdır. Bunun yanında esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler; pH, sıcaklık, dokularda mevcut bulunan oksijen miktarı ve aktif PFO konsantrasyonu şeklinde sıralanabilir. Bunlardan birinin reaksiyon ortamında bulunmaması veya optimum değerinden uzak olması reaksiyonu durdurabilir veya hızını azaltabilir. Gıdalarda, bu türden reaksiyon mekanizmalarının ortaya konması ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonu ile esmerleşme sonucu oluşan ürünlerin istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak mümkün olabilecektir [56, 57].

1.3.1.5. Bitkilerin patojen, herbivor veya strese dayanıklılığında PFO' ların rolü

Polifenol oksidaz enziminin bitkilerde önemli rolleri vardır. Bunlardan birisi, bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direncinde rol oynamasıdır Bitki savunma mekanizmasındaki potansiyel rolleri sebebiyle, yaralanma, patojen veya herbivor saldırıları ve diğer çevresel streslere karşı PFO' ı kodlayan genlerin ekspresyonundaki değişimin araştırıldığı bazı çalışmalar vardır. Patates ve domateste yaralanma veya patojen enfeksiyonunun özellikle genç yapraklarda, ananas bitkisinde ise yaralanmayı takiben hem yaprak hem de meyve dokularında PFO aktivitesinin arttığı, fakat muz meyvesinin kabuk veya etli kısımlarında yaralanmanın PFO aktivitesi üzerinde önemli bir artışa sebep olmadığı bildirilmiştir. Polifenol oksidaz gen ekspresyonunun kontrol bitkilere göre artırıldığı transgenik domates bitkilerinin *Pseudomonas syringae* bakterisine ve çeşitli böceklerle karşı daha dayanıklı olduğu bulunmuştur [44, 62]. Buna karşın PFO enzim aktivitesinin antisense inhibisyonu transgenik domateslerin bu patojene karşı hassasiyetini artırmıştır [63].

Benzer şekilde *Malacosoma disstria* larvalarına karşı, hibrit kavak ağaçlarının dayanıklılığının araştırıldığı bir çalışmada; PFO gen ekspresyonunun artırılması sonucu transgenik bitkilerle beslenen larvaların ölüm oranının kontrol bitkilerle beslenenlere göre daha

fazla olduğu bulunmuştur [64]. Patates ve fasulyenin kın kanatlı Colorado patates böceğine verdiğine cevabın araştırıldığı diğer bir çalışmada da yaralanma ve larvalardan salınan salgıların yapraklarda PFO aktivitesini artırabildiği bildirilmiştir [65].

Biyotik stresler yanında abiyotik stres koşulları da PFO aktivitesinde değişimlere sebep olmaktadır. Kurumaya toleranslı veya dirilen bitkiler olarak adlandırılan bir bitki türü olan *Ramonda serbica* da kuraklık stresinin PFO enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kuraklık stresine maruz kalmış yapraklarda (bağıl su miktarı %2) PFO aktivitesinin birkaç kat arttığı ve kuru yaprakların bağıl su içeriğinin tekrar %95'e çıkarıldığında ise ilk birkaç saat içinde aktivitenin engellendiği, bir gün içinde de aktivitenin tekrar kuru yapraklardaki düzeye ulaştığı bulunmuştur [66]. Polifenol oksidazların bitkilerde kuraklık stresine karşı rollerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise, PFO enzim aktivitesinin indirgendiği antisens domates bitkilerinin kuraklık stresine karşı, hem enzim aktivitesinin artırıldığı hem de kontrol bitkilerden daha fazla dayanıklı olduğu bulunmuştur. Fakat bu dayanıklılığın altında yatan mekanizma henüz açıklanamamıştır [62].

1.4. Amaç

Bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan toprak, aynı bitkiler tarafından kullanılabilen minerallere sahiptir. Topraktaki mineral maddelerin miktarı bitkinin tolerans sınırının üzerine çıktığında tohum çimlenmesi ve bitki büyümesinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Yaşayan her organizma gibi bitkilerde stres koşullarında organizmayı hücresel zarardan koruyan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Polifenol oksidazların bitki savunma mekanizmasında potansiyel rolleri olduğu ve yaralanma, patojen veya herbivor saldırıları veya diğer çevresel streslere karşı enzim aktivitesinde değişimler meydana geldiği bilinmektedir. Bor bitkilerde fenol metabolizması ve fenolik maddeleri etkileyen önemli elementlerden bir tanesidir. Bor eksikliği veya toksikliğinin PFO aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma vardır. Bu araştırmalar çoğunlukla kök, yaprak gibi dokular üzerinde yapılmıştır. Polifenol oksidazların çeşitli tohum dokularında da aktivite gösterdiği göz önüne alındığında, B' un tohum çimlenmesi sırasında PFO aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada B' un embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Amaç doğrultusunda öncelikle kullanılacak olan B konsantrasyonları ve tohumlar belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra çimlendirme çalışmaları ve çimlendirme esnasında farklı B konsantrasyonlarının embriyo ve endosperm dokularındaki PFO enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

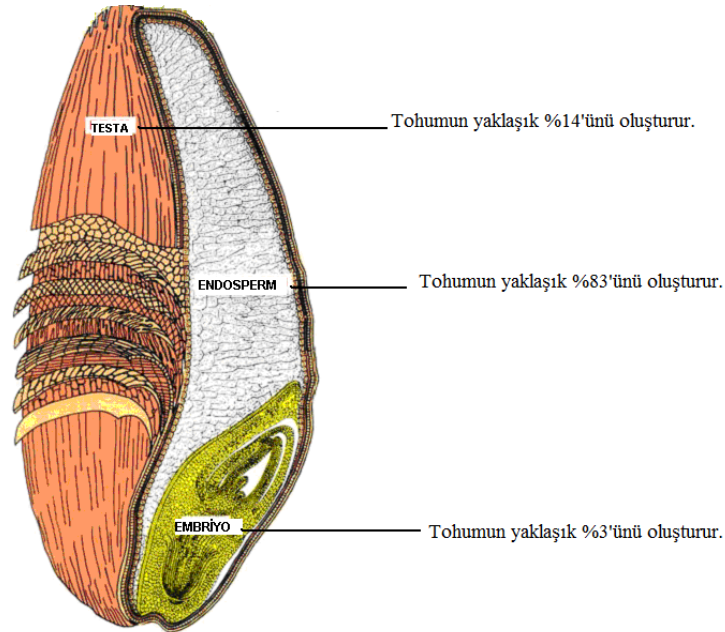
2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Tohumların Özellikleri

Çalışmada *Triticum aestivum* L. cv. Kıraç-66 ve *Triticum aestivum* L. cv. Sultan-95 buğday varyeteleri kullanılmış olup tohumlar Tavşanlı Tarım Müdürlüğü ve Tarım Kredi Kooperatifinden temin edilmiştir.

Sultan-95; kılçıklı, orta uzun, beyaz yarı sert daneli, beyaz başaklı ekmeklik buğday çeşididir. Sert kışlar hariç soğuğa dayanıklı, kuraklığa hassastır. Verimi yüksek, hasat dönemi orta erkencidir. Tarla şartlarında kahverengi pasa orta derecede hassas, diğerlerine dayanıklıdır. Türkiye’de yetiştirilmesi için önerilen bölge; Orta Anadolu ve geçit bölgesi sulu alanlarıdır ve kalitesi iyidir [67].

Kıraç-66 kılçıklı, orta uzun, beyaz sert daneli, beyaz başaklı ekmeklik buğday çeşididir. Soğuğa ve kuraklığa dayanıklıdır. Verimi iyi, hasat dönemi orta erkencidir. Tarla şartlarında sarı ve kahverengi pasa mukavim, kara pasa hassas, sürmeye dayanıklıdır. Türkiye’de yetiştirilmesi için önerilen bölge; Orta ve Doğu Anadolu bölgeleridir ve kalitesi çok iyidir [67]. Buğday tohumunun şematize edilmiş yapısı resim 2.1.1’de görülmektedir.



Resim 2.1.1. Buğday tohumunun şematize edilmiş yapısı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Kültür Çözeltileri

Çalışmada kullanılan kültür çözeltileri saf suya 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM borik asit (H_3BO_3) edilerek hazırlanmıştır. Bu araştırmada kontrol çözeltisi olarak saf su kullanılmıştır. Saf su 0 mM B olarak kabul edilmiştir.

2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

2.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

0.1 M'lık fosfat tamponu hazırlamak için 17.418 g K_2HPO_4 bir miktar saf su içerisinde ve manyetik karıştırıcıda çözüldü. 0.01 M'lık seyreltik HCl kullanılarak çözeltinin pH'ı 6.5 e ayarlandı. Daha sonra üzerine saf su ilave edilip 1000 ml ye tamamlandı.

2.3.2. NaOH Çözeltisinin Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 40 g olan NaOH 0.01 M'lık 100 ml çözelti hazırlamak için 0.04 g NaOH üzerine önce 50 ml saf su eklenip tamamen çözünmesi sağlandı. Üzerine saf su ilave edilip 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.3. Katekol Substratının Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 110 g olan katekolden 10 mM'lık 100 ml solüsyon hazırlamak için 0.11 g kristal katekol ve 1.74 g K_2HPO_4 alınıp önce 50 ml saf su içerisine konulup tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltinin pH'ı 6.5 e ayarlandıktan sonra üzerine saf su ilave edilip 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.4. Dopa Substratının Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 197 g olan toz halindeki dopadan 10 mM 100 ml hazırlamak için 0.197 g dopa ve 1.74 g K_2HPO_4 tartılıp daha önceden hazırlanan 0.01 M'lık seyreltik NaOH çözeltisinin 2 ml si içerisinde çözüldü. Hacim saf su ilavesi ile pH'ı 6.5 e ayarlandıktan sonra 100 ml ye tamamlandı.

2.3.5. Kafeik asit Substratının Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 180.2 g olan kafeik asitten 10 mM'lık 100 ml solüsyon hazırlamak için 2ml etanol içerisine 0.180 g kafeik asit ve 1.74 g K_2HPO_4 alınıp çözündürüldü. Önce 50 ml saf su içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı ve daha sonra çözeltinin pH'ı 6.5 e ayarlandı ve sonra üzerine saf su ilave edilerek 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.6. Tirozin Substratının Hazırlanışı

Molekül ağırlığı 181.2 g olan tirozin' den 2.5 mM 100 ml hazırlamak için; 0.0453 g tirozin ve 1.74 g K_2HPO_4 alınıp önceden hazırlanan 0.01 M'lık seyreltik NaOH çözeltisinin 2 ml si içerisinde çözüldü. Önce 50 ml saf su içerisinde konulup tamamen çözünmesi sağlandı. Çözeltinin pH'ı 6.5 e ayarlandıktan sonra üzerine saf su ilave edilip 100 ml'ye tamamlandı.

2.4. Tohum Çimlendirme Yöntemi

Ekimden önce tohumlar %10'luk sodyum hipoklorit ile 15 dakika yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyonu takiben tohumlar 3 defa saf su ile yıkanmış ve 3 saat saf suda bekletilmiştir (0. saat). Çalışmada kullanılacak tohumların dolgun görünüşlü, az çok birbirine benzer olmasına dikkat edilmiştir. Çimlendirme işlemi steril Petri kutularında (9 cm çaplı) yapılmıştır. Petri kutuları içerisinde filtre kağıdı konulmuş ve her Petriye 12 ml 0- 200 mM konsantrasyon aralığında olan borik asit çözeltileri ilave edilmiştir. Tüm uygulamalar 12'şer adetlik gruplar halinde hazırlanan tohumlarla 3 tekrarlı olarak sürdürülmüştür. Tohumlar steril Petri kutusu içerisinde belli aralıklı olacak şekilde dizilmiş ve 25 °C' ye ayarlanmış etüvde çimlendirilmiştir. Çimlenme 3, 6, 9, 12. ve 24. saatlerde kontrol edilmiş ve çimlenme devresi boyunca tohumlar saatlik olarak sayılarak çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Ayrıca farklı B uygulamalarına tabii tutulmuş (0, 0.1, 50, 100 ve 150 mM) buğday tohumlarının 0, 3, 6, 9, 12. ve 24. saatlerde embriyo ve endospermeleri ayrılarak daha sonraki analizler için -85 °C' de saklanmıştır.

2.5. Kök ve Gövde Analizleri

24, 48, 72 ve 96 saatlerde çimlenen tohumlar kök ve gövde birleşme yerinden bir jilet yardımıyla kesilerek ayrılmıştır. Kesilen kök ve gövdenin uzunlukları milimetrik cetvelle ölçülmüş, saçak kökte en uzun kökün uzunluğu esas alınmıştır. Ortalama kök ve gövde uzunlukları tüm Petriden alınan değerlerin toplam çimlenen tohum sayısına bölünmesi ile hesaplanmış ve Petri başına cm / bitki olarak belirlenmiştir.

2.6. Enzim Özütünün Hazırlanması ve PFO Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Embriyo veya endosperm dokuları buz içerisinde yerleştirilmiş bir havanda ağırlığının 10 katı hacimde 0.1 mM fosfat tamponunda (pH 6.5) öğütülerek homojenize edilmiş ve özütler 18.000 rpm 4 °C 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen süpernatant buz içine yerleştirilmiş yeni bir tüpe alınarak enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır [68,69].

Monofenolaz aktivitesi tirozin, difenolaz aktivitesi ise katekol, dopa ve kafeik asit substratları kullanılarak belirlenmiştir. Tüm substratlar 0.1 mM fosfat tamponunda (pH 6.5) tirozin için 2.5 mM ve diğer substratlarda 10 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. İçerisinde 1 ml substrat ve 50µl özüt içeren reaksiyon küvetleri 30 °C deki su banyosunda katekol, dopa ve kafeik asit aktivitesi için 3 dakika, tirozin aktivitesi için ise 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben reaksiyon ortamının absorbans değeri spektrofotometre de difenolaz aktivitesi için 490 nm monofenolaz aktivitesi için 430 nm de ölçülmüştür. Özüt içermeyen substratlar kör örnek olarak kullanılmıştır. Absorbans değerleri dakikada gram doku başına PPO aktivitesi (A_{490} veya A_{430} g doku⁻¹ dk⁻¹) olarak ifade edilmiştir [70].

2.7. İstatistikî Ölçümler

Farklı konsantrasyonda B içeren besin solüsyonları buğday tohumlarına uygulanmıştır. Tüm uygulamalar birbirinden bağımsız 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Alınan sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart hataları belirlenmiş, değerler tablo ve grafiklerle gösterilmiştir.

3. SONUÇLAR

3.1.Farklı B Konsantrasyonunun Buğday Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri

Farklı B konsantrasyonlarının *Triticum aestivum* L. cv. Kıraç-66 ve *Triticum aestivum* L. cv. Sultan-95 buğday tohumlarının çimlenmesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır (Bundan sonraki bölümlerde Sultan-95 ve Kıraç-66 olarak kullanılacaktır). Tohumların çimlenmesi üzerinde etkili olan borik asit konsantrasyonunu belirlemek amacıyla tohumlar 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 150 ve 200 mM H₃BO₃ içeren kültür çözeltilerinde 25 °C’ de 24 saat yetiştirilmiş ve 3 saat aralıklarla çimlenme yüzdeleri kaydedilmiştir.

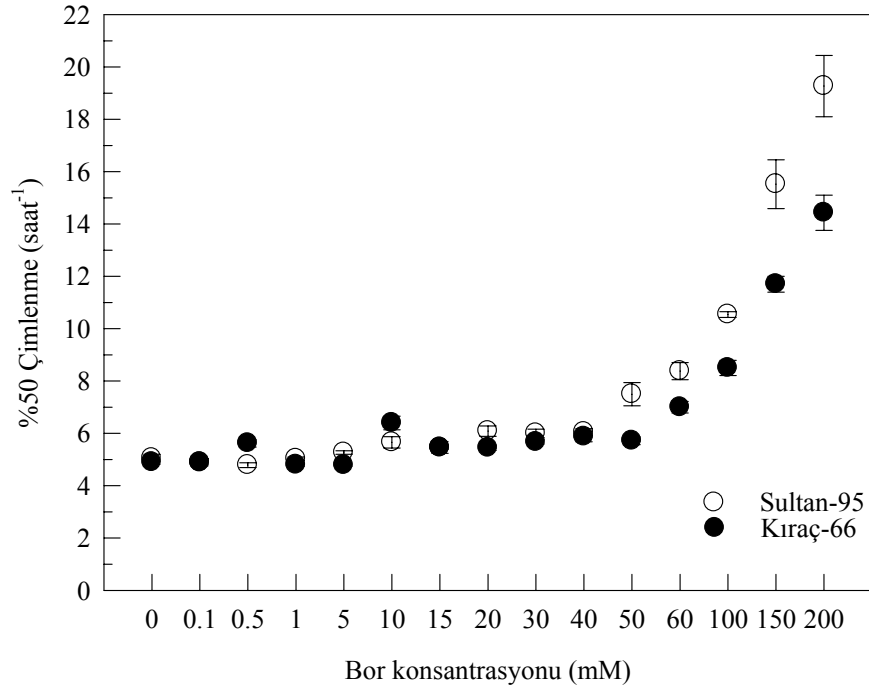
Çizelge 3.1.1. Kıraç-66 tohumlarının çimlenmesi üzerinde etkili olan borik asit konsantrasyonunun belirlenmesi. Kıraç-66 tohumları farklı konsantrasyonlarda H₃BO₃ içeren kültür çözeltilerinde 25 °C’ de 24 saat yetiştirilmiş ve 3 saat aralıklarla çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Verilen her değer ortalama ± SE olup her değer için n= 108-216 tohumdur.

Kıraç-66					
Çimlenme (%)					
Uygulama (H ₃ BO ₃ mM)	Zaman (saat)				
	3	6	9	12	24
0	13±1.4	70±2.9	90±2.2	98±0.8	99±0.6
0.1	15±1.7	71±3.2	95±3.9	98±1.2	100±0.2
0.5	4±1.8	61±4.1	86±2.9	93±2.6	96±1.8
1	6±2.8	80±5.6	91±8.3	96±2.8	99±1.3
5	7±2.6	77±2.7	91±4.9	96±2.9	99±1.3
10	3±2.7	47±2.7	83±4.9	96±2.9	99±1.3
15	3±2.7	61±2.9	77±5.3	93±2.6	97±2.8
20	3±2.7	64±5.7	83±4.9	93±2.6	96±2.9
30	3±2.7	60±2.6	83±0	96±1.8	99±1.3
40	-	58±2.9	83±4.9	95±2.8	96±2.9
50	7±0.8	55±2.7	77±3.5	90±2.7	96±2.8
60	-	40±2.6	67±3.7	85±4	95±1.7
100	6±1.4	30±2.7	54±2.1	78±3.8	90±2.5
150	1±0.6	16±3.4	22±3	54±5.6	86±4
200	-	-	8±2.7	46±4.9	79±3.5

Kıraç-66 tohumlarının 24.saat sonundaki çimlenme yüzdeleri üzerine 0-100 mM B aralığında bulunan konsantrasyonların etkisinin benzer olduğu ve çimlenmeyi engellemediği görülmüştür (Çizelge 3.1.1). Sultan-95 tohumlarının 24. saat sonundaki çimlenme yüzdeleri üzerine 0-60 mM B uygulamalarının olumsuz bir etkisi görülmemiştir (Çizelge 3.1.2). Bor' un çimlenme üzerindeki olumsuz etkisi Kıraç-66 için 100 mM, Sultan-95 için ise 60 mM B konsantrasyonlarından yüksek uygulamalarda ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 3.1.2. Sultan-95 tohumlarının çimlenmesi üzerinde etkili olan borik asit konsantrasyonunun belirlenmesi. Sultan-95 tohumları farklı konsantrasyonlarda H₃BO₃ içeren kültür çözeltilerinde 25 °C' de 24 saat yetiştirilmiş ve 3 saat aralıklarla çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Verilen her değer ortalama ± SE olup her değer için n= 108-216 tohumdur.

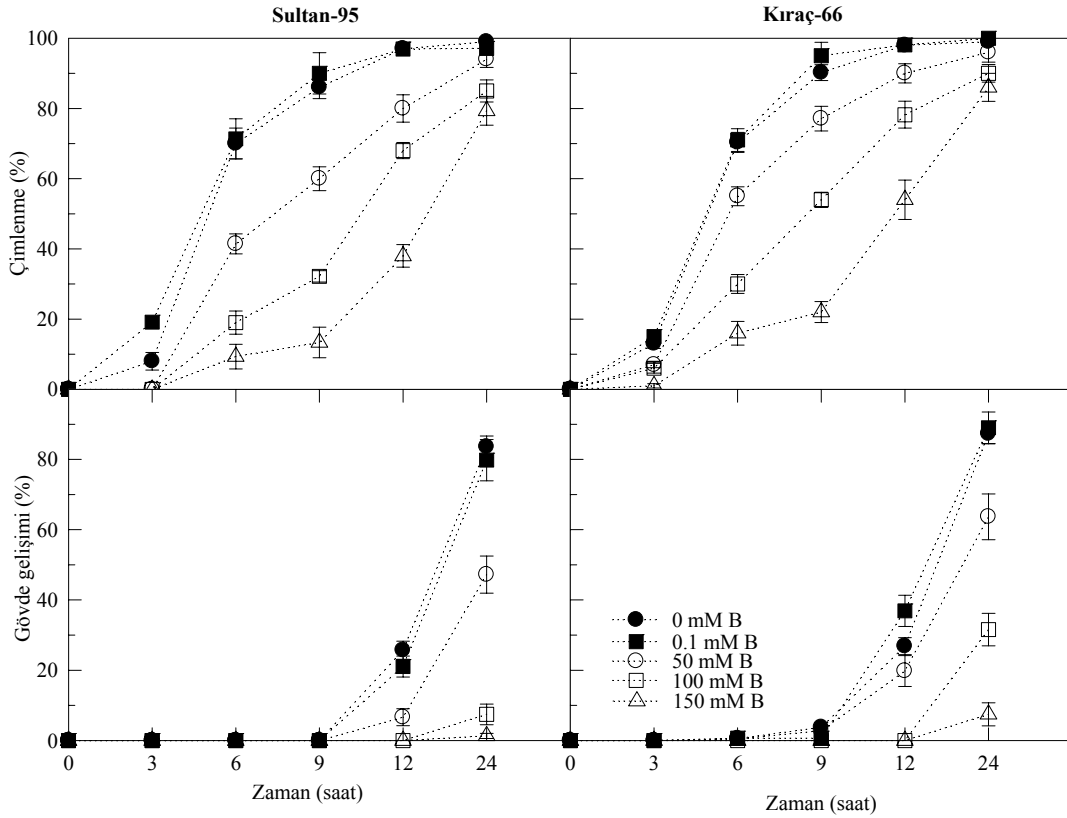
Sultan-95					
Çimlenme (%)					
Uygulama (H ₃ BO ₃ mM)	Zaman (saat)				
	3	6	9	12	24
0	8±2.5	70±4.4	86±3.2	97±0.1	99±0.7
0.1	19±1.7	71±5.7	90±5.9	97±1.4	97±1.3
0.5	14±5.6	75±4.6	94±5.6	100±0	100±0
1	13±3.3	69±2.7	89±2.9	94±1.7	97±1.7
5	8±1.6	64±2.9	94±2.7	94±1.7	97±1.7
10	4±1.8	58±4	94±2.7	97±1.7	100±0
15	3±2.7	61±2.9	83±4.9	99±1.3	99±1.3
20	-	59±4.9	86±2.9	94±1.7	99±1.3
30	-	58±4.9	80±7.3	93±2.6	97±2.8
40	-	52±7.3	77±2.7	88±4.7	95±1.7
50	-	41±2.8	60±3.4	80±3.9	94±2.3
60	-	29±3.5	57±2.8	72±4.7	90±3.4
100	-	19±3.3	32±1.6	68±2.3	85±3.2
150	-	9±3.5	13±4.4	38±3.2	79±4.1
200	-	-	-	30±3.9	65±4.9



Şekil 3.1.1. Farklı B uygulamalarının buğday tohumlarında %50 çimlenme saatleri üzerine etkileri. Grafikteki her nokta ortalama değer \pm SE olup $n= 108-216$ tohumdur.

Kıraç-66 ve Sultan-95 tohumlarının %50 çimlenme oranına ulaştıkları saatlerde yukarıdaki verileri desteklemektedir (Şekil 3.1.1). Kıraç-66 ve Sultan-95 tohumlarının %50 çimlenme oranına ulaştığı saatler artan B uygulamalarına paralel olarak artmaktadır. Her iki varyetede de 50 mM' a kadar olan tüm uygulamaların sonuçları birbirine benzer bulunmuş ve tohumlar yaklaşık 5-6 saatte %50 çimlenme oranına ulaşmıştır. Fakat B konsantrasyonu arttıkça %50 çimlenme için gerekli olan zamanda arttığı görülmüştür. Örneğin 150 mM B da Kıraç-66 tohumları %50 çimlenmeye 12 saat gibi bir sürede ulaşırken Sultan-95 tohumlarında bu süre daha da fazladır ve yaklaşık 16 saattir. Sonuç olarak Kıraç-66 tohumlarının yüksek B uygulamalarına Sultan-95 tohumlarından daha toleranslı olduğu görülmektedir.

Yüksek B konsantrasyonlarının (50, 100 ve 150 mM) buğday tohumlarının zamana bağlı çimlenme yüzdeleri üzerine etkilerine bakıldığında (Şekil 3.1.2), bu konsantrasyonların her iki varyetende çimlenme yüzdelerini 0 ve 0.1 mM B' a göre geciktirdiği görülmektedir. Kıraç-66 tohumlarının çimlenme yüzdelerinde 3. saatte 0 ve 0.1 mM B' a göre 50 mM' da %47, 100 mM' da %54 ve 150 mM' da %93 oranında bir düşme görülürken bu düşüşler 24. saatte 50 mM' da %3, 100 mM' da %9, 150 mM' da %14 oranlarındadır. Sultan-95 tohumlarında ise 3. saatte 0 ve 0.1 mM B' a göre 50, 100 ve 150 mM B' da çimlenme görülmezken, 24. saatte 50 mM' da %5, 100 mM' da %15, 150 mM' da %20 oranında düşüş görülmektedir.



Şekil 3.1.2. Farklı B uygulamalarının buğday tohumlarında zamana bağlı çimlenme ve gövde gelişimi üzerine etkileri. Grafikteki her nokta ortalama değer \pm SE olup $n=216$ tohumdur.

Buğday tohumlarının zamana bağlı gövde gelişim yüzdelere bakıldığında (Şekil 3.1.2) ise her iki tohumda da tüm B konsantrasyonlarında 9. saatten sonra gövdenin gelişmeye başladığı görülmüştür. Yüksek B konsantrasyonlarının (50, 100 ve 150 mM) 24. saatte 0 ve 0.1 mM B' a göre her iki varyetede de gövde gelişimini düşürdüğü ve bu engelleyici etkinin Sultan-95 tohumlarında Kıraç-66' a göre daha belirgin olduğu bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında yüksek B uygulamalarına karşı Kıraç-66 tohumlarının Sultan-95' e göre daha toleranslı olduğu görülmektedir.

3.2.Farklı B Konsantrasyonlarının Buğday Tohumlarında Fide Gelişimi Üzerine Etkileri

Farklı B konsantrasyonlarının Kıraç-66 ve Sultan-95 tohumlarının çimlenme üzerine etkileriyle birlikte bu B konsantrasyonlarının 96 saatlik çimlenme periyodu boyunca kök ve gövde gelişimi üzerine olan etkileri de araştırılmıştır. Kıraç-66 tohumlarının kök gelişimlerine bakıldığında (Çizelge 3.2.1), 0-1 mM aralığındaki B konsantrasyonlarında kök uzunluğunun benzer olduğu 5 mM B uygulamasından itibaren B konsantrasyonunun artmasıyla kök

uzunluğunun da azaldığı görülmüştür. 50 mM ve daha yüksek B konsantrasyonlarında ise kök gelişimi tamamen inhibe edilmiştir. Farklı B uygulamalarının Kıraç-66 tohumlarının gövde gelişimi üzerine olumsuz etkileri ise 10 mM B uygulamasından itibaren görülmüş, 40 mM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki gövde uzunluğunun 0 ve 0.1 mM B' a göre %85-97 oranında düştüğü bulunmuştur (Çizelge 3.2.1).

Farklı B uygulamalarının Sultan-95 tohumlarının kök ve gövde gelişimleri üzerine etkisi Kıraç-66 tohumlarına benzemektedir ve B konsantrasyonu arttıkça kök ve gövde gelişimleri olumsuz etkilenmektedir (Çizelge 3.2.2). Kök uzunluğu 5 mM B, gövde uzunluğu ise 10 mM B konsantrasyonundan yüksek değerlerde 0-1 mM B' a göre düşüş göstermiştir. Sultan-95 tohumlarının 24. saatteki kök ve gövde uzunluğundaki düşüş oranı, Kıraç-66 tohumlarından daha fazladır. Örneğin Kıraç-66 tohumlarının kök uzunluğu 24. saatte 0 ve 0.1 mM B'a göre 40 mM' da %75 oranında düşüş gösterirken, Sultan-95 tohumlarında kök uzunluğu aynı saat ve konsantrasyonda %88 oranında düşüş göstermektedir. Ancak 48, 72 ve 96. saatlerde her iki tohumunda kök ve gövde gelişimindeki düşüş oranı birbirine benzerdir. Her iki tohumda da 50 mM ve yüksek konsantrasyonlarda tüm saatlerde kök gelişimi görülmezken, aynı konsantrasyonlarda 72. ve 96. saatlerde gövde gelişimi görülmektedir. Bu gelişim 0-0.1 mM B' a göre %85-97 oranında az olmaktadır.

Bor uygulamalarının radikulanın belirlediği yani çimlenmenin tamamlandığı andan itibaren diğer köklerin çıkışı üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla da 24., 48., 72., ve 96. saatlerde çoklu kök gelişimleri takip edilmiştir (Çizelge 3.2.3 ve Çizelge 3.2.4). Kıraç-66 varyetesinde 24. saatte 0- 5 mM B uygulamalarında tek veya çoklu köke sahip tohumların yüzdesi sırasıyla yaklaşık %70 ve %30 oranında iken 72. saatte tüm fidelerde %100 çoklu kök gelişimi görülmüştür (Çizelge 3.2.3). Diğer taraftan 24. saatte 5 mM'a kadar çoklu kökler görülmesine rağmen bu konsantrasyondan daha yüksek B uygulamalarında hiç çoklu kök oluşumuna rastlanmamış ve tohumların tamamının tek köke sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca çoklu köklerin gelişiminin 10,15 ve 20 mM B' da 48. saatte, 30 ve 40 mM B da ise 96. saatte başladığı tespit edilmiştir. Sultan-95 tohumlarının çimlenme sonrası çoklu kök gelişim saat ve oranları tüm B uygulamalarında Kıraç-66 tohumlarıyla benzerlik göstermektedir (Çizelge 3.2.4). Bu verilere göre 5 mM dan yüksek B uygulamalarının her iki tohumda da çimlenme sonrası yeni köklerin oluşumunu geciktirdiği veya engellediği görülmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde artan B konsantrasyonlarında 96 saat boyunca yetiştirilen Kıraç-66 ve Sultan-95 tohumlarının kök ve gövde gelişimi azalmıştır. Bununla birlikte yüksek B konsantrasyonları kök gelişimini gövde gelişiminden daha fazla olumsuz yönde etkilemiştir.

Çizelge 3.2.1. Farklı B uygulamalarının Kıraç-66 tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine etkileri. Çizelgede verilen değerler ortalama \pm SE olup her uygulama için n=108-180 fidedir.

KIRAÇ-66								
Kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki)								
Uygulama (H ₃ BO ₃ mM)	Kök Zaman (saat)				Gövde Zaman (saat)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
0	0.37 \pm 0.41	2.64 \pm 0.1	6.7 \pm 0.19	8.97 \pm 0.19	0.2 \pm 0.21	1.11 \pm 0.05	3.54 \pm 0.09	5.38 \pm 0.15
0.1	0.34 \pm 0.43	2.98 \pm 0.16	5.98 \pm 0.19	9 \pm 0.28	0.19 \pm 0.19	1.16 \pm 0.05	3.36 \pm 0.08	5.81 \pm 0.2
0,5	0.38 \pm 0.27	3.08 \pm 0.25	6.24 \pm 0.34	9.18 \pm 0.28	0.22 \pm 0.12	1.15 \pm 0.29	3.96 \pm 0.15	5.23 \pm 0.15
1	0.41 \pm 0.18	3.22 \pm 0.26	6.61 \pm 0.12	9.58 \pm 0.4	0.26 \pm 0.14	1.34 \pm 0.32	4.09 \pm 0.08	5.42 \pm 0.2
5	0.36 \pm 0.33	2.11 \pm 0.26	3.43 \pm 0.2	5.78 \pm 0.19	0.2 \pm 0.13	1.94 \pm 0.17	3.36 \pm 0.09	5.16 \pm 0.15
10	0.22 \pm 0.42	1.4 \pm 0.18	2.33 \pm 0.12	3.39 \pm 0.14	0.16 \pm 0.12	1.14 \pm 0.25	2.56 \pm 0.08	4 \pm 0.16
15	0.23 \pm 0.17	0.93 \pm 0.3	1.42 \pm 0.21	2.07 \pm 0.11	0.15 \pm 0.25	0.86 \pm 0.19	2.16 \pm 0.11	2.51 \pm 0.12
20	0.24 \pm 0.19	0.77 \pm 0.34	1.18 \pm 0.18	1.45 \pm 0.08	0.11 \pm 0.33	0.61 \pm 0.14	1.83 \pm 0.24	1.98 \pm 0.08
30	0.19 \pm 0.32	0.18 \pm 0.19	0.2 \pm 0.22	0.29 \pm 0.24	-	0.43 \pm 0.25	0.81 \pm 0.15	1.21 \pm 0.05
40	0.09 \pm 0.37	0.11 \pm 0.1	0.17 \pm 0.18	0.19 \pm 0.13	-	-	0.52 \pm 0.36	0.93 \pm 0.09
50	-	-	-	-	-	-	0.41 \pm 0.36	0.5 \pm 0.32
60	-	-	-	-	-	-	0.27 \pm 0.26	0.31 \pm 0.17
100	-	-	-	-	-	-	-	0.16 \pm 0.12
150	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2.2. Farklı B uygulamalarının Sultan-95 tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine etkileri. Çizelgede verilen değerler ortalama \pm SE olup her uygulama için n=108-180 fidedir.

SULTAN-95								
Kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki)								
Uygulama (H ₃ BO ₃ mM)	Kök Zaman (saat)				Gövde Zaman (saat)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
0	0.50 \pm 0.37	2.65 \pm 0.07	5.6 \pm 0.17	7.70 \pm 0.27	0.23 \pm 0.18	1.16 \pm 0.03	3.08 \pm 0.08	4.95 \pm 0.13
0.1	0.50 \pm 0.41	2.53 \pm 0.10	5.33 \pm 0.18	7.92 \pm 0.15	0.23 \pm 0.16	1,13 \pm 0.04	3.2 \pm 0.07	5.05 \pm 0.11
0,5	0.48 \pm 0.21	3.81 \pm 0.50	5.64 \pm 0.21	8.12 \pm 0.13	0.22 \pm 0.14	1.2 \pm 0.16	3.39 \pm 0.17	5.14 \pm 0.12
1	0.54 \pm 0.19	2.92 \pm 0.32	5.71 \pm 0.21	8.31 \pm 0.2	0.24 \pm 0.22	1.31 \pm 0.20	3.61 \pm 0.21	5.14 \pm 0.10
5	0.31 \pm 0.22	1.94 \pm 0.15	3.12 \pm 0.33	5.13 \pm 0.13	0.2 \pm 0.43	1.06 \pm 0.23	3.04 \pm 0.14	4.71 \pm 0.12
10	0.26 \pm 0.44	1.21 \pm 0.12	2.1 \pm 0.17	2.8 \pm 0.09	0.16 \pm 0.18	0.84 \pm 0.21	2.16 \pm 0.21	3.87 \pm 0.21
15	0.25 \pm 0.39	0.82 \pm 0.35	1.25 \pm 0.33	1.68 \pm 0.10	0.14 \pm 0.25	0.61 \pm 0.17	1.44 \pm 0.19	3.15 \pm 0.08
20	0.2 \pm 0.22	0.68 \pm 0.31	1.04 \pm 0.23	1.21 \pm 0.04	0.12 \pm 0.48	0.47 \pm 0.32	1.29 \pm 0.37	2.76 \pm 0.09
30	0.15 \pm 0.33	0.19 \pm 0.21	0.23 \pm 0.27	0.31 \pm 0.36	-	0.28 \pm 0.35	0.67 \pm 0.30	1.19 \pm 0.05
40	0.06 \pm 0.27	0.1 \pm 0.36	0.13 \pm 0.27	0.16 \pm 0.24	-	0.17 \pm 0.25	0.41 \pm 0.27	0.87 \pm 0.18
50	-	-	-	-	-	-	0.36 \pm 0.23	0.49 \pm 0.36
60	-	-	-	-	-	-	0.21 \pm 0.25	0.35 \pm 0.24
100	-	-	-	-	-	-	-	0.17 \pm 0.19
150	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2.3. Farklı B uygulamalarının Kıraç-66 tohumlarında zaman bağı olarak tek ve çoklu kök oluşturma yüzdesi üzerine etkileri. Çizelgede verilen değerler ortalama \pm SE olup her uygulama için n=180-216 fidedir.

		KIRAÇ-66									
		Tek veya çoklu kök (%)									
B Konsantrasyonu (mM):		0	0.1	0.5	1	5	10	15	20	30	40
<u>SAAT</u> <u>KÖK</u>											
24	Tekli	70 \pm 2.2	57.2 \pm 3.1	60.1 \pm 1.7	79.3 \pm 2.3	96.7 \pm 3.3	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
	Çoklu	30 \pm 2.2	42.8 \pm 3.1	39.3 \pm 1.8	20.7 \pm 2.3	3.3 \pm 3.3	0	0	0	0	0
48	Tekli	6.7 \pm 3.4	10.7 \pm 1.2	10.3 \pm 3	19.7 \pm 1.5	32.3 \pm 3.9	40.7 \pm 2.3	46 \pm 2.6	70 \pm 1.8	100 \pm 0	100 \pm 0
	Çoklu	93.3 \pm 3.9	89.3 \pm 1.2	89.7 \pm 3	80.3 \pm 1.5	67.7 \pm 3.9	59.3 \pm 2.3	54 \pm 2.6	30 \pm 1.8	0	0
72	Tekli	0	0	0	0	0	13 \pm 3.2	27 \pm 3.5	52.7 \pm 1.8	100 \pm 0	100 \pm 0
	Çoklu	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	87 \pm 3.2	73 \pm 3.5	47.3 \pm 1.8	0	0
96	Tekli	0	0	0	0	0	0	13.3 \pm 2	35.7 \pm 2.6	69.7 \pm 2.9	92.3 \pm 1.5
	Çoklu	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	86.7 \pm 2	64.3 \pm 2.6	30.3 \pm 2.9	7.7 \pm 1.5

3.3 Borun Buğday Tohumlarının Çimlenmesi Sırasında Embriyo ve Endospermdeki PFO Aktivitelerine Etkisi

Bor uygulanan buğday tohumlarının çimlenme sürecinde embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitesinin zamana göre değişimi araştırılmıştır (Şekil 3.3.1 ve Şekil 3.3.2). Borun her iki buğday varyetesinde de %50 çimlenme oranını engellemeye başladığı konsantrasyonlar (50, 100 ve 150 mM) tohum dokularındaki PFO aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Kıraç-66 tohumlarının embriyo dokularında PFO aktivitesindeki değişimin katekol kullanılarak belirlendiği 24 saat boyunca tüm uygulamalarda PFO aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 3.3.1 A). Dopa ve kafeik asidin substrat olarak kullanıldığı durumlarda PFO aktivitesindeki değişimler 0 ve 0.1 mM B uygulamalarında birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Polifenol oksidaz aktiviteleri 0- 6. saatler arasında artmış ve 9. saatteki belirgin düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.1 B,C). Embriyoda en yüksek difenolaz aktivitesini dopa ve kafeik asit substratları göstermiştir. Tirozinin kullanıldığı durumlarda ise tüm uygulamalarda PFO aktivitesi 0-9. saatte artmış, 12. saatteki düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.1 D).

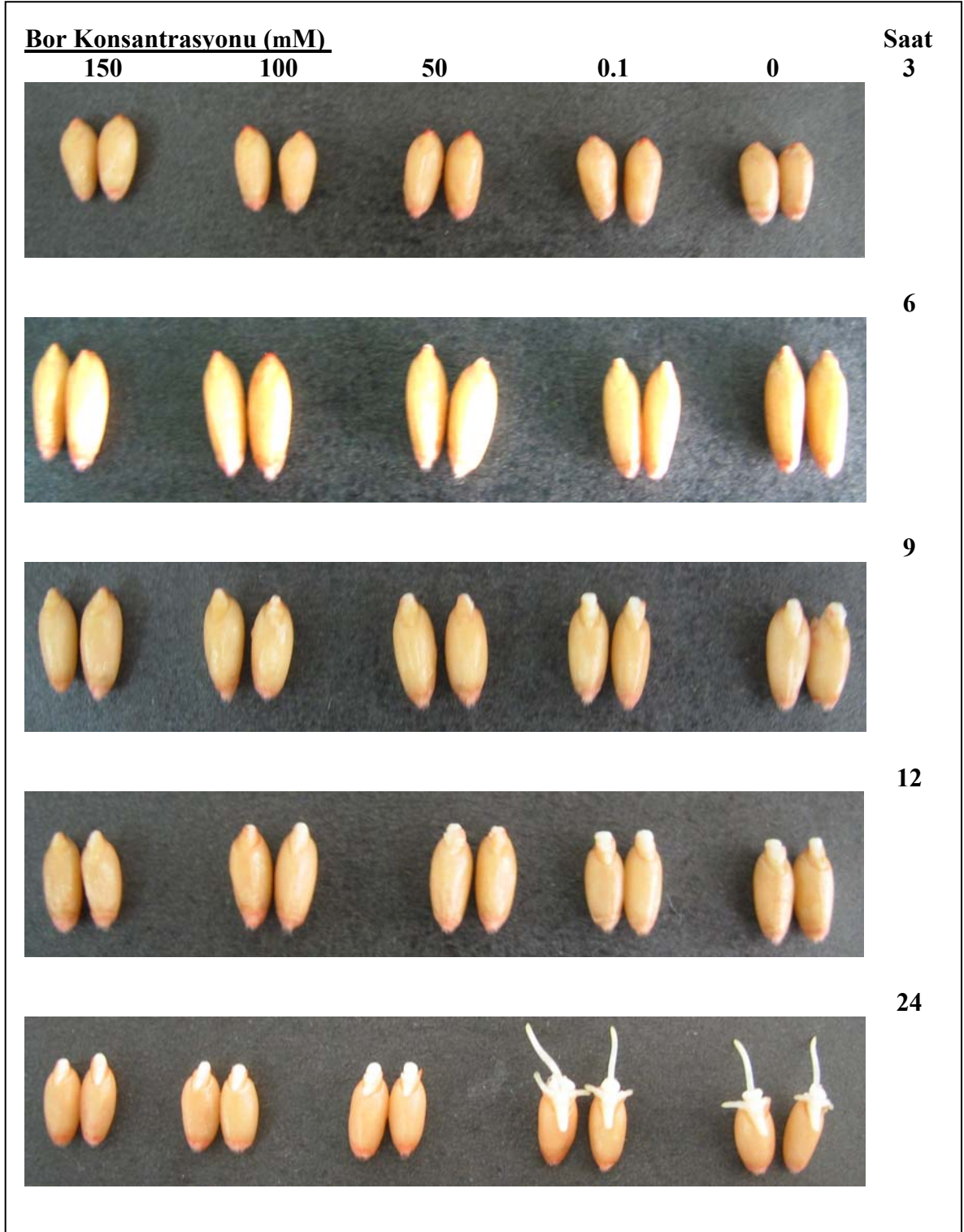
Kıraç-66 tohumlarının endosperm dokularında PFO aktivitelerindeki değişime bakıldığında 0, 0.1 ve 50 mM B uygulamalarının benzer sonuçlar verdiği bulunmuştur. Katekol substratı ile deney süresince tüm uygulamalarda PFO aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 3.3.1 E). Dopa ve kafeik asit substratları ile aktivite 0- 6. saatler arasında artmış 9. saatteki düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.1 F,G). Kıraç-66 varyetesinde dopa ve kafeik asit kullanılarak belirlenen difenolaz aktivitesinin hem embriyo hemde endosperm dokularında benzer oranlarda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tirozin substratı kullanıldığında aktivite 0- 6. saatler arasında artmış 9. saatteki düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.1 H). Monofenolaz aktivitesi hem embriyo hemde endosperm dokularında mevcuttur. Fakat embriyodaki maksimum aktivite 9. saatte görülmüş ve tüm B uygulamalarının aktivite üzerindeki etkisi benzer olmasına karşın endospermde maksimum aktivite değeri 6. saattedir.

Kıraç-66 varyetesinin embriyo dokularında 50, 100 ve 150 mM B, endosperm dokularında ise 100 ve 150 mM B uygulamalarının PFO aktivitesini deney süresince düşürdüğü veya değiştirmedeği bulunmuştur (Şekil 3.3.2).

Çizelge 3.2.4. Farklı B uygulamalarının Sultan-95 tohumlarında zaman bağı olarak tek ve çoklu kök oluşturma yüzdesi üzerine etkileri. Çizelgede verilen değerler ortalama \pm SE olup her uygulama için n=180-216 fidedir.

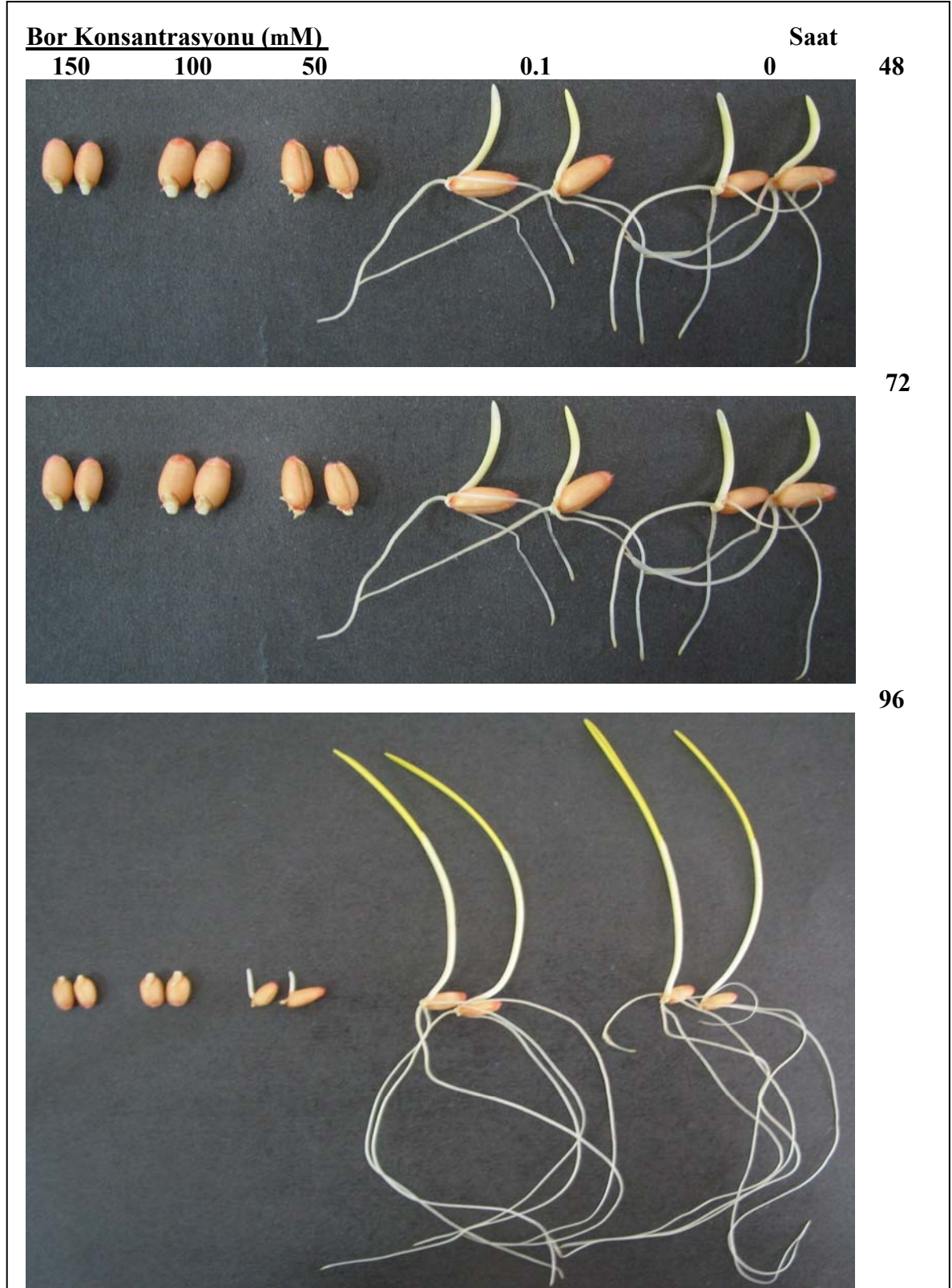
		SULTAN-95									
		Tek veya çoklu kök (%)									
B Konsantrasyonu (mM):		0	0.1	0.5	1	5	10	15	20	30	40
<u>SAAT</u> <u>KÖK</u>											
24	Tekli	58.7 \pm 2.1	62.8 \pm 1.7	55 \pm 1.2	59 \pm 1	95 \pm 2.9	98 \pm 1.7	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
	Çoklu	41.3 \pm 2.1	37.2 \pm 1.7	45 \pm 1.2	41 \pm 1	5 \pm 2.9	2 \pm 1.7	0	0	0	0
48	Tekli	0	0	11.3 \pm 2.4	12.7 \pm 3.5	40.7 \pm 2.4	28 \pm 1.7	42.7 \pm 1.8	61.7 \pm 4.3	89.7 \pm 2.6	100 \pm 0
	Çoklu	100 \pm 0	100 \pm 0	88.7 \pm 2.4	87.3 \pm 3.5	59.3 \pm 2.4	72 \pm 1.7	57.3 \pm 1.8	38.3 \pm 4.3	10.3 \pm 2.6	0
72	Tekli	0	0	0	0	0	7.3 \pm 3.7	22.3 \pm 2	52.3 \pm 2.7	89.7 \pm 2.6	100 \pm 0
	Çoklu	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	92.7 \pm 3.7	77.7 \pm 2	46.7 \pm 2.7	10.3 \pm 2.6	100 \pm 0
96	Tekli	0	0	0	0	0	0	10.7 \pm 2.2	34.7 \pm 2.6	62 \pm 2.9	91 \pm 1.2
	Çoklu	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	89.3 \pm 2.2	65.3 \pm 2.6	38 \pm 2.9	9 \pm 1.2

KIRAÇ-66



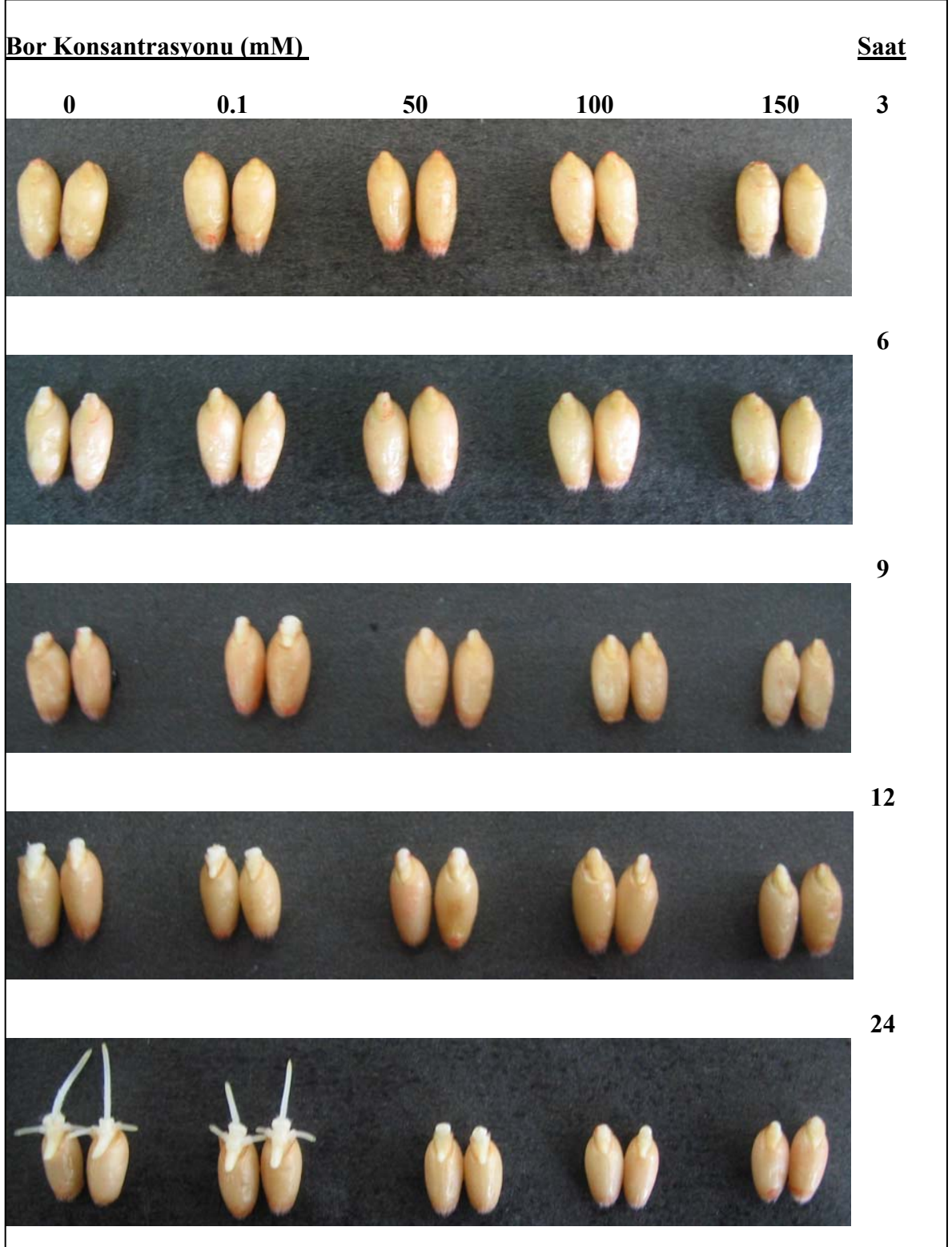
Resim 3.1.1. Kırtaç-66 tohumlarının 3., 6., 9., 12. ve 24. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi

KIRAÇ-66



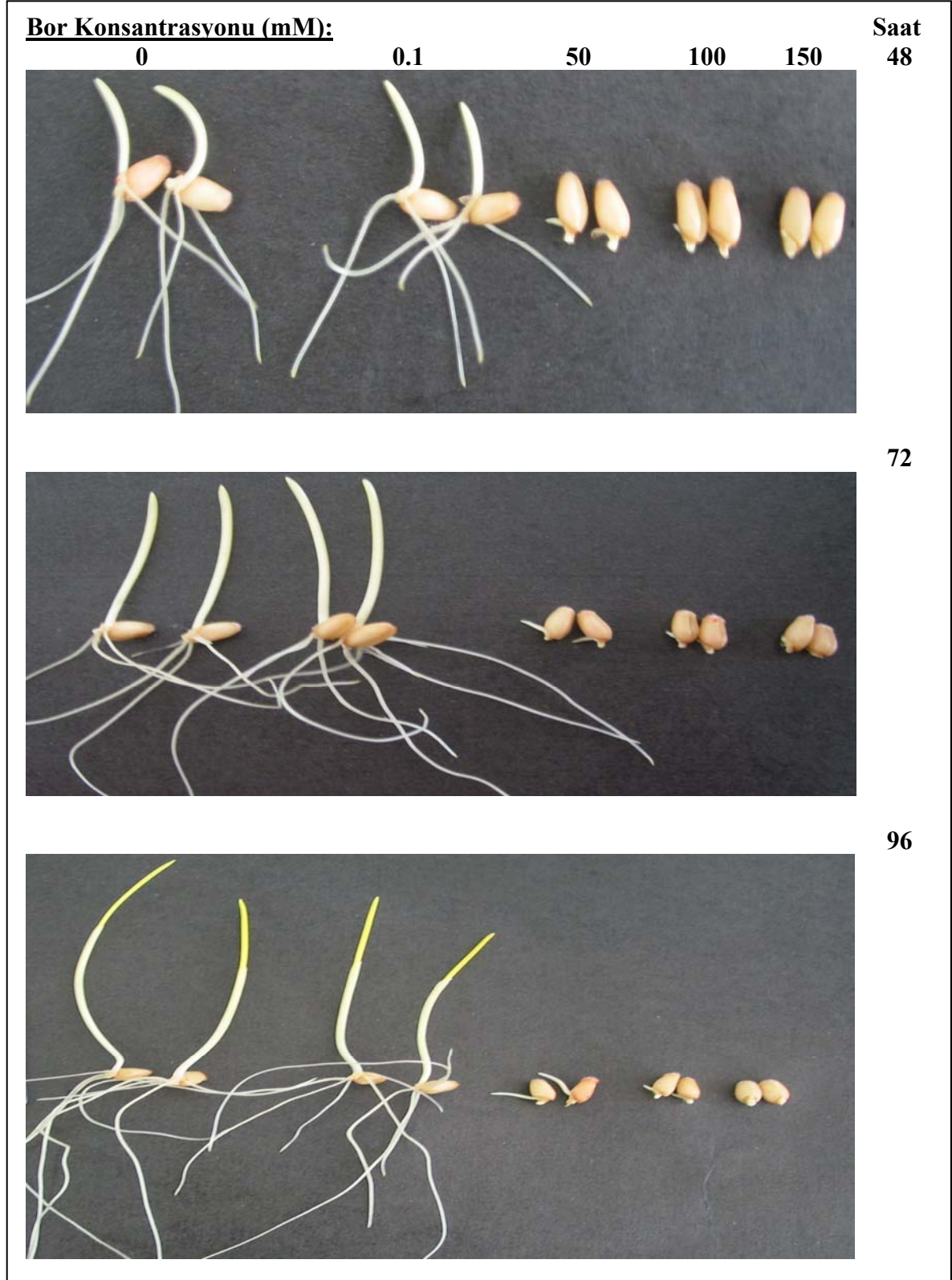
Resim 3.1.1 (devam). Kıraç-66 tohumlarının 48,72 ve 96. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi

SULTAN-95



Resim 3.1.2. Sultan-95 tohumlarının 3., 6., 9., 12. ve 24. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi

SULTAN-95

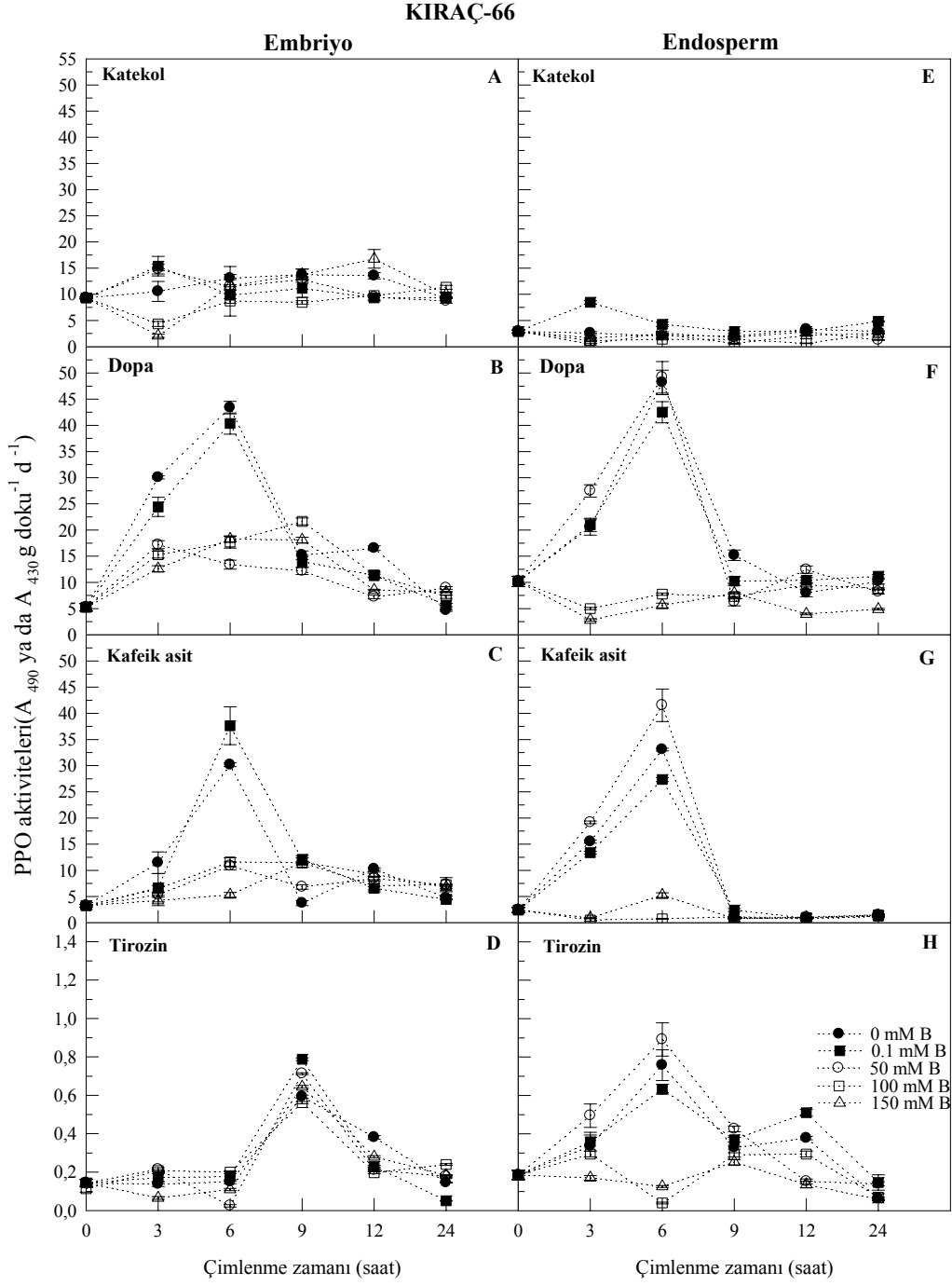


Resim 3.1.2 (devam). Sultan-95 tohumlarının 48,72 ve 96. saatlerdeki çimlenme ve fide gelişimi

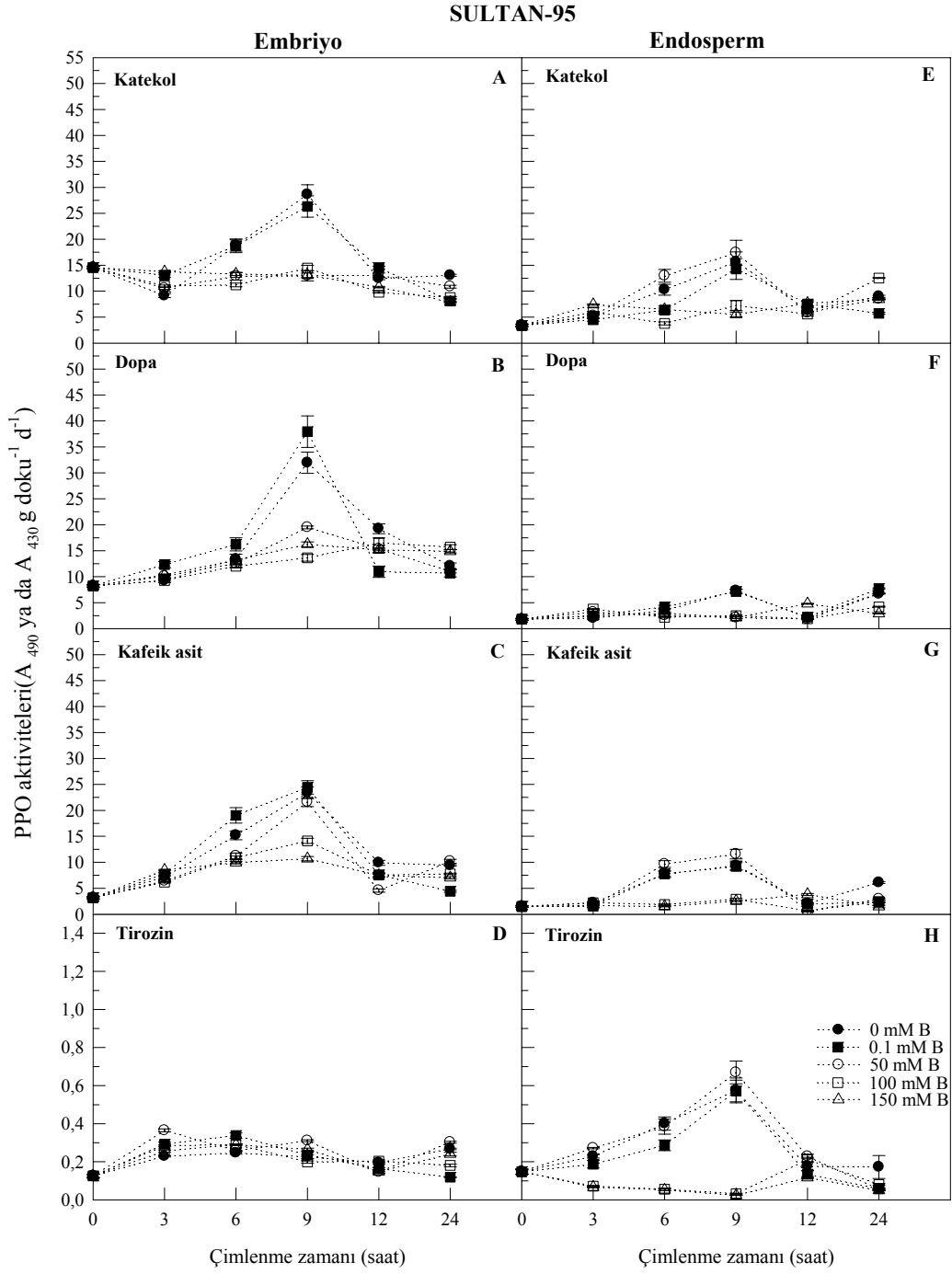
Sultan-95 tohumlarının embriyo dokularında PFO aktivitesindeki değişimin katekol kullanılarak belirlendiği 24 saat boyunca 0 ve 0.1 mM B uygulamaları birbirine benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 3.3.2 A). Aktivite 0-9. saatler arasında artmış ve 12. saatteki belirgin düşüşten sonra değişmemiştir. Dopa ve kafeik asidin substrat olarak kullanıldığı durumlarda PFO aktivitesindeki değişim katekolle benzerdir (Şekil 3.3.2 B,C). Embriyoda en yüksek difenolaz aktivitesini dopa göstermiştir. Tirozinin kullanıldığı durumlarda ise deney süreci boyunca tüm uygulamalarda PFO aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 3.3.2 D).

Sultan-95 tohumlarının endosperm dokularında PFO aktivitelerindeki değişime bakıldığında 0, 0.1 ve 50 mM B uygulamalarının benzer sonuçlar verdiği bulunmuştur. Katekol ve kafeik asit substratları ile aktivite 0- 9. saatler arasında artmış 12. saatteki düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.2 E,G). Dopanın kullanıldığı durumda ise deney süresi boyunca tüm uygulamalarda PFO aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 3.3.2 F). Sultan-95 varyetesinde difenolaz aktivitesinin embriyo dokularında endosperm dokularından çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan monofenolaz aktivitesinin ise endosperm dokusunda embriyodan yüksek olduğu bulunmuştur. Tirozin substratı kullanıldığında aktivite 0- 9. saatler arasında artmış 12. saatteki düşüşten sonra değişmemiştir (Şekil 3.3.2 H).

Sultan-95 varyetesinin embriyo dokularında 50, 100 ve 150 mM B, endosperm dokularında ise 100 ve 150 mM B uygulamalarının PFO aktivitesini deney süresince düşürdüğü veya değiştirmediği bulunmuştur (Şekil 3.3.2).



Şekil 3.3.1 Bor uygulamalarına tabii tutulan Kırac-66 buğday tohumlarının çimlenme sürecinde embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitesinin zamana göre değişimi. Aktiviteler katekol (A,E), dopa (B,F), kafeik asit (C,G) ve tirozin (D,H) substratları kullanılarak belirlenmiştir. Grafik üzerindeki her nokta birbirinden bağımsız üç deneyin ortalaması olup dikey çizgiler standart hataları göstermektedir.



Şekil 3.3.2. Bor uygulamalarına tabii tutulan Sultan-95 buğday tohumlarının çimlenme sürecinde embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitesinin zamana göre değişimi. Aktiviteler katekol (A,E), dopa (B,F), kafeik asit (C,G) ve tirozin (D,H) substratları kullanılarak belirlenmiştir. Grafik üzerindeki her nokta birbirinden bağımsız üç deneyin ortalaması olup dikey çizgiler standart hataları göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Çimlenme ortamındaki B konsantrasyonunun 50 mM' in üzerine çıktığı durumlarda her iki buğday varyetesinin çimlenme hızı 0 ve 0.1 mM B' a göre düşmeye başlamıştır. Sultan-95 varyetesinin Kıraç-66' ya göre yüksek B' a karşı daha hassas olduğu görülmüştür. Yüksek B konsantrasyonlarının çimlenme üzerindeki olumsuz etkileri diğer çalışmalarda da bildirilmiştir. Örneğin mısırdaki 10 mM B'un üzerindeki konsantrasyonlar çimlenme oranını düşürürken [71, 72], bir dikotil bitki olan bezelyede çimlenmenin 93 µM B' da inhibe edildiği bildirilmiştir [73]. Bitki türleri arasında B ihtiyacı bakımından büyük farklılıklar olduğu, bir tür için optimal sayılabilecek bir değer diğer bir tür için toksik olabileceği bildirilmiştir [26]. Bitkilerin B ihtiyacına göre yapılan sınıflandırmada, en düşük düzeyde B ihtiyacı olan bitkilerin gramineler olduğu, B eksikliğinde normal vejetatif büyümenin devam ettiği ve reproduktif safhada ise B eksikliği semptomlarının görüldüğü bildirilmiştir [74]. Bor toksikliğinin çimlenme üzerindeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında ise monokotil bitkilerin dikotillere nazaran daha toleranslı olduğu söylenebilir.

Borun çimlenme üzerindeki olumsuz etkisi 50 mM' dan yüksek konsantrasyonlarda görülmeye başlarken, fide gelişimini engelleyici etki çok daha düşük konsantrasyonlarda görülmüştür. Kök ve gövde gelişimi 5 mM B' dan yüksek konsantrasyonlarda giderek azalmış 100 ve 150 mM da ise tamamen inhibe edilmiştir. Genel olarak her iki varyetede de kök gelişimi gövde gelişimden daha fazla olumsuz yönde etkilenmiştir.

Bor uygulamalarının çimlenme ve fide gelişimi yanında embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitesi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda B (0 ve 0.1 mM) uygulanan Sultan-95 tohumlarının çimlenmesi sırasında difenolaz aktivitesi embriyoda endospermden daha yüksek iken, monofenolaz aktivitesi endospermden daha fazladır. En yüksek difenolaz aktivitesini 9. saatte dopayı okside eden PFO göstermiştir. Çimlenme sırasında PFO aktivitesinde görülen değişimler düşük B uygulamalarında Kıraç-66 varyetesinde Sultan-95' den farklılıklar göstermektedir. Bu varyetede difenolaz ve monofenolaz aktivitesi hem embriyo hemde endosperm dokularında fazladır. En yüksek difenolaz aktivitesini 6. saatte dopa ile kafeik asidi okside eden PFO göstermiştir. Kıraç-66 varyetesinde PFO aktivitesindeki maksimum değer 6. saatte görülürken Sultan-95 varyetesinde 9. saattedir.

Polifenol oksidaz aktivitesi bitki türleri, varyeteler, dokular ve tohum büyüklüğüne göre farklılıklar gösterebilir. Buğdayda PFO proteinin iki gen ailesi tarafından kodlandığı, toplam 6 genin transkripsiyon verdiği ve bu genlerin bazılarının tohum bazılarının ise diğer bitki dokularında aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca olgun olmayan buğday tohumlarında PFO

proteinleri daha fazla iken olgun tohumlarda ise PFO aktivitesinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Buğday varyeteleri arasında tohumda PFO aktivitesinde farklılıklar olduğu ve dopayı okside eden PFO' un yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur [75]. Bu çalışmada da Kıraç-66 ve Sultan-95 varyetelerinde PFO aktivitelerinin farklı olduğu ve TİGEM tarafından soğuk ve kuraklığa dayanıklı bir varyete olduğu bildirilen Kıraç-66' nın daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Bitkilerde PFO' ların biyolojik rolleri tam olarak belirlenememiş olsa da bu enzimin aktivitesinin mekanik yaralanma, fungal veya bakteri enfeksiyonu, jasmonik asit, metil jasmonat ve salisilik asit gibi sinyal moleküller tarafından artırıldığı bilinmektedir [49,44]. Bu çalışmada 0, 0.1 ve 50 mM B uygulanan tohumların çimlenmesi sırasında PFO aktivitesinde görülen artışlar tohum dokularının radikula çıkışıyla beraber meydana gelen yaralanmaya karşı bir savunma cevabı olabilir. Nitekim domates tohumlarında yapılan bir çalışmada, çimlenme sırasında radikula belirmesinden hemen sonra mikropiler endospermde PFO aktivitesinin önemli derecede arttığı [76], mısır tohumlarının çimlenmesi sırasında da embriyo ve endosperm dokularında PFO aktivitesinde artış görüldüğü bildirilmiştir [71].

Yüksek konsantrasyonlarda B uygulamaları (100 ve 150 mM) her iki buğday varyetesinde embriyo ve endosperm dokularındaki PFO aktivitelerini düşük B' a göre etkilememiş veya düşürmüştür. Benzer şekilde mısır üzerinde yapılan diğer bir çalışmada yüksek B' un (10 ve 20 mM B) çimlenme sırasında embriyo ve endospermdeki PFO aktivitelerini düşürdüğü bildirilmiştir [71]. Bor eksikliği veya toksikliğinin çeşitli bitkisel dokularda PFO aktivitesini düşürdüğünü veya artırdığını gösteren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bor eksikliği ayçiçeği [77] ve tütün yapraklarında [36] PFO aktivitesini artırırken, kabak köklerinde ise düşürmüştür [78]. Bor stresi yanında diğer abiyotik streslerinde PFO aktivitesini engellediğini gösteren çalışmalar vardır. Örneğin tuz stresinin fasulye ve mısır tohum dokularında [79] ve Cu stresinin ise şeker pancarı yaprak dokularında [80] PFO aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur.

Genel olarak değerlendirildiğinde ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan B buğday tohumlarının çimlenmesini geciktirmekte, fide gelişimini tamamen inhibe etmekte ve bitkilerin savunma sisteminde rol alan PFO aktivitesini düşürmektedir. Çeşitli sebeplerle topraktaki B' un bitkiler için toksik seviyeye gelmesi ürün kayıplarına neden olacaktır. Dolayısıyla B' a dayanıklı varyetelerin ekimi tercih edilmelidir. Diğer taraftan genellikle strese dayanıklı bitkilerde PFO aktivitesi yüksek olmaktadır. Polifenol oksidazların enzimatik kararım reaksiyonlarındaki temel rolü göz önüne alındığında, yüksek PFO aktivitesi buğday ve buğday ürünlerinde kararım probleminin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu nedenle de çoğunlukla düşük

PFO aktivitesine sahip buğday varyetelerinin ekimi tercih edilir. Reprodüktif safhada B' a daha fazla ihtiyaç duyan monokotil bitkilere tane oluşumu döneminde B' lu gübreler verilmesi PFO aktivitesinin düşürülmesine yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Ediz. N., Özdağ. H., 2001, Bor mineralleri ve ekonomisi. DPÜ Fen Bilimleri Dergisi. Sayı: 2, 133-152 s.
- [2] Yılmaz, A., 2002, Her derde deva hazinemiz bor, Bilim ve Teknik, Sayı:414, 38-48 s.
- [3] Shorrocks, V. M., 1997, The occurrence and correction of boron deficiency, Plant and Soil, 193, 121-148 p.
- [4] Perica, S., Brown, P. H., Connell, J. H., Nyomora, A. M. S., Dordas, C. And Hu, H., 2001, Foliar boron application fertility and fruit set of olive, Hort Science, 36(4), 714-716 p.
- [5] Brown, P. H., Bellaloi, N., Hu, H. and Dandekar, A., 1999, Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency, Plant Physiology, 119, 17-20 p.
- [6] Blevins, D. G., Lukaszewski, K. M., 1998, Boron in plant structure and function, Plant Physiology Plant Molecular Biology, 49, 481-500 p.
- [7] Mengel, K. And Kirby, E. A., 1979, Boron, Principles of Plant Nutrition, 2nd edi., International Potash Institute, Switzerland, 483-494, 593 p.
- [8] Papadakis, I. E., Dimassi, K. N. and Therios, I. N., 2003, Response of two citrus genotypes to six boron concentration and distribution of nutrients, total absorption and nutrient use efficiency, Australian Journal of Agricultural Research, 54, 571-580 p.
- [9] Zhao, D., Oosterhuis, D. M., 2002, Cotton carbon Exchange, nonstructural carbohydrates, and boron distribution in tissues during development of boron deficiency, Field Crops Research, 78, 75-87 p.
- [10] Taban, S. And Erdal, I., 2000, Bor uygulamasının değişik buğday çeşitlerinde gelişme ve toprak üstü aksamda bor dağılımı üzerine etkisi, Turk Journal of Agricultural Forestry, 24, 255-262 s.
- [11] Picchioni, G. A. and Miyamota, S., 1991, Boron uptake and effects on growth and carbohydrate partitioning of pistachio seedling, Journal of American Society Horticulture Science, 116(4), 706-711 p.
- [12] Reid, R. J., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. C. R. AND Graham, R. D., 2004, A critical analysis of causes of boron toxicity in plants, Plant Cell and Environment, 25, 1405-1414 p.
- [13] Kacar B., 1984, Bitki Besleme, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 256-257, 317 s.
- [14] Brown, J. C., and Ambler, J. E., 1973, Genetic control of uptake and a role of boron in tomato. Soil Science Society of America, 37, 63-66 p.

KAYNAKLAR (Devam)

- [15] Hudak, J., 1973, Effect of boric acid on the division and elongation of cells in root tip of *Vicia faba* (L.) cv, *Povazsky Acta Fac Rerum Nat Univ Comenianae*, Plant Physiology, 6, 119-126 p.
- [16] Loomis, W.D. and Durst, R.W., 1992, Chemistry and biology of boron, *Biofactors*, 3, 229-239 p.
- [17] Hu, H., Brown, P.H. and Labavitch, J.M., 1996, Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin, *Journal of Experimental Botany*, 295, 227-232 p.
- [18] Kukier, U. and Sumner, M.E., 1996, Boron availability to plants from coal combustion by products, *Water, Air and Soil Pollution*, 87, 93-100 p.
- [19] Nable, R. O., Banuelos, G. S. And Paul, J. G. 1997, Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193, 181-198 p.
- [20] Rerkasem, B., Lodkaew, S., and Jamjod, S., 1990, Assesment of grain set failure and diagnosis for boron deficiency in wheat, 500-504 p.
- [21] Paull, J.G., Cartwright, B., Rathjen, A.J., 1988, Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron, *Euphytica*, 39, 137-144p.
- [22] Huang, C., and Graham, R. D., 1990, Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at the cellular level, *Plant and Soil* 126, 295-300 p.
- [23] Shopova, M., Petrovska, D., Musalevski, A., Najcevska, C. and Sekovski, Z., 1981, "Cytogenetical and morphological effect of general toxicity caused with different concentrations of boron", *Mutat Res.*, 85, 229-236 p.
- [24] Kluge, R. and Podlesak, W., 1985, Plant critical levels for the evaluation of boron toxicity in spring barley (*Hordeum vulgare L.*), *Plant Soil*, 83, 381-388 p.
- [25] Sage, R.F., Ustin, S.L. and Manning, S.J., 1989, Boron toxicity in the rare serpentine plant, *Streptanthus morrisonii*, *Environ Pollut.*, 61, 77-93 p.
- [26] Marshner, 1997, Functions of mineral nutrition: micronutrients, *Mineral Nutrition of Higher Plant*, Academic Press, San Diego, 313-404, 889 p.
- [27] Lovatt, C.J. and Bates, L. M. 1984, Early Effects of Excess Boron on Photosynthesis and Growth of *Cucurbita pepo*, *Journal of Experimental Botany*, 35, 297-305 p.
- [28] Paul, J. G., Nable, R. O., Mateme, M. A., and Rathjen, A. J., 1992, Response of annual medics (*Medicago ssp.*) and field peas (*Pisumsativum*) to high concentrtrion of boron: genetic variation and the mechanism to tolerance, *Australian Journal of Agricultural Research*, 43, 203-213 p.
- [29] Nable, R. O. 1988, Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination oh the resistance mechanism, *Plant and Soil*, 112, 45-52 p.

KAYNAKLAR (Devam)

- [30] Beyer, K.H., Bergfeld, W.F., Berndt, W.O., Boutwell, R.K., Carlton, W.W., Hoffmann, D.K. and Schroeter, A.L., 1983, "Final report on the safety assessment of sodium borate and boric acid", *J Am Coll Toxicol*, 2, 87-125 p.
- [31] Loomis W.D., and Durst, R. W. 1992, Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3, 229-239 p.
- [32] El-Shintinawy, F., 1999, Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves, *Photosynthetica*, 36, 565-573 p.
- [33] Lauchli, A. AND Bieleski, R. L., 1983, Inorganic plant nutrition, *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Volume 15B*, Edi: A. Pirson Göttingen, M. H. Zimmermann, Springer-Verlag, Berlin 626-650, 870 p.
- [34] Ruiz, J. M., Bretones, G., Baghour, M., Ragala, L., Belakbir, A. and Romero, L., 1998, Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves, *Phytochemistry*, 48, 269-272 p.
- [35] Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H., 2005, Deposition of suberin in root of soybean induced by excess boron, *Plant science*, 168, 347-405 p.
- [36] Camocho-Cristobal, J. J., Anzellotti, D., Gonzales-Fontes, A., 2002, Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 997-1002 p.
- [37] Cara, F., Sanchez, E., Ruiz, J. M. and Romero, L., 2002, Is phenol oxidation responsible for the short-term effect of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash root?, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 853-858 p.
- [38] Pfeiffer, H., Dannel, F. and Römheld, V., 1998, Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants?, *Physiologia Plantarum*, 104, 479-485 p.
- [39] Arnon, D. I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenol oxidase in *Beta Vulgaris*, *Plant Physiology*, 24, 1-15 p.
- [40] Newman, S.M., Eanetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., de Vincente, M.C., Tanksley, S.D., and Steffens, J. C., 1993, Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family, *Plant Molecular Biology* 21, 1035-1051 p.
- [41] Mayer, A.M., 1987, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry* 26, 11-20 p.
- [42] Koussevitzky, S., Ne'eman, E., Sommer, A., Steffens, J.C., and Harel, E., 1998, Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase: Processing polyphenol oxidase and other imported precursors, *The Journal of Biology Chemistry*, 273, 27064-27069 p.

KAYNAKLAR (Devam)

- [43] Sommer A., Ne'eman E., Steffens J. C., Mayer A. M., and Harel E. (1994), Import, targetting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 105, 1301-1311 p.
- [44] Thipyapong P., Stout M. J., Attajarusit J., 2007, Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense technology, *Molecules*, 12, 1569-1595 p.
- [45] Vaughn, K.C., Lax, A.R. ve Duke, S.O., 1988, Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function, *Physiolgia Plantarum*, 72, 659-665 p.
- [46] Ho, K-K., 1999, Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda "Christine 130"*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 841-848 p.
- [47] Nun, N. B., Mayer, A.M., 1999, Culture of and pectin methylesterase and polyphenol oxidase in *Cuscuta campestris*, *Phytochemistry*, 50, 719-727 p.
- [48] Nagai, T., Suzuki, N., 2001, Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa L.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3922-3926 p.
- [49] Mayer A. M., 2006, Polyphenol oxidase in plants and fungi: Going places?, A review, *Phytochemistry*, 67, 2318-2331 p.
- [50] Chevalier, T., de Rigal, D., Mbeguie, D. M-A., Gaillard, F., Forget, F. R., and Lycaon, B.R. F., 1999, Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase, *Plant Physiology*, 119, 1261-1269 p.
- [51] Cano, M.P., Lobo, M.G., Ancos, B., Galeazzi, M.A.M., 1996, Polyphenol oxidase from Spanish Hermaphrodite and female papaya fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3075-3079 p.
- [52] Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, I., 1997, Polyphenol oxidase from *Allium sp.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2861-2863 p.
- [53] Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. and Aubert, S.Y., 1994, Enzymatic browning reactions in apple and apple products, *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 34, 109-157 p.
- [54] Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Canovas, F. G., 1995, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from verdedoncella apple, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2807-2812 p.
- [55] Espin, J.C., Trujano, M.F., Tudela, J., ve Canovas, F.G., 1997, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas Avocado, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (4), 1091-1096 p.
- [56] Friedman, M., 1996, Food Browning and Its Prevention, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653 p.
- [57] Friedman, M., 1997, Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540 p.

KAYNAKLAR (Devam)

- [58] Arslan, O., Temur, A. ve Tozlu, I., 1998, Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca L.*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1239-1241 p.
- [59] Zhang, X. ve Flurkey, W.H., 1997, Phenoloxidase in Portabella mushrooms, Journal of Food Science, 62, 97-100 p.
- [60] Ratcliffe, B., Flurkey, W.H., Kuglin, J. ve Dawley, R., 1994, Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushroom, Journal of Food Science, 59, 824-827 p.
- [61] Gregory, R. P. F. and Beendall, D. S. 1966, The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinesis, L.*), The Biochemical. Journal, 101, 569-581 p.
- [62] Thipyapong, P., Hunt, M.D., Steffens, J.C., 2004, Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility, Planta, 220, 105-117 p.
- [63] Li, L., Steffens, J.C., 2002, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance, Planta, 215, 239-247 p.
- [64] Wang, J., Constabel, C.P., 2004, Polyphenol oxidase overexpression in transgenic Populus enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*), Planta, 220, 87-96 p.
- [65] Kruzmane, D., Jankevica, L., Ievinsh, G., 2002, Effect of regurgitant from *Leptinotarsa decemlineata* on wound responses in *Solanum tuberosum* and *Phaseolus vulgaris*, Plant Physiology, 115, 577-584 p.
- [66] Veljovic-Jovanovic, Kukavica, B, Navari-Izzo, F. 2008. Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiologia Plantarum*, 132, 407- 416.
- [67] Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü. TİGEM’de Üretilen Sertifikalı Tohumluklar.
- [68] Kocaçalışkan İ. ve Kabar, K., 1990, Effect of salinity on polyphenol oxidase during seed germination, *Doğa: Botanik*, 15, 41-49 p.
- [69] Kocacalışkan, I., Demir, Y. And Kabar, K., 1995, A study on polyphenol oxidase activity during seed germination, *Phyton(Horn,Austria)*, 35, 37-43 p.
- [70] Jennings P. And Duffus C.M 1977, Effect of gibberellic acid on polyphenol oxidase activity in de-embryonated wheat and barley grains, *New Phytology*, 78, 383-389 p.
- [71] Olcer, H., Kocacalışkan, I., 2007, Excess boron reduces polyphenol oxidase activities in embryo and endosperm of maize seed during germination, *Z.Naturforsch*, 62c, 111-115 p.
- [72] Ismail, A.M., 2003, Response of maize and sorghum to excess boron and salinity, *Biologia Plantarum*, 47, 313-316 p.

KAYNAKLAR (Devam)

- [73] Bonilla I., El-Hamdaoui A., and Bolanos L. 2004, Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress, *Plant Soil*, 267, 97-107 p.
- [74] Blevins, D. G., Lukaszewski, K. M., 1998, Boron in plant structure and function, *Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49, 481-500 p.
- [75] Anderson J.V., Fuerst E. P., Hurkman W. J., Vensel W. H., Morris C.F., 2006, Biochemical and genetic characterization of wheat (*Triticum spp.*) kernel polyphenol oxidases, *Journal of Cereal Science*, 44, 353-367 p.
- [76] Maki H. and Morohashi Y. 2006, Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds, *Plant Physiology*, 163, 1-10 p.
- [77] Pfeffer H., Dannel, F. and Römheld, V., 2001, Boron compartmentation in roots of sunflower plants of different boron status: A study using the stable isotopes B¹⁰ and B¹¹ adopting two independent approaches, *Physiologia Plantarum*, 113, 346-351 p.
- [78] Cara F.A., Sanchez E., Ruiz J.M., and Romero L., 2002, Is phenol oxidation responsible for the short-term effects of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash roots?, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 853-858 p.
- [79] Kocaçalışkan İ., Kabar K., 1990, Effect of salinity on polyphenol oxidase during seed germination, *Doğa Turkish Journal of Botany*, 15, 41-49 p.
- [80] Agarwala S. C., Chatterjee C., Sharma C. P., and Nautiyal N. 1985, Copper nutrition of sugarbeet, *Journal Experimental Botany*, 36, 881-888 p.