

2003-230



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

TARP

TÜRKİYE TARIMSAL ARAŞTIRMA PROJESİ

Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu
Agriculture Forestry and Food Technologies Research
Grant Committee

**BUĞDAY VE ARPADA BORUN TOKSİK ETKİSİNİN
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL YÖNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

PROJE NO: TARP-2366

**PROF. DR. MERAL YÜCEL
PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ ÖKTEM
DR. HOMA HAMBOOBİ
FEYZA SELÇUK**

EKİM 2001

ANKARA

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	1
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	4
TABLULARIN LİSTESİ.....	5
ÖNSÖZ.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	10
I. GİRİŞ.....	12
Bor Stresinin Moleküler Mekanizması.....	12
Bor Toksisitesinin Nedenleri.....	14
Topraktan Bor Alınımı.....	15
Bor Akümülyasyonu.....	16
Direnç Mekanizmaları.....	16
Bor Toksisitesi Semptomları.....	17
Bor Stresi Altında Fotosentez Aktivitesi.....	18
Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri.....	18
Serbest Oksijen Radikalleri ve SOD' un Koruyucu Rolü.....	19
Bor Stresini Önleme Yöntemleri.....	21
Amaç.....	23
II. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	24
2.1. Bitki Materyali.....	24
2.2 Yöntemler.....	24
2.2.1 Bitkilerin Büyütülmesi ve Stres Uygulanması.....	24
2.2.2 Protein İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	25
2.2.2.1 Protein İzolasyonu.....	25
2.2.2.2 Protein Tayini.....	25
2.2.2.3. 2-Yönlü Elektroferez.....	25
Gümüş Boyama Tekniği.....	26

2.2.3 PS-II Analizleri	28
2.2.3.1 Tylakoid Membran İzolasyonu	28
2.2.3.2 Klorofil Miktarı Tayini	28
2.2.3.3 PS-II Aktivite Tayini	28
2.2.4. İyon Geçirgenlik Testleri	29
2.2.5 Hücre Duvarı İzolasyonu ve Uronik Asit Tayini	29
2.2.5.1 Hücre Duvarı İzolasyonu	29
2.2.5.2 Uronik Asit Tayini	29
2.2.6. Enzim Aktivite Tayinleri:	30
2.2.6.1. Nitrat Reduktaz Aktivite Tayini	30
2.2.5.2. Glutamat Dehidrogenaz Aktivite Tayini	30
2.2.5.3. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	31
III. SONUÇLAR VE AÇIKLAMALAR	33
3.1. Fotosistem-II Aktivitesindeki Değişimler	333
3.2. Prolin Miktarındaki Değişimler	38
3.3. Bor Stresinin Buğday ve Arpa Kök-Gövde Uzunluk ve Ağırlıklarına Etkileri	40
3.4. Hücre Zarı Geçirgenlik Analizleri	43
3.5. Protein Profillerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	45
3.5.1 Bor Stresinin Arpa Kök ve Yaprak Protein Profilleri Üzerine Etkisi	45
3.5.2 Bor Stresinin Buğday Kök ve Yaprak Protein Profilleri Üzerine Etkisi	49
3.6. Hücre Duvarı Uronik Asit Miktarındaki Değişimler	54
3.7. Enzim Aktivitelerindeki Değişimler	57
3.7.1 Bor Stresinin Azot Reduktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	57
3.7.2. Bor Stresinin Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	59
3.7.3. Bor Stresinin SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi	62
SONUÇ	66
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 3.1. Atay (A) ve Bolal (B) varyetelerinde kontrol ve 5 gün H_3BO_3 stresi uygulanmış örneklerde fotosistem II aktiviteleri.....	34
Şekil 3.2. Anadolu (A) ve Hamidiye (B) varyetelerinde kontrol ve 5 gün H_3BO_3 stresi uygulanmış örneklerde fotosistem II aktiviteleri.....	35
Şekil 3.3. Atay, Bolal, Anadolu ve Hamidiye varyetelerindeki fotosistem II aktivite değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi.....	36
Şekil 3.4. Atay, Bolal, Anadolu ve Hamidiye varyetelerindeki klorofil miktarlarının bor stresi sonrasındaki değişimleri (% kontrol).....	37
Şekil 3.5. Bor stresi uygulanmış Atay, Bolal, Çakmak, Kunduru and Tosun varyetelerindeki yaprak prolin miktarlarının kontrol gruplarına göre değişimi (mM prolin konsantrasyonu/ g ıslak doku).....	38
Şekil 3.6. Bor stresi uygulanmış varyetelerdeki yaprak prolin miktarlarının kontrol gruplarına göre değişimi (mM prolin / g ıslak doku).....	39
Şekil 3.7. Bor stresinin Anadolu yaprak protein profilleri üzerine etkisi.....	46
Şekil 3.8. Bor stresinin Hamidiye yaprak protein profilleri üzerine etkisi.....	47
Şekil 3.9. Bor stresinin Atay yaprak protein profilleri üzerine etkisi.....	50
Şekil 3.10. Bor stresinin Bolal yaprak protein profilleri üzerine etkisi.....	51
Şekil 3.11. Bor stresinin Atay kök protein profilleri üzerine etkisi.....	52
Şekil 3.12. Bor stresinin Bolal kök protein profilleri üzerine etkisi.....	53
Şekil 3.13. 5 gün 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış buğday ve arpa türlerindeki kök-yaprak örneklerindeki NR aktivitesi değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi .	58
Şekil 3.14. 5 gün 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış buğday ve arpa çeşitlerinin kök-yaprak örneklerindeki NR aktivitesi değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi	60
Şekil 3.15. Bor stresi uygulanmış buğday ve arpa varyetelerindeki SOD izoenzim aktivite değişimleri.....	63

TABLULARIN LİSTESİ

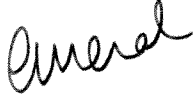
Tablo 1.1. Bitkilerin bor ihtiyacı ve toksik bor seviyeleri.....	13
Tablo 3.1. Atay, Bolal, Anadolu ve Hamidiye varyetelerinde kontrol ve 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış örneklerde klorofil miktarları (mg klorofil/ml thylakoid özütü).....	37
Tablo 3.2. 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış Atay varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları.....	40
Tablo 3.3. 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış Bolal varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları.....	41
Tablo 3.4. 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış Anadolu varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları.....	41
Tablo 3.5. 10 mM H_3BO_3 stresi uygulanmış Hamidiye varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları.	41
Tablo 3.6. Atay, Bolal (buğday) ve Anadolu, Hamidiye (arpa) varyetelerinde 10 mM H_3BO_3 stresi sonrasında hücre zarlarında oluşan yüzde zarar. (% zarar)	43
Tablo 3.7. Atay, Bolal, Anadolu ve Hamidiye varyetelerinde 10 mM H_3BO_3 stresi sonrasında hücre zarlarında oluşan yüzde zarar. (% zarar).....	43
Tablo 3.8. Anadolu (bora dirençli) ve Hamidiye (bora hassas) arpa çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası yaprak proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.	48
Tablo 3.9. Anadolu (bora dirençli) ve Hamidiye (bora hassas) arpa çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası kök proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.	48
Tablo 3.10. Bolal (bora dirençli) ve Atay (bora hassas) buğday çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası yaprak proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.....	49
Tablo 3.11. Atay ve Bolal çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim.	54
Tablo 3.12. Atay ve Bolal çeşitlerinin kök dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim.	55
Tablo 3.13. Hamidiye ve Anadolu çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim.....	55
Tablo 3.14. Hamidiye ve Anadolu çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim.....	55

ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TARP-2366 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Raporla ilgili bütün deneyler ODTÜ Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Bu proje kapsamında 1 Doktora ve 2 Yüksek Lisans tezi tamamlanmış, 3 yurtdışı yayın yapılmıştır. Projenin gerçekleşmesinde yardımları olan tüm araştırmacılara, kritikleri ve katkılarından dolayı raportörlere teşekkür ederiz.

TÜBİTAK-TOG TAG grubuna desteklerinden dolayı şükranlarımızı sunarız.



Prof. Dr. Meral Yücel
ODTÜ Biyoloji Bölümü
Proje Yöneticisi



Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem
ODTÜ Biyoloji Bölümü

Ekim 2001
Ankara

ÖZET

Bu çalışmada toksik bor derişiminin buğday ve arpanın dirençli ve hassas olarak tanımlanmış çeşitleri üzerindeki etkisi, biyokimyasal ve fizyolojik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Bunun için ekmeklik buğday çeşitlerinden (*Triticum aestivum*) Bolal (dirençli) ve Atay (hassas), ve arpa çeşitlerinden (*Hordeum vulgare*) Anadolu (dirençli) ve Hamidiye (hassas) kullanılmıştır. Bor derişimi 10 mM H₃BO₃ olacak şekilde on gün normal koşullarda büyütülmüş bitkilere 5 gün süre ile uygulanmıştır. Analizler strese maruz bırakılmış ve stres uygulanmamış (kontrol) bitkilerin kök ve yaprak dokuları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Proje esnasında tüm çeşit ve dokularda aşağıda belirtilen analizler gerçekleştirilmiştir. Yaş-kuru ağırlık, kök-yaprak uzunlukları, fotosistem-II (FSII) aktiviteleri, klorofil ve prolin miktarları, hücre zarında oluşan hasarın tespiti amacıyla ion geçirgenlik testleri, iki boyutlu elektroforez (2D-PAGE) yöntemiyle protein profillerindeki değişim, hücre duvarı üronik asit miktarındaki değişimler, azot redüktaz (NR), glutamat dehidrogenaz (GDH) ve süperoksit dismütaz (SOD) enzim aktivitelerindeki değişimler.

Bor toksisitesi altında tüm çeşitlerin FSII aktivitelerinde önemli sayılabilecek (%43 ila %95) düşüşler gözlenmiştir. Dirençli çeşitlerde oluşan düşüşün hassas çeşitlere oranla daha az olduğu gözlenmiştir. Hassas arpa çeşidi Hamidiye dışında yine tüm çeşitlerin klorofil miktarlarında da %19 ila %49 seviyesinde bir azalma saptanmıştır.

Prolin miktarlarındaki değişimler çeşitler arasında farklılık göstermektedir. Buğday çeşitlerinde bor stresi altında hem kök hem de yaprak dokularında %30 ila %60 arasında bir artış gözlenmektedir. Arpa çeşitlerinde ise bor stresi altında kontrola oranla daha düşük prolin miktarlarına rastlanmıştır. Prolin değişimleri açısından hassas ve dirençli çeşitler arasında tutarlı bir paralellik olmadığı gözlenmektedir.

Bor stresi çeşitlerin yaprak ve kök uzunluklarını belirgin bir şekilde etkilemezken, en belirgin değişiklik dirençli ve hassas buğday çeşitlerinin kök ağırlıkları arasında gözlenmiştir.

İyon geçirgenlik testleri sonucunda, bor toksisitesinin tüm çeşit ve dokuların hücre zarlarında önemli seviyede hasara neden olduğu gözlenmiştir. Kök dokularında hassas çeşitlerde oluşan zararın, dirençli çeşitlere oranla daha yüksek olduğu gözlenen, yaprak dokularında bu paralellik gözlenmemiştir. Buna ek olarak arpa çeşitlerinde oluşan zararın, buğday çeşitlerine oranla daha yüksek olduğu da gözlenmektedir.

Bor stresi sonucunda buğday ve arpa çeşitlerinde kök ve yaprak dokularında protein profillerinde belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Artış veya düşüş şeklinde oluşan bu değişiklikler çeşitler arası farklılık göstermektedir. Bor stresine maruz bırakılmış arpa ve buğday çeşitlerinin köklerinde sentezlenen yeni proteinler olduğu saptanmıştır. Bu proteinlerin molekül ağırlıkları (MA) ve pI değerleri arpada MA: 35 kDa, pI: 7.8 ve buğdayda MA: 27 kDa, pI: 7.1 olarak belirlenmiştir.

Tüm çeşitlerin, stres uygulanmış ve kontrol bitkilerinden elde edilen kök ve yaprak numularında uronik asit miktarı açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Elde edilen bu bulgu uronik asit miktarının bor toksisitesinde ve direnç mekanizmasında önemli rolü olmadığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Literatürde, bor toksisitesinin azot metabolizmasında rol alan önemli enzimlerden NR, GDH ve stres koşulları altında bitkilerin savunma mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinen SOD enzim aktiviteleri üzerine etkisi ilk kez bu proje kapsamında araştırılmıştır. Bor stresini, tüm çeşitlerde ve dokularda NR aktivitesinde düşüş oluşturmaktadır. Aktivite düşüşünün yaprak dokularında (%20-%30) kök dokularına (%10-%15) oranla daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bunun aksine, yine tüm çeşit ve dokularda bor toksisitesi altında daha yüksek bir GDH enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kök dokularında gözlenen artışın (%75-%90) yaprak dokularındaki artışa (%20-%40) oranla çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Dirençli buğday çeşidinin kök dokusunda gözlenen artışın hassas çeşide oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bor stresi altında SOD aktivitesindeki değişimler çeşitlerin yanısıra yaprak ve kök dokuları arasında da farklılıklar göstermektedir. Kök dokusunda genel anlamda tüm çeşitlerin toplam SOD aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Yaprak dokularında ise toplam SOD aktivitelerinin bazı çeşitlerde artış gösterirken (Atay ve Anadolu) diğerlerinde (Bolal ve Hamidiye) düşüş göstermiştir. Hassas ve dirençli

Çeşitler arasında toplam SOD aktivitesindeki değişim açısından bir bağlantı kurulamamıştır.

Elde edilen bulgular ışığında, gerçekleştirilen analizler arasında, FSII aktivite ölçümlerinin bora dirençli ve hassas çeşitlerin belirlenmesinde kullanılabileceği gözlenmektedir.

ABSTRACT

In the present work physiological and biochemical aspects of boron toxicity in Turkish wheat and barley cultivars were investigated. Studies were conducted on wheat cultivars (*Triticum aestivum*) named Bolal (boron tolerant) and Atay (boron sensitive) and barley cultivars (*Hordeum vulgare*) named Anadolu (B tolerant) and Hamidiye (B sensitive). Boron stress was applied as 10 mM H₃BO₃ on 10 days old seedlings for 5 days. For understanding the mechanism that contributes to B-toxicity-tolerance the following experiments were conducted:

Firstly the changes in protein profiles of root and shoot tissues of wheat and barley cultivars were investigated by using 2-D- SDS PAGE electrophoresis. Boron stress caused quantitative and qualitative changes in protein patterns of both species. A newly synthesized protein Mwt of 35 kD pI: 7.8 in root of boron tolerant barley cultivars and a novel protein in root of B-tolerant wheat cultivar Mwt of 27 kDa pI:7.1 were detected. Leaf tissue electrophoretic patterns of B stressed seedlings revealed induction of numerous proteins upon boron toxicity especially in tolerant cultivars. It suggests the possibility that these proteins might have a role in B resistance mechanism in these species.

Secondly the changes in cell wall uronic acid contents upon boron toxicity were studied. The results suggested that cell wall uronic acid content does not contribute the detoxification of excess boron in wheat and barley.

At the same time the effect of boron on root and shoot proline contents were determined. For all of the wheat varieties tested proline accumulation was observed both in root and shoot tissues. However in barley under boron stress decrease was observed both in boron tolerant and sensitive varieties in both tissues.

Changes in photosystem II activities were also measured under B stress. There were decrease in PS-II activities of both species and the decrease being drastic in sensitive ones.

The changes in activities of key enzymes of nitrogen assimilation namely nitrogen reductase and glutamate dehydrogenase and SOD which is the most important enzyme of stress defense mechanism were studied under B stress both in root and shoot tissues of wheat and barley.

Total activity of nitrate reductase tended to decrease following boron toxicity in root and shoot tissues of all cultivars and this decrease was more pronounced in sensitive cultivars. Reduction of total activity of NR in root was more than in leaf tissues. Total activity of glutamate dehydrogenase increased upon boron stress in root and leaf tissues of both species. There was significant increase in the SOD activities of the tolerant varieties.

Physiological parameters such as visible symptoms, root-shoot lengths, wet-dry weight measurements were also recorded. The sensitive ones were affected more. In general decrease in shoot length and increase in root lengths were observed.

It was concluded that by using biochemical and physiological techniques it is possible to screen the B resistant wheat and barley cultivars rapidly under laboratory conditions.

I. GİRİŞ

Çevre koşullarının (sıcak, soğuk, kurak, tuzluluk gibi) yanısıra topraktaki elementlerin bileşimi ve derişimleri bitkilerin büyümelerini ve verimlerinin etkileyen önemli faktörlerdir. Örneğin Co nitrojen fiksasyonunda baklagiller için önemli bir metal iyonudur. Aynı şekilde Na iyonları C4 fotosentezi için gereklidir. Son zamanlarda silikonun fungus hastalıklarına, böcek zararlılarına, dayanıklılığı arttırmasının yanısıra Mn'nin toksik etkisini ve Zn eksikliğine karşı dirençlilik sağladığı ileri sürülmektedir (Epstein 1994).

Borda diğer eser elementler gibi eksikliği veya toksik etkisinin gözleendiği derişimler arasındaki sınır çok dardır. Bunun yanı sıra farklı bitki türleri borun derişimlerine ihtiyaç duyduğu gibi borun toksik seviyeleri de bitki türleri arasında farklılık göstermektedir.

Borun bitkiler üzerinde etkisi farklı şekillerde olup bor mineralleri ihtiva eden topraklarda alkali kurak ve yarı kurak alanlarda suni sulama yolu veya gübreleme yolları ile kendini göstermektedir. Bor, toprakta boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), colamanite ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve borate ($\text{Mg}_3\text{B}_7\text{O}_{13}\text{Cl}$) veya borik asit H_3BO_3 , $\text{B}_3\text{O}_3(\text{OH})_2$ gibi mineral formlar halinde bulunur. Halen dünya borax üretiminde ABD bir numaralı konumda olup ikinci derecedeki zengin kaynaklar ülkemizde bulunmaktadır.

Borik asitin $\{\text{B}(\text{OH})_3\}$ pKa değerinin (9.24) yüksek olması nedeniyle fizyolojik pH değerlerinde iyonik olmayan formda bulunmakta dolayısı ile alkali topraklarda iyonizasyon sözkonusu olduğundan toksik etkisini daha fazla göstermektedir (Welch, 1995). Borun bitkilere alımı, işlevi ve toksik etkileri hakkında sınırlı literatür bilgisi mevcuttur. Borun, köklerden bitkinin diğer dokularına nasıl aktarıldığına dair ise bilgi bulunmamaktadır (Welch, 1995). Topraktaki yüksek bor miktarı, bitkinin beslenmesinde önemli olan diğer elementlerin (örneğin Cu, Fe, Mn, Ca, Mg, K ve P gibi) topraktan alımında antagonist (engelleyci) etki göstermektedir. Zn varlığında, bu etkinin ortadan kalktığı veya azaldığı görülmüştür (Singh et al., 1990).

Bor Stresinin Moleküler Mekanizması

Borun bitki metabolizmasındaki etkisi çok az bilinmekle birlikte hücre bölünmesinde, hücre duvarının oluşmasında hücre zarının dayanıklılığında, karbonhidrat sentezinde ve oksin aktivitesi üzerinde etkileri ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Mengel & Kirkby,

1987). Borun bitki dokularında cis-diol şekerlerle bağ oluşturduğu veya diğer polihidroksillerle kompleks yaptığı gösterilmiştir (Matoh, 1993).

Son yıllarda borun hücre duvarının yapısında önemli rol oynadığına dair bilgiler sunulmaktadır. Hu ve arkadaşları (1996) bitkide bulunan bor miktarının hücre çeperlerinde bulunan uronik asit miktarı ile doğrudan ilintili olduğunu göstermişlerdir. Aynı grup borun pektine bağlı olduğunu da göstermiştir (Hu, 1994). Borun bitkiler üzerindeki toksik etkisi de farklı yönleri ile değişik gruplar tarafından araştırılmıştır (Nable & Paull, 1991). Bu çalışmalar özellikle toksik bor derişimlerinin verim üzerine etkisi seviyesinde ve dirençli çeşitlerin seçimine yönelik olarak yürütülmüş araştırmalardır. Borun toksik etkisinin tahıl bitkilerinin kök ve gövdelerinde akümüle edilen bor miktarı ile doğrudan ilgili olduğu, büyümeyi ve dane ağırlığını azalttığı gözlenmiştir (Holloway & Alston, 1992). Benzeri çalışmalar baklagiller üzerinde de yürütülmüş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Bagheri et al., 1992). Yürütülen bu çalışmalarda aynı bitki türünde bor toleransı açısından farklılıklar olduğu gösterilmiştir (Paull et al., 1988). Çalışmalar bu noktada toksik bor derişimlerini tolere edebilen çeşitlerin seçimine yöneltilmiştir (Bagheri et al, 1994). Bu yöntemler özellikle bitkilerin kuru doku ağırlıklarına, dokularındaki bor derişimine ve kök uzunluklarına dayandırılmaktadır (Nable, 1988, Chantachume et al, 1995, Campbell et al, 1996). Bazı bitki türlerinin bor ihtiyacını gösteren tablo 1.1 de verilmiştir.

Tablo 1.1. Bitkilerin bor ihtiyacı ve toksik bor seviyeleri

Bitki Çeşiti	Bor $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık		
	Noksanlık	Gerekli(Normal)	Toksik
Brokoli	2-9	10-71	-
Patates	<15	21-50	>50
Domates	14-32	34-96	91-415
Mısır	<9	25-90	>100
Buğday	4.6-6.0	17	>35
Arpa		4-10	
Karnıbahar		25-30	
Havuç		25-30	
Salatalık		25-28	

Görüldüğü gibi türler arasındaki bor gereksinimi farklı olmakla beraber büyüme ve gelişme için genelde monokotlar dikotlardan daha az bora gereksinim duymakta ve buna bağlı olarak toksisiteye daha kolay maruz kalmaktadırlar. Buna karşılık baklagiller bor elementine çok gereksinim duymakta ve toksisiteye en dirençli bitkiler olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Bor Toksisitesinin Nedenleri

Bor toksisitesine neden olan başlıca etkenler topraktaki bor elementi fazlalığı, fazla gübre kullanımı ve sulamada kullanılan suyun yüksek konsantrasyonda bor içermesi olarak sıralanabilir.

1. Toprakta bor fazlalığı ve akümülyasyonu

Kayalarda bulunan borun bitkilerce alınımı için uygun değildir. Bitkilerin kullanabileceği bor, topraktaki organik maddelerin ayrışması ile toprak partikülleri üzerine borun çökmesi ve emilmesi ile oluşmaktadır. Bu elemente karşı adsorpsiyon kapasitesi yüksek olan topraklar, toprak solüsyonlarında az miktarda bor içerirler (Grupta ve ark.1985).

Bitkiler tarafından bor alınımı toprak solüsyonunda bulunan bor konsantrasyonuna bağlı olup, toprak analizleri bor oranının önceden tespiti için önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle toprak bor konsantrasyonuna bakarak bor elementine bitkilerin vereceği tepki değerlendirilmelidir.

Hem toprakta bulunan hem de bitkinin alabileceği bor miktarı sulama imkanı kısıtlı olan kurak ve yarı kurak topraklarda yüksek düzeydedir. Toprakta bulunan bor tuzları boraks($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), kolemanit($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sodyum-kalsiyum tuzu, magnezyum tuzu ve borasit(MgB_2O_3) halindedir. Bitkinin topraktan alabileceği bor toprağın fiziksel özellikleri ile pH, kil miktarı, organik madde miktarı gibi kimyasal özelliklerine bağlıdır (Goldberg 1993).

2. Yüksek dozda gübreleme

Bor oranı yüksek gübre kullanımı da bor toksisitesine neden olan faktörlerden biridir. Bu nedenle bu tür gübre kullanımı engellenmelidir. Gübrelemeden hemen sonra yapılan toprak ölçümleri ve borun toprağın dip kesimlerinde akümülayonu yanlış bor miktarı tayinlerine neden olabilir (Neilsen ve Ark.,1985)

3. Bor miktarı yüksek suların kullanımı

Toprakda bulunan bor miktarının yükselmesindeki potansiyel risklerin arasında en önemlisi bor oranı yüksek olan suların sulamada kullanılmasıdır. Buna rağmen çok az sulama suyu direkt olarak bitkilere zarar verebilecek oranda yüksek bor taşır. Sulamadan meydana gelen bor toksisitesi çoğu zaman uzun süreli olarak bu tür suların kullanılması ile toprakda borun akümüle olmasından meydana gelir. Bu problem çoğu zaman az yağmur alan ya da toprağın arınması için kullanılan kaliteli suyun bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

Toprakda yüksek dozda bor elementinin bulunmasının diğer nedenleri arasında yüzey madenciliği, cam ve porselen yapımı gibi endüstriyel çalışmalar, deri üretimi, halıcılık ve fotoğraf endüstrisinde kullanılan kimyasallar sıralanabilir (Nable ve Ark., 1998).

Topraktan Bor Alınımı

Toprakta bitkilerce alınabilir bor düzeyi bitkinin bor toksisitesine mağruz kalıp, kalmayacağını en önemli göstergesidir. Fakat topraktaki borun formu bu miktarın ne kadarının bitki tarafından alınacağını tayin eden esas faktördür. Bor, bitkiler tarafından toprak solüsyonlarından küçük, nötr bir molekül olan bor asiti $B(OH)_3$ şeklinde alınır. Bu form fizyolojik pH da çözülmeyen zayıf bir asittir ($pK_a:9.1$) ve biyolojik membranlar üzerinden alınımı pasif şekilde gerçekleşir. Membranlar arası geçiş hareketi ise öncelikle yağ katmanları arasındaki ayrılıma bağlıdır. Borun pasif alınımını etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir

i. kök yüzey alanı

ii. kök membranının yapısı ve bora geçirgenliği

iii. bor alınımına olanak veren boş alan miktarı, özellikle cis-diol miktarı

iv. toprağın pH değeri (Nable,1998).

Bor Akümülyasyonu

Genelde yapraklar kök ve gövdelerden daha çok bor bulundururlar. Yaşlı yapraklarda bu oran genç yapraklara göre daha da fazladır (Sage, 1989). Akümülyasyon yüksek terleme (transpirasyon) yapan yapraklarda daha fazladır. Dokuda depolandıktan sonra bor dolaşımı kısıtlıdır.

Monokotların yapraklarında aşağıdan yukarı doğru bor konsantrasyonunun yükseldiği bilinmektedir. Bu nedenle yaprakların uç kısımları yaprak alanının az bir kısmını oluştursa da bor konsantrasyonunun büyük oranı burada toplanır. Yapraklarla karşılaştırıldığında gövdede akümüle olan miktar yüksek bor miktarlarında bile daha azdır. En az miktar bor akümülyasyonu köklerde görülür, özellikle bu oran dirençli bitkilerde daha da düşüktür (Paul ve Ark., 1992).

Direnç Mekanizmaları

Buğday ve arpada genotipleri arasında görülen bor toksisitesine karşı direnç farklılığı boru akümüle etme kapasitelerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda boron direncinin başka bir nedeni de akümüle olan bor elementinin bitkide hücre, doku ve organel düzeylerinde farklı olarak dağılımıdır (Nable,1989).

Akraba türlerde bor toksisitesine maruz kalan dirençsiz genotiplerin dirençlilere oranla daha fazla yaprak ve gövde bor konsantrasyonlarına sahip oldukları görülmüştür. Bu durum bazı tahıl ve baklagiller için de doğrulanmıştır. Buğday ve arpa için köklerin bor alımını kontrol ettiği söylenebilir (Chunyuan ve Graham 1990).

Phloem transferi ile bitkide dağılımı sağlanan bora karşı bir başka direnç mekanizması da phloem hareketsizliği olabilir. Bu mekanizma sayesinde borun metabolik aktivitesi yüksek olan bölgelere aktarılması engellenerek sadece yaprak uçlarında hapsedilmesi ile yapraklardaki kurumaya rağmen olabildiğince geniş bir fotosentez alanının korunması sağlanır.

Genotipler arasında görülen direnç farklılıkları hücresel düzeyde olabileceği gibi kök ve gövde dokularındaki yapısal organizasyon farklılıklarından da ileri gelebilmektedir. Son olarak buğdayda köklerde su alımının symplasm aracılığı ile

olabileceği bunun da bor alımında etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Bu gözlem de endodermisden daha çok kök hücre zarının ve diğer kök yapılarının bor alımında önem taşıyabileceğini göstermektedir.

Arazi çalışmaları sonunda dirençli olarak tanımlanan genotiplerin daha uzun kök aksları ve yan kökleri olduğu ancak aks uzamasının dirençli ve hassas genotiplerde farklı olmadığı anlaşılmıştır.

Direnç mekanizmasının bazı ekstra genlerden ve özel kromozom bölümlerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu tür farklı genlere bazı türlerde rastlanılmıştır. Direnç yönünden farklılığı türler arasında olduğu kadar aynı tür içinde de rastlanmaktadır. Dirençli olarak tanımlanan tahıl genotiplerinin aynı bölgeden geldikleri bilinmektedir. Bu alanlarda borun toprakta veya toprak suyunda yüksek oranda olduğu ve bitkilerde toksisite semptomlarının görüldüğü rapor edilmiştir. Bu bor fazlalığının tahıllarda seçici bir etki gösterdiğini ve bu çevrede yetişen başka türlerde de direnç gözlenebileceğini düşündürmektedir.

Ekmeklik ve makarnalık buğdayda bor direnci yarı baskın çekirdek genleri ile kontrol edilmektedir. Her iki türde de bazı bağımsız ama ekstra genlerin varlığı bilimektedir. Phenotipik olarak benzemelerine rağmen dirençli ekmeklik ve makarnalık buğday türleri genetik olarak farklılıklara sahiptirler (Chantachume 1995; Jamjod 1996).

Bor Toksisitesi Semptomları

Geniş bir yelpazede ele alındığında birçok bitki türündeki tipik bor toksisitesi semptomu yaprak yanması şeklinde tanımlanabilecek klorotik ve nekrotik değişimlerdir. Diğer semptomlar sararma, kuruma ve yapraklarda oluşan benekler olarak sıralanabilir. Bu dağılımın yapraklarda olması da elementin akümülyasyon olarak en çok yapraklarda olduğu görüşünü doğrulamaktadır.

Bu semptomlar arazide görüldüğünde herhangi bir mantardan meydana gelebilecek patolojik bir sorunla karıştırılabilir. Bu ayırımı yapmak özellikle yapraklarda birden fazla bu tür semptomların görüldüğü hallerde daha da zorlaşır.

Köklerde yapraklara oranla daha az akümüle olduğu için gözle görülen semptomlara bu dokularda rastlanmaz. Bu durum köklerde toksik derişimde bor akümüle

olamaması olarak da açıklanabilir. Fakat kök büyümesi gövde büyümesi ile karşılaştırıldığında bor toksisitesinden daha fazla etkilenir.

Buğday yapraklarında kahverengi leke oluşumu olmaz, fakat yaprak uçlarında daha sonra nekrotik boyutlara ulaşan klorotik değişimler meydana gelir. Yaprak semptomları, bora olan hassasiyeti direkt olarak göstermektedir. Sonuç olarak bor toksisitesine direnç sıralaması yaprak semptomlarına ve büyüme-gelişmedeki değişimlere bakılarak yapılabilir (Nable 1988).

Bor Stresi Altında Fotosentez Aktivitesi

Kloroplastlarda fotosentez reaksiyonlarının meydana geldiği thylakoid membranlar olarak adlandırılan yapılar bulunmaktadır. Protein klorofil kompleksleri, PS-I, PS-II ve kloroplast ATPaseleri bu yapılarda yer almaktadır.

Işık reaksiyonlar olarak adlandırılan bu reaksiyonlar sırasında ATP, NADPH ve O₂ olmak üzere üç önemli madde sentezlenir. Işık gerektiren bu reaksiyonlar fotokimyasal olup, bazı klorofil moleküllerin ışıkla aktive edilmesi ile meydana gelmektedir.

Fotosistem II kompleksi yaklaşık 20 polipeptit, 3-50 klorofil molekülü ile bazı karotenoidlerden oluşmakta olup molekül ağırlığı 300.000 dalton civarındadır. Suyun kimyasal olarak ayrıştırılması PS-II kompleksinde bulunan proteinler tarafından katalize edilmektedir. Bu proteinler thylakoid zarın lumen kısmında bulunmaktadır. PS-II aktivite tayinleri bir bitkinin fotosentezi ne ölçüde başarı ile gerçekleştirdiği hakkında fikir vermektedir. Bor toksisitesi altında fotosentez aktivitesinin düştüğü bilinmekte buna neden olarak stres sırasında yapraklarda meydana gelen hasarla fotosentez yapabilecek yaprak dokusundaki azalma gösterilmektedir (Vermaas 1995).

Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri

Yaygın kanya göre, çevresel strese maruz kalmış bitkilere çoğu zararı direkt veya indirekt olarak oluşan reaktif oksijen moleküllerinin verdiği sonucuna varılmıştır. Reaktif oksijen molekülleri olarak tanımlanan superoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (OH⁻) ve singlet oksijen (1O₂) hücre metabolizmasının

kaçınılmaz yan ürünleridir. Bu reaktif oksijen molekülleri lipid peroksidasyonuna, protein denatürasyonlarına ve DNA mutasyonlarına neden olmaktadır.

Normal fizyolojik koşullar altında bu yan ürünlerin oluşumu ile yıkımı sıkı bir kontrol altındadır. Fakat, stres koşullarında radikal oluşumları fizyolojik koşullarda bulunan oranların üstüne çıkarak oksidatif strese neden olabilir.

Bu radikaller arasında $O_2^{\cdot-}$ organizmalar için belki de en zararlısıdır. $O_2^{\cdot-}$ nin thiol grupları ve tryptophan molekülleri ile reaksiyona girdiğini ve bu reaksiyonların ölümcül boyutlar kazanabileceğini gösteren bulgular vardır. Superoksitin canlı varlıklar tarafından üretildiği buna bağlı olarak da bu canlıların superoksit miktarını kontrol edecek yöntemlere sahip olduğu bilinmektedir. Gerekinden fazla oranda bulunan superoksit, demir-sülfür içeren enzimlerin inaktivasyonuna neden olarak daha kuvvetli oksitleyici maddelerin oluşumuna ve hücrelerin zarar görmesine zemin oluşturmaktadır (Valentine ve Ark.,1998).

Serbest Oksijen Radikalleri ve SOD' un Koruyucu Rolü

Superoksit dismutaz enzimi $O_2^{\cdot-}$ ü H_2O_2 ile reaksiyona girip çok aktif hidroksil oluşumuna neden olmadan önce ortadan kaldırarak hücreleri ve dokuları oksidatif stresten korumaktadır. SOD'ın lipid peroksidasyonunu engelleyerek membran sistemlerini koruduğu yönünde bulgular vardır.

Superoksit dismutaz superoksit radikalini oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürmekten sorumludur. Oluşan H_2O_2 , katalaz ve peroksidaz enzimleri ile ortadan kaldırılmaktadır.

Superoksitin ortamdaki kaldırılması ile bu enzim direkt $O_2^{\cdot-}$ içeren ve $O_2^{\cdot-}$ nin reaksiyonları ile ortaya çıkabilecek daha aktif radikallerin oluşturulmasını engellenmektedir.

Hidroksil radikalleri bilinen en reaktif moleküllerdir. Çoğunun neredeyse tüm hücre yapıları ile reaksiyona girebildiği bu nedenle *in vivo* koşullardaki oksijen toksisitelerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

SOD'ın koruyucu rolüne birçok durumda rastlanmıştır. Bunlardan birinin sonucunda mikroorganizmaların hücre içi superoksit miktarı ile O_2 direnci ve stres altında

yaşayabilme yüzdeleri arasında kesin bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Toksik oksijen moleküllerinin stres koşulları altında arttığı ve bu durumla başa çıkabilmek için SOD aktivitesinde artışın olduğu bilinmektedir (Inci ve Ark.,1997).

SOD enziminin O_2^- nin detoksifikasyonunda rol aldığı gerçeğinden yola çıkarak SOD aktivitesi ve diğer antioksidatif enzimlerin aktivitelerinin ölçümleri dokuların ne derecede aktif oksijen moleküllerine maruz kaldığı konusunda bilgi verebileceği söylenebilir. Eldeki verilere dayanılarak aktif oksijen moleküllerinin üretilmesinin stres koşullarında genel bir uyarı mekanizması olduğu ve bunun gen ekspresyonunda çeşitli modifikasyonları başlatabileceği yargısına varılabilir.

Hücre İçinde SOD Dağılımı ve İzoenzimleri

Değişik türlerde ve hücre organellerinde SOD miktarları ve çeşitleri bakımından önemli farklılıklar vardır. Üç çeşit SOD izoenzimi bilinmektedir.

- i. Cu-ZnSOD: Çoğunlukla sitozolde ve eukaryotların kloroplastlarında bulunur. Dönüşümlü olarak KCN, dönüşümsüz olarak H_2O_2 tarafından inhibe olur.
- ii. FeSOD: Eukaryotik algalar ile bazı bitkilerde bulunur. Sadece H_2O_2 'e hassastır, KCN dan etkilenmez.
- iii. MnSOD prokaryotların mitokondiri matrikslerinde ve eukaryotlarda bulunur. Hem H_2O_2 'e hem de KCN da hassastır.

Yukarıda tanımlanan SOD izoenzimlerinin aktif metal bölümleri (bakır, demir ve manganez) SOD aktivitesi sırasında indirgenme ve yeniden oksitlenme reaksiyonlarına uğrarlar.

Genel olarak bitkiler mitokondrilerinde MnSOD, sitozollarında ve plastidlerine Cu/ZnSOD içerirler. Son zamanlarda bitkilerin plastidlerinde FeSOD taşıdıkları da kesinleşmiştir (Inze ve Van Montagu 1995, Van Camp ve Ark .,1996).

Buğday tohumlarının mitokondrilerinde MnSOD, kloroplast ve sitoplazmalarında ise iki farklı çeşit Cu/ZnSOD izoenzimi barındırdıkları bilinmektedir. Bu üç çeşit izoformun miktarlarının ve aktivitelerinin stres koşulları altında transkripsiyon

düzeyinde farklı olarak ayarlandığı ve bu değişimlerin strese dayanıklılığın bir işareti olduğu düşünülmektedir.

Bor Stresini Önleme Yöntemleri

Bor stresi ile savaşmanın şu ana kadar önerilen en etkili metodu toksik oranda bor içeren toprakların fazla oranda sulama ile bordan arındırılmasıdır. Fakat bu hem bitkilere gereksinim duyduklarından fazla su verme açısından hem de sulama sonucunda toprakta emilebilen boronun birikmesi açısından problemler taşımaktadır (Rhodes ve arkadaşları1970). Bir başka engelleyici faktör de toprağın bordan arındırılmasının diğer emilebilen tuzlara oranla daha zor olmasıdır.(Nable 1997).

Gerekli şartlarda uygulansa bile toprağı yıkama metodu her zaman iyi bir arındırma yöntemi olmayabilir. Bu metodun yanı sıra bazı toprak arındırıcılarının kullanımı da önerilebilir. Fakat genel olarak bunlar kısa süreli çözümlerdir. Bu metodlar arasında kireç, gipsiyum, ve konsantre sülfirik asit kullanımı sayılabilir.

Bazı durumlarda bor toksitesi ile başa çıkmak için toprağa Zn verilmesi ya da toksisiteden etkilenmiş bitkilere Zn içeren spreyle uygulanması da çözümler arasındadır. Bu uygulamanın temelinde çinkonun az olduğu durumlarda bor alımının ve akümülyasyonunun bitkide fazla olması bu nedenle toksisitenin artmasıdır. Zn yeteri miktarda sağlandığında ise bu durum engellenebilmektedir.

Bor toksitesinin Dünya ve Türkiyedeki Durumu

Borun bitkiler üzerindeki toksik etkisi dünyada en çok ABD, Avustralya ve Türkiyede gözlenmektedir. Topraktaki çinko eksikliği durumunda bitkilerin bor alımları arttığından (Graham, 1987, Singh et al., 1990) ülkemizde tarım yapılan alanlarda çinko eksikliğinden dolayı bor toksitesi çok daha önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (Çakmak et al., 1996). Tarım ve Köyişleri bakanlığı, tarla Bitkileri Merkez araştırma Enstitüsündeki yetkililer ile yaptığımız görüşmelerde, ülkemizin belli yörelerindeki topraklarda borun toksik seviyelere ulaştığı ve tarımsal üretimi düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca ülkemizin değişik yörelerinin topraklardaki bor derişiminin tayinine yönelik bir araştırmanın da sürdürüldüğü vurgulanmaktadır (Dr. Muzaffer Avcı ve Dr. Nusret Zencirci, 1997). İzmir ve Denizli yöresinde yeraltı termal suları (yüksek bor derişimi içermektedir) ile yapılan sera ısıtıcılığı sonrası bu

suyun çevreye verilmesi sonrası oluşan bor toksisitesinin çevrede büyük tarımsal problemler yarattığı bilinmektedir. Ayrıca ülkemizin tahıl üretim merkezi sayılan Konya ve civarındaki topraktaki borun toksik seviyelere ulaştığı ve tahıl üretimini etkileyebildiği belirtilmektedir. Yukarıda belirtilen ülkelerde bor toksisitesi nedeni ile tarımda gözlenen problemlerin çözümüne ve dirençli çeşitlerin seçimine yönelik araştırmalar rapor edilmesine rağmen ülkemizde bu yöndeki araştırmalar oldukça sınırlı kalmakla birlikte bilindiği kadarıyla moleküler seviyede araştırmalar başlatılmamıştır (Alkan et al., 1996).

Toprakta toksik düzeyde bulunan boru başta yıkama yöntemi olmak üzere değişik yöntemlerle azaltmak pratik olmayan zaman alıcı ve pahalı olan bir yöntemdir. Bu nedenle bora dayanıklı bitkilerin seçilerek ekimi ve yetiştirilmesi en iyi çözüm olarak görülmektedir. Genetik mühendisliğindeki yeni gelişmeler ile bora dirençli bitkiler oluşturmak da umut vaadeden yollardan biridir. Fakat genetik mühendisliği yöntemleri ile bora dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi zaman alacaktır. Dolayısıyla bora dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi deneme yanılma yöntemi ile dayanıklı türlerin seçimi ile olanaklıdır. Alternatif bir metod da normalde bor miktarı yüksek olan topraklarda yaşayabilen bitkilerin seçilmesi ve bunların geliştirilmesi yönündedir.

Amaç

Önerilen projenin amacı borun buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa (*Hordeum vulgariye*) bitkileri üzerinde oluşturduğu toksik etkilerin moleküler mekanizmasının biyokimyasal ve fizyolojik yöntemler kullanılarak araştırılmasıdır. Bu amaçla, bor toksisitesine hassasiyetleri farklı iki buğday çeşiti (Bolal dayanıklı , Atay hassas) ve iki arpa çeşiti (Anadolu dayanıklı, Hamidiye hassas) seçilmiştir. Amaca yönelik olarak fizyolojik yöntemlerle bor stresine maruz bırakılmış çeşitler kontrol çeşitlerle yaprak ve kök uzunlukları, yaş ve kuru ağırlık değişimleri, fotosistemII aktiviteleri ve hücre zarı ion geçirgenlikleri açısından karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal yöntemlerle superoksit dismutaz, azot redüktaz, glutamate dehidrogenaz enzim aktiviteleri ve prolin ve uronik asit miktarındaki değişiklikler araştırılmıştır.

Sonuçların aşağıda belirtilen hususlara açıklık getireceği beklenmektedir.

- i. Bor toksisitesinin incelenen sistemler üzerine etkisinin belirlenmesi
- ii. Türler ve aynı türün hassas ve dirençli çeşitlerinin bor toksisitesine gösterdiği tepkiler açısından farklılıklarından hareketle, analiz edilen sistemlerin bor toksisitesine direnç mekanizmasındaki muhtemel görevlerinin belirlenmesi
- iii. Kullanılan analiz yöntemlerinin bor toksisitesine dirençli ve hassas çeşitlerin belirlenmesinde kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesi.

II. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Bitki Materyali

Araştırmalarda ekmeklik buğday çeşitlerinden (*Triticum aestivum* cv. Bolal – dirençli ve Atay - hassas), ve arpa çeşitlerinden (*Hordeum vulgare*) Anadolu - dirençli ve Hamidiye - hassas) kullanılmıştır. Tohumlar, TKB, Tarla bitkileri Merkez Araştırma enstitüsünden temin edilmiştir.

2.2 Yöntemler

Proje kapsamında kullanılan bütün yöntemler sırası ile verilmiştir.

2.2.1 Bitkilerin Büyütülmesi ve Stres Uygulanması

Buğday ve arpa tohumları petri kaplarında %40 lık sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika boyunca yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Bu işlemin sonunda tohumlar fazla hipokloritten distile su yardımıyla arındırılırlar. Tohumlar her birine 30-35 tane olmak üzere üzerlerine tülbent gerilmiş plastik kaplarda yetiştirilirler. Yeterli miktarda distile su ile sulanırlar ve 10 gün boyunca su miktarları kontrol edilerek bitki büyüme odasında 16 saat ışıklı ve 8 saat karanlık ortamda büyüme bırakılırlar. Bu sürenin bitiminde stres uygulanacak bitkilerdeki distile su borik asitle değiştirilir ve 5 gün süreyle 10 mM borik asit stresi uygulanır. 15 inci günde bitkilerden alınan örneklerde protein ekstarksyonu, PSII analizleri, prolin ve uronik asit tayinlerine tabi tutulurlar. Benzeri şekilde strese verilen ve kontrol (stres uygulanmamış) bitkilerden elde edilen yaprak ve kök numunelerinin uzunluk ve yaş-kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her çeşit için bir kap bitki (30-35 adet) analize alınmış ve bitki başına ortalama değerler belirlenmiştir.

Enzim aktivite tayinleri için bitkiler ½ Hoagland solüsyonunda büyütülürler. Ardından 10 mM borik asit içeren solüsyonda 5 gün büyütülerek strese tabi tutulurlar. Bu süre sonunda bitki yaprak ve kökleri toplanır ve azot redüktaz ve glutamat dehidrogenaz aktivite tayinleri yapılır.

2.2.2 Protein İzolasyonu ve Karakterizasyonu

2.2.2.1 Protein İzolasyonu

Kontrol ve bor stresi uygulanmış buğday ve arpa çeşitlerinin kök ve yaprak dokularından protein izolasyonu Damerval ve arkadaşları yöntemine göre yapılır (1986). Doku havanda sıvı azot içerisinde toz haline getirilir. 0.07% β merkaptoetanol içeren 5 ml aseton içerisinde hazırlanmış 10%TCA ilave edilir. -20°C de 45' bekletilir ve 15,000 g de 15' santrifüjlenir. Supernatant uzaklaştırılır, çökelti 0.07% β merkaptoetanol içeren 5 ml aseton içerisinde sulandırılır. -20°C de 1 saat bekletilir ve santrifüj işlemi tekrarlanır. Pelet vakum altında kurutulur.

2.2.2.2 Protein Tayini

Protein derişimi Ramagli ve Rodriguez (1985) tarafından değiştirilmiş olan Bradford yöntemine göre yapılır.

5 mg yaprak ve 7 mg kök ekstratları 0,2 ml urea karışımı solüsyonunda çözülür. 9 M üre, 1% amfolin (pH: 5-8), 1% amfolin (pH: 3-10), 4% nonidet P-40 (NP40) ve 2 % β -merkaptoetanol oda sıcaklığında 15' bekletilir, 12,000 rpm de 3' santrifüj edilir. 10 μl supernatant 10 μl 0.1 N HCl ve 80 μl dH₂O ilave edilerek karıştırılır. Sonuçta 3.5 ml 1:3 oranında sulandırılmış Bradford reagent eklenir ve OD 595 nm de okunur. Protein derişimleri sığır serum albumin (BSA) standart eğrisine göre hesaplanır.

2.2.2.3. 2-Yönlü Elektroforez

Tüm çeşitlerin yaprak ve kök dokularından izole edilen toplam proteinler 2-yönlü elektroforez yöntemiyle karakterize edildi.

Bu yöntemde proteinler ilk olarak isoelektrik noktalarına göre izoelektrik fokuslama elektroforezi (IEF) ile pI değerlerine göre ayrıştırılıp ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına göre standart SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılırlar. IEF elektroforez Hochstrasser ve arkadaşlarının (1988) yönteminin laboratuvarımızda modifiye edilmiş şekli ile (Naqvi ve arkadaşları 1994) uygulanmıştır.

IEF jel solüsyonu, üre (10 g), 5-8 amfolin (0.2 ml), 3-10 amfolin (0.8 ml), 3-[3-cholamidopropyl]diethyl ammoniol]-1 propane sulfonate (CHAPS)/NP-40 (1 ml), N,N,N', N'-Tetramethylethylene diamine (TEMED) (5 μl) ve amonyum persulfat

(APS) (10 ul), %30/0.8 akrilamit/bisakrilamit (3 ml) ve distile su (6.5 ml) ve daha önceden hazırlanıp IEF solüsyonunda çözülmüş 100 µg'a tekabül edecek protein numunelerinden oluşturulur. Bu solüsyon 1.5 mm iç çapında 160 mm uzunluğundaki altı parafilm ile kaplanmış cam tüplerin içine dökülür. Polimerleşme sırasında jel üzerine 5 µl kadar 1:2 sulandırılmış TEMED ve APS içermeyen IEF jel solüsyonu konur.

Polimerleşmeyi takiben, tüplerin alt kısmındaki parafilm çıkarılır ve tüpler elektroforez cihazına yerleştirilir (Biorad). Katod solüsyonu olarak 20 mM NaOH ve anod solüsyonu olarak 10 mM H₃PO₄ kullanılır. Elektroforez işlemi başlatılır ve 2 saat süre ile 400 volt uygulanır. Daha sonra 800V 14 saat (toplam 12,000 Volt-saat) olacak şekilde elektroforez işlemine devam edilir. Elektroforez sonunda jeller tüplerden çıkartılır ve ikinci boyut için SDS-PAGE jel sistemine tabi tutulur.

1 D SDS-PAGE

Tüplerden çıkarılan jeller Laemmli (1975) yönteminde açıklandığı gibi hazırlanan %12'lik ayırıcı poliakrilamit jel kullanılarak hazırlanmış 1 mm kalınlığında ve 16-20 cm uzunluğundaki dikey jelin (Biorad Jel Elektroforez sistemi) üstüne yatay bir şekilde oturtulur. Elektroforez işlemi 10 derecede 20 mA/jel olacak şekilde 6-7 saat süre ile yapılır. Elde edilen jeller 1 saat kadar %12 asetik asit ve %50 metanol içeren solüsyonda fikse edilir. Jeller gümüş boyama tekniği (Blum 1987) ile boyanarak oluşan protein bantları fotoğraf ile tespit edilir. Jeller daha sonra selefon filimler arasında kurutulup saklanır.

Gümüş Boyama Tekniği

Jellerdeki proteinler gümüş nitrat kullanılarak Blum (1987) metoduna göre belirlenmiştir. Metodun detayları aşamalar halinde aşağıda verilmektedir.

Aşama	Kullanılan Solüsyon	Uygulama Süresi ^a
1. Fiksasyon	%50 metanol, %12 asetik asit 0.5 ml %37 formaldehid	> 1 saat
2. Yıkama	%50 etil alkol	3x20 dakika
3. Ön muamele	Sodyum tiyosulfat.5H ₂ O	1 dakika ^b
4. Durulama	Distile su	3x20 saniye ^b
5. Uygulama	Gümüş nitrat (2g/l) 0.75 ml %37 formaldehid	20 dakika
6. Durulama	Distile su	3x20 saniye
7. Görüntüleme	Sodyum bikarbonat (60 g/l) 0.5 ml %37 formaldehid Sodyum thiosulfat.5H ₂ O (4 mg/l)	10 dakika ^c
8. Yıkama	Distile su	2x2 dakika
9. Durdurma	%50 metanol, %12 asetik asit	10 dakika
10. Yıkama	%50 metanol	> 10 dakika ^d

- 1'den 10'a kadarki aşamalar oda sıcaklığında sallayıcı üstünde yapılır.
- Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için belirtilen sürelerle kesinlikle uyulması gerekir.
- Protein bantlarının görüntülerinin oluşma süresi jeldeki miktarlarına bağlıdır.
- 10'uncu aşamadan sonra jeller saklanmak amacı ile 4 dereceye alınabilir.

2.2.3 PS-II Analizleri

2.2.3.1 Tylakoid Membran İzolasyonu

Kontrol ve stresli bitkilerden 500 mg yaprak dokusu tartılır ve küçük parçalara bölündükten sonra plastik tüplere aktarılır. 5 ml grinding tamponu (Sorbitol 0.33M, NaCl 50 mM, MgCl₂, EDTA 1mM, BSA %0.1, HEPES-KOH 50 mM pH:7.0) eklenerek Janke&Kunkel Ultraturrax T25 homojenizatöründe 2 dakika 13500 rpm de homojenizasyona tabi tutulurlar. Homojenat iki kat tülbentten geçirilir ve süspansiyon önceden soğutulmuş santrifüj tüplerine aktarılır. Sorvall SS-34 santrifüjünde 6 dakika süreyle 3500 rpmde 4°C de santrifüjlenir. Oluşan supernatant atılır ve çökelti 3 ml soğuk süspansiyon tamponunda (Sorbitol 0.1 M, MgCl₂ 50 mM, HEPES-KOH 50 mM pH: 7.0) çözülür. Süspansiyon 10 dakika 9000 rpm de 4°C de tekrar santrifüjlenir. Oluşan supernatant atılır ve çökelti 150 µl süspansiyon tamponunda çözülür ve buzda karanlık ortamda diğer işlemlere başlıyana kadar tutulur.

2.2.3.2 Klorofil Miktarı Tayini

PSII aktivite tayinleri aynı miktarlarda klorofil içeren tylakoid membranları ile yapılacağından önce örneklerdeki klorofil miktarlarını tayin etmek gerekir. Bunun için Arnond (1949) metodu kullanılır. 10µl tylakoid mebranındaki klorofil 1 ml aseton yardımı ile ependorf tüpünün içinde çözülür. 5 dakika 14000 rpm de santrifüjlendikten sonra üst faz alınarak 645 ve 663 nm de abzorbanları okunur. Aşağıdaki denklem yardımı ile örneklerdeki klorofil miktarları hesaplanır.

$$\mu\text{g/ml} = [(A_{663} \times 8.02) + (A_{645} \times 20.2)] \times 100$$

2.2.3.3 PS-II Aktivite Tayini

PSII aktivite tayinleri Chetti (1987) yöntemine göre yapılır. 20 µg klorofil içeren tylakoid membran örnekleri içerisinde 1 ml assay ortamı (Tricine-KOH 40 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄ 2 mM, KCl 10 mM, DCPIP 60 µM) bulunan quartz küvetlere konulur ve reaksiyon küvetin Cole Palmer Ins. Co. Model 9741-52 lambası ile aydınlatılması ile başlatılır. Her 15 saniye aydınlatmadan sonra 590 nm de 3 dakika boyunca okuma yapılır. PSII aktiviteleri zaman içindeki abzorban değişimlerini gösteren grafiklerin eğimlerinden hesaplanır.

2.2.4. İon Geçirgenlik Testleri

Bu analizler hücre zarlarında oluşan hasarın tespiti amacıyla tüm çeşitlerin kök ve yaprak dokuları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analizler Najo ve arkadaşlarının (1999) yöntemine göre yapılmıştır. Dokular deionize su ile yıkandıktan sonra 5 ml 0.4 M manitol çözeltisi içerisinde 3 saat oda sıcaklığında bekletilir ve geçirgenlik değerleri ölçülür (C1). Ölçüm sonrası aynı tüpler 10 dakika kaynatılır ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra yeniden geçirgenlik değerleri ölçülür (C2). Oluşan zarar $(C1/C2)*100$ denklemi ile hesaplanır.

2.2.5 Hücre Duvarı İzolasyonu ve Uronik Asit Tayini

2.2.5.1 Hücre Duvarı İzolasyonu

Hücre duvarı izolasyonu kök ve yaprak dokularından Hu ve arkadaşlarının (1986) yöntemine göre aşağıda belirtildiği gibi yapıldı. İzolasyon kontrol ve 10 mM bor stresi uygulanmış (3, 5, ve 7 gün) buğday (Bolal ve Atay) ve arpa (Anadolu ve Hamidiye) çeşitlerinde yapılmıştır. İzolasyonda Ahmed ve Labavitch'in (1977) yöntemi kullanılmıştır.

100 mg yaprak veya kök dokusu sıvı azot yardımıyla toz haline getirilir. 5 ml soğutulmuş %80 lik etanol eklenir ve santrifüj tüplerine alınır. Sorval RC5C PluMode santrifüjde 1000g de 10 dakika santrifüj edilir. Supernatant atılır, pelet soğutulmuş 5 ml %80 etanol ile sulandırılır ve santrifüjlenir. Çökelti 3 ml soğutulmuş damıtık su (dH_2O) ile sulandırılır ve süzülür. Çökelti 2-3 kere soğutulmuş kloroform:metanol (1:1 v/v) solüsyonu ve aseton ile yıkanır. Çökelti havanda kurutulur ve uronik asit tayini yapılır.

2.2.5.2 Uronik Asit Tayini

Yaklaşık 5 mg hücre duvarı numunesi 20 ml lik behere alınır, üzerine 2 ml soğutulmuş konsantre H_2SO_4 eklenir ve karıştırılır. Beher buz banyosuna yerleştirilir. 0.5 ml dH_2O ilave edilir. Ve çözülmesi için 5' kadar karıştırılmaya devam edilir. İkinci bir 0.5 ml dH_2O ilave edilir ve çözülme işlemi tamamlanır. Çözülmüş numuneler 10 ml'lik ölçümlü flasklara alınır ve belirtilen miktara hacimleri ayarlanır. Uronik asit miktarı Blumenkrantz ve Asboe-Hansen (1973) yöntemine göre yapılır.

Yaklaşık 0.6 ml hücre duvarı solüsyonuna 3-6 ml soğutulmuş 12.5 mM H₂SO₄/sodium tetraborate solüsyonu eklenir ve karıştırılır. Tüpler kaynayan su banyosunda 5' ısıtılır ve çeşme suyu altında soğutulur. %0.5 lik NaOH içerisinde hazırlanan 0.15 %lik m-hydroxydiphenyl eklenir ve OD 520 nm de Shimadzu UV-2201 spektrofotometrede dH₂O ya karşı okunur.

H₂SO₄/sodium tetraborat ve 60 µl 0.5% NaOH içerisinde hazırlanmış m-hydroxydiphenyl eklenir. Uronik asit miktarı glukouronik asit ile hazırlanmış standart eğriden hesaplanır.

2.2.6.Enzim Aktivite Tayinleri:

2.2.6.1.Nitrat Reduktaz aktivite Tayini

Bitkiler 1/2 Hoagland solusyonunda 10 gün büyütüldü.Ardından 10mM Borik asit içeren taze solusyonda 5 gün büyütüldü. ½ Hoagland solusyonunda büyütülen bitkiler kontrol olarak alındı. Bitkiler köklerinden ayrıldı ve NR ve GDH aktiviteleri ölçümü için kullanıldı

Nitrat reduktaz aktivitesinin ölçümü ufak değişiklikler yapılarak Jaworski (1971) metoduna göre yapılmıştır. Enzim ölçümleri üç ayrı tüpte ve üç kez tekrarlanmıştır.

Bitkilerden alınan 200 mg yaprak dokusu içinde 5 ml tampon (0,1M Fosfat tamponu (pH 7.5) 0.02 M steril KNO₃ , 5% n-propanol, ve iki damla kloramfenikol (0.5mg/ml) tüpün içine konuldu.İki dakika vakum altında tutulan tüpler kapatıldıktan sonra 25°C de karanlıkta istenen inkubasyon aralıklarında tutuldu. Ortamda açığa çıkan nitrit başlangıçta (0 dakika) belirlendi ve 15 dakika aralıklarla (75 dakikaya kadar) 0,4ml lik sıvılar halinde 3M HCl ve 0,02% N-1—naphthyl-ethylenediamine hydrochloride içinde her biri 0,3ml 1% sulfanilamide ile işleme tabii tutuldu. 20 dakika sonra karışım 4 ml distile su ile seyreltilir ve 540 nm de köre karşı ölçüldü. Nitrit miktarı belli nitrit derişimleri ile elde edilen standart grafiğe göre hesaplanmıştır. Nitrat reduktaz enzim aktivitesi 1 gr yaş ağırlık ile 1 saatte µmol nitrit olarak ifade edildi.

2.2.5.2.Glutamat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

Glutamat dehidrogenaz aktivite ölçümleri ufak değişiklikler yapılarak Boussama ve arkadaşlarının (1999) metoduna göre yapılmıştır. Enzim analizlerinin her seti paralel çalışılarak, 3 ayrı set deney yapılmıştır. 1 gr taze doku toplandı ve porselen havanda sıvı nitrojen ekleyerek donduruldu. Donmuş numuneler 5 ml öğütme tamponu ile homojenize edildi. Öğütme tamponu 25mM Tris-Cl tamponu, pH:7.8, 1mM EDTA,

1mM MgCl₂, 14 mM β-mercaptoethanol ve 1% polyvinyl pyrrolidone içermektedir. Homojenat 25000 g de 30 dakika 4°C de santrifuj edildi. Enzim aktivitesinin ölçümünden önce supernatanın hacmi ölçüldü.

NADH'in α-ketoglutarata bağlı oksidasyonunun ilk hızı 340 nm de 30°C de ölçüldü. Karışım 85mM potasyum tamponu, pH: 8.1, 30mM α-ketoglutarat, 150 mM amonyum sulfat, 0.3 mM NADH ve 50 µl enzim ekstraksiyonu (toplam 1 ml hacim içinde) içermektedir. Tüm reaksiyon karışımı ile ilk dakikalarda absorpsiyondaki değişim, enzim ekstraksiyonunun olmadığı absorpsiyon ile düzeltildi ve reaksiyon hızı olarak alındı. Glutamat dehidrogenazın enzim aktivitesi 1 gr yaş ağırlıkta, dakikada, okside olan µmol NADH olarak tanımlandı.

2.2.5.3. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD aktivite tayinleri Burke ve arkadaşları (1992) yöntemine göre yapıldı. Kontrol ve stres uygulanmış bitkilerin yaprak dokularından alınan numuneler cam-cam homogenizatör kullanılarak 4mL/g taze dolu olacak şekilde 13.6 % v/v glycerol içeren 9 mM Tris-HCl pH:6.8 tampon çözeltisi ile homojenize edildi. Homojenat 14.000 rpm de eppendorf mikrosentrifuj kullanılarak 5 dakika sentrifüj edildi. Süpernatant -70⁰de muafaza edildi.

Kök dokusu ise buz üzerinde havanla 2 ml/g doku olacak şekilde 2mM EDTA içeren 0.2M sodyum fosfat tamponu (pH: 7.8) ile süspansiyon haline getirilir. Çözelti 10,000xg de 30 dakika sentrifüjlenir. Süpernatant enzim aktivite tayini için kullanıldı. Protein tayini Bradford 1976 yöntemine göre BSA standardı kullanılarak yapıldı. Daha sonra 40µg numune poliakrilamid jeline (5% stacking ve 12% ayırma jeli) uygulandı. Elektforez işlemi 4⁰ de BioRad Protean II cihazı kullanılarak 8mA stacking jel ve 20mA ayırma jellinde olacak şekilde uygulandı.

Negatif Aktivite Boyaması

Elektroforez sonunda jeller SOD aktivite boyaması için 0.1 mM EDTA, 0.2% v/v TEMED içeren tampon içerisinde 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında sallanarak bekletildi. Daha sonra jeller damıtık su içerisinde yıkandı ve bantlar belirinceye kadar ışık altında bekletildi. Fotoğrafları alındıktan sonra jeller selefon tabakaları arasında Krishnan ve arkadaşlarının (1990) yöntemine göre kurutuldu. Kurutulmuş jeller CAMAG densitometresi ile tarandı. Bantların yoğunlukları kontrole göre

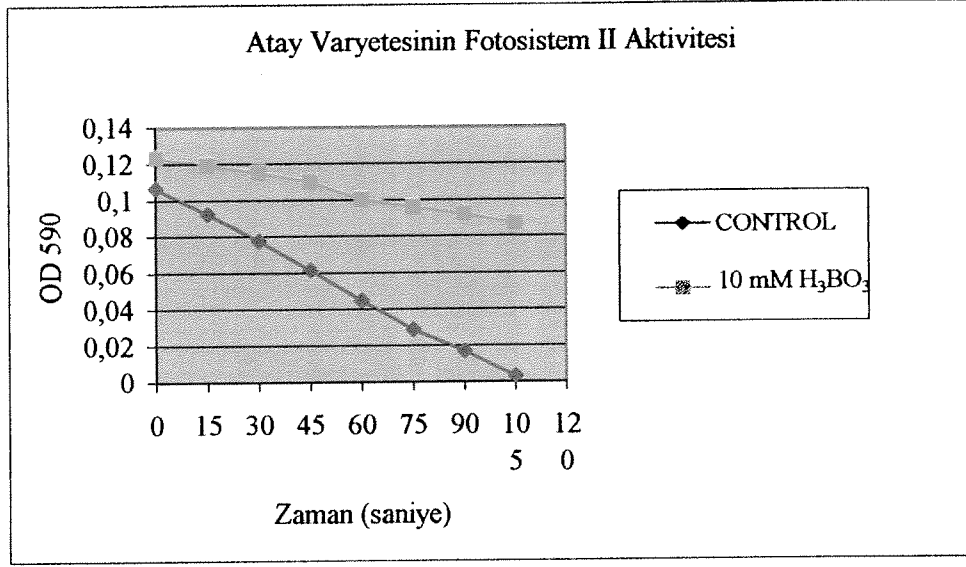
değerlendirildi. SOD izoenzim tipleri jeller boyanmadan önce KCN ve H₂O₂ muamalesine tabi tutularak belirlendi.

III. SONUÇLAR ve AÇIKLAMALAR

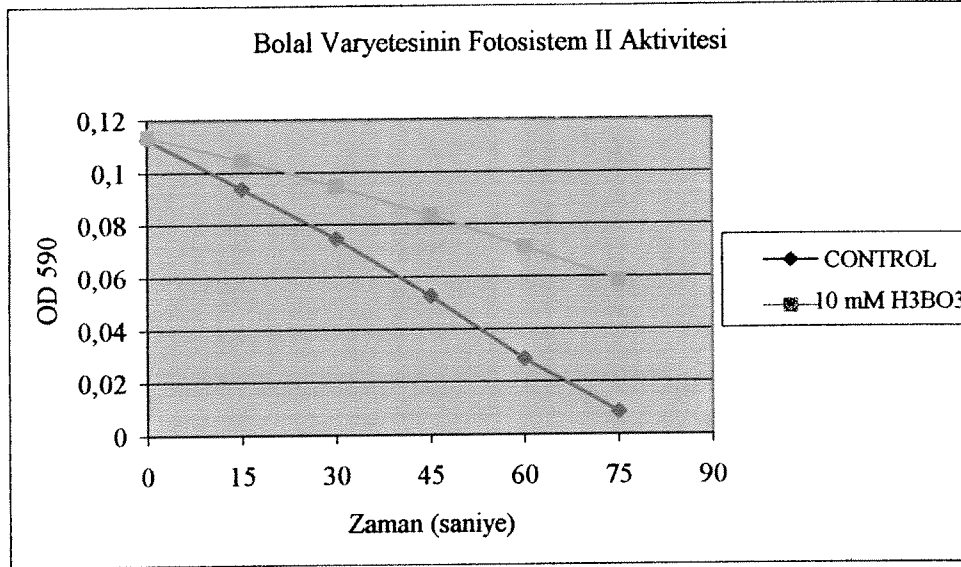
3.1. Fotosistem-II Aktivitesindeki Değişimler

Projenin bu bölümünde stres ve kontrol koşullarına maruz bırakılan tüm çeşitlerin fotosistem-II (FSII) aktivitelerindeki ve klorofil miktarlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Boron stresi uygulanmış ve uygulanmamış çeşitler üzerinde yapılan FSII aktivite ölçümleri sonucunda bitkilerin bor stresi altında daha düşük aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Şekil 3.1.A ve 3.1.B’de buğday çeşitlerinden Bolal ve Atay’ın 5 gün 10mM H₃BO₃ uygulanması sonucundaki FSII aktiviteleri ve kontrol numuneleri verilmiştir. Boron stresine dirençli olduğu bilinen Bolal çeşidinde stres altında FSII aktivitesinde oluşan değişimin hassas çeşite nazaran daha az olduğu görülmüştür. Arpa çeşitlerinde de benzeri sonuçlar elde edilmiş olup, bor toksisitesi altında dirençli çeşit Anadolu hassas çeşit Hamidiye’ye göre FSII aktivitesinde kontrole oranla daha yüksek bir artış göstermiştir (Şekil 3.2).

(A)

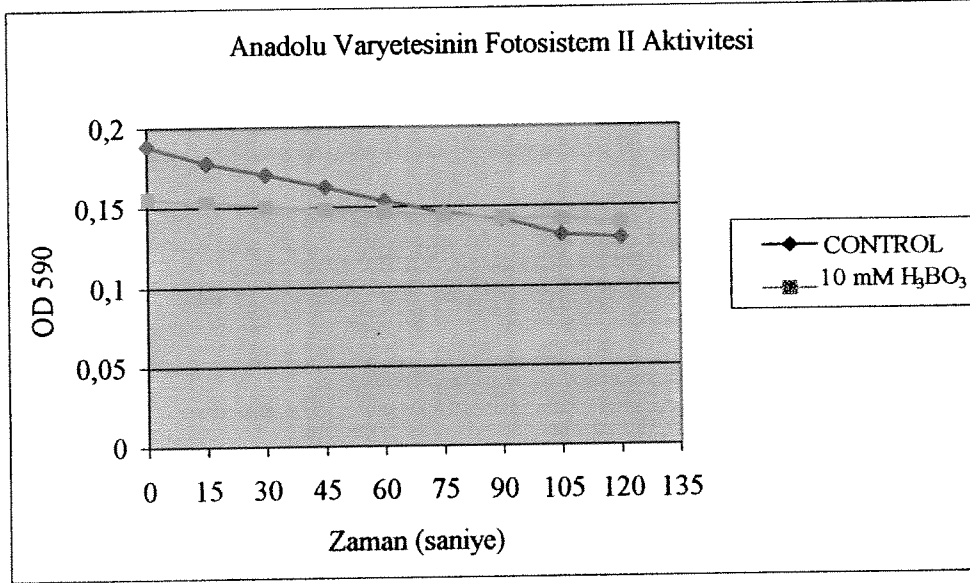


(B)

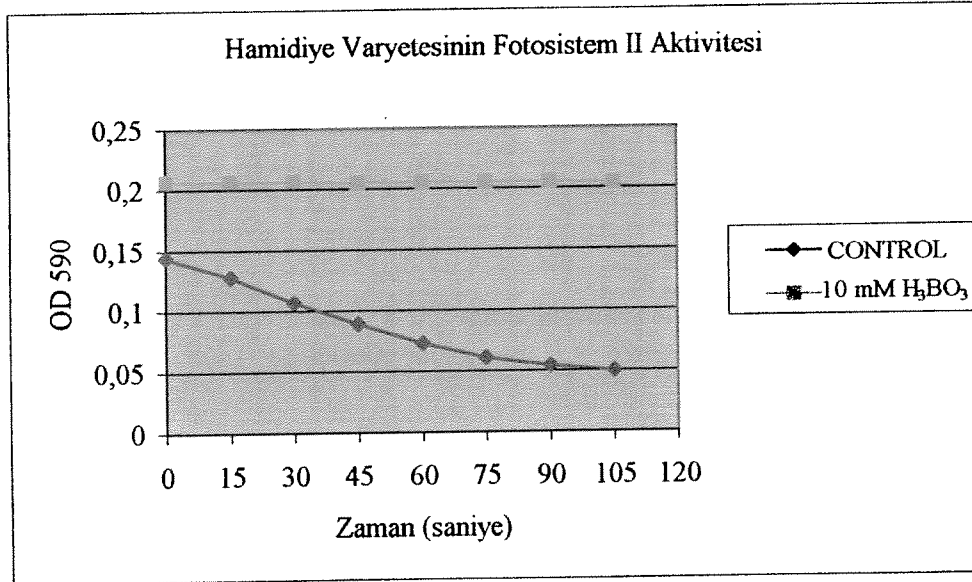


Şekil 3.1. Atay (A) ve Bolal (B) buğday varyetelerinde kontrol ve 5 gün 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış örneklerde fotosistem II aktiviteleri.

(A)

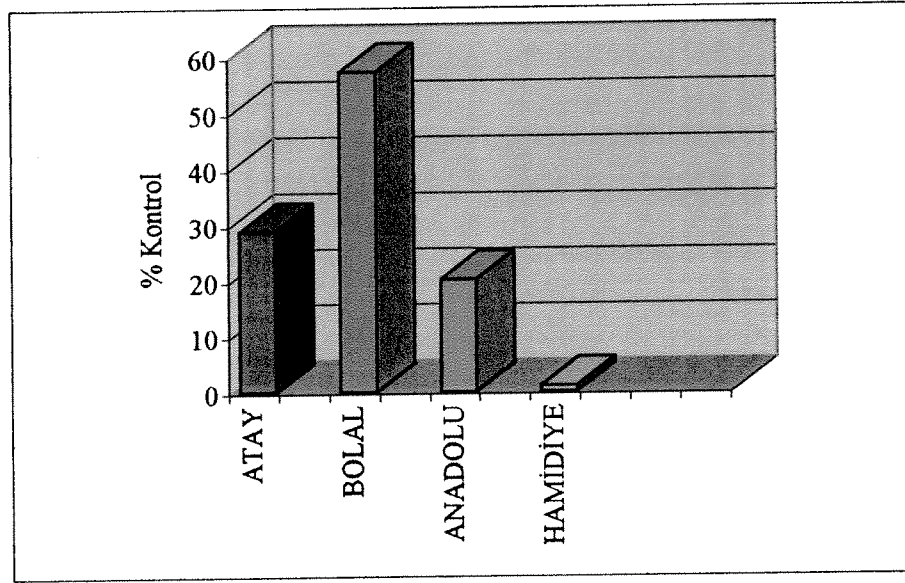


(B)



Şekil 3.2. Anadolu (A) ve Hamidiye (B) arpa varyetelerinde kontrol ve 5 gün 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış örneklerde fotosistem II aktiviteleri.

Şekil 3.3, denemede kullanılan çeşitlerin bor toksisitesi altında kontrole göre % değişimlerini göstermektedir. Tüm çeşitlerde kontrole oranla bor toksisitesi altında FSII aktivitesinde düşüş gözlenmektedir. Arpa çeşitlerinde oluşan düşüşün, buğday çeşitlerine oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Oluşan bu düşüşün hassas çeşitlerde dirençli çeşitlere oranla daha belirgin olduğu gözlenmektedir.



Şekil 3.3. Buğday (Atay-hassas, Bolal-dirençli) ve arpa (Hamidiye-hassas ve Anadolu-dirençli) çeşitlerinde fotosistem II aktivite değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi.

Kontrol ve 10 mM bor toksisitesi altında çeşitlerin klorofil miktarları ve kontrole göre % değişimleri Tablo 3.12'de verilmektedir. Her iki buğday çeşidinde bor stresi altında klorofil miktarında azalma gözlenmektedir. Dirençli çeşitte gözlenen azalmanın hassas çeşide oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Arpa çeşitlerinde ise dirençli çeşit Anadolu'da önemli bir düşüş gözlenirken, hassas çeşit Hamidiye de artış gözlenmektedir.

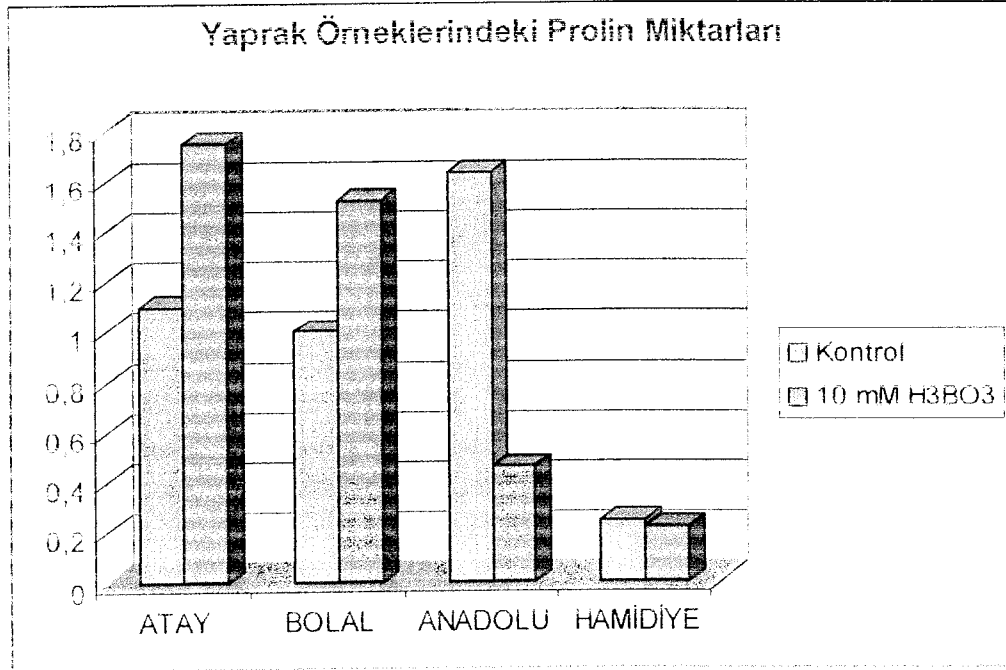
Tablo 3.1. Kontrol ve 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış Buğday (Atay-hassas, Bolal-dirençli) ve arpa (Hamidiye-hassas ve Anadolu-dirençli) çeşitlerinde klorofil miktarları (mg klorofil/ml thylakoid özütü). Deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Her tekrarda ölçümler iki paralel numune üzerinde gerçekleştirilmiş olup, ortalama sonuçlar verilmektedir.

	ATAY	BOLAL	ANADOLU	HAMİDİYE
KONTROL	0.59	0.63	0.43	0.23
10 mM H ₃ BO ₃	0.48	0.44	0.22	0.27
DEĞİŞİM (% KONTROL)	19%↓	30%↓	49%↓	17%↑

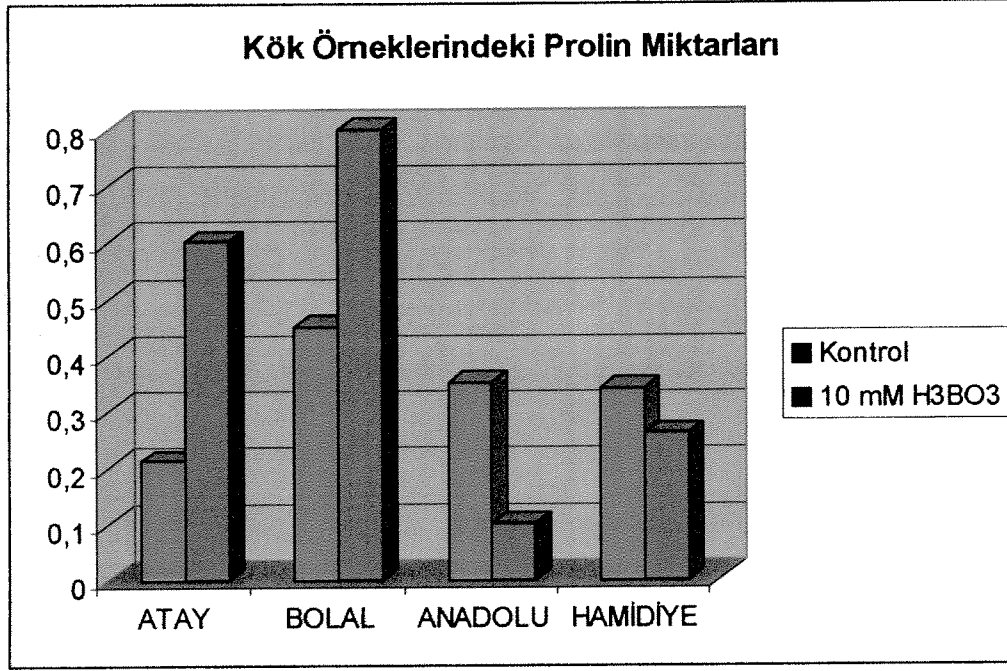
Elde edilen sonuçlar içerisinde en dikkat çeken husus, dirençli çeşitlerde (Bolal ve Anadolu) bor stresi altında hassas çeşitlere oranla FSII aktivitesinde daha az bir düşüş göstermelerine rağmen, bu çeşitlerin klorofil miktarlarında gözlenen düşüştür.

3.2. Prolin Miktarındaki Değişimler

Proje'nin bu bölümündeki çalışmada çeşitlerin kontrol ve stress koşulları altında kök ve yaprak dokularındaki prolin miktarlarında oluşan değişimler incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmektedir.



Şekil 3.5. Bor stresi uygulanmış Atay, Bolal, Çakmak, Kunduru and Tosun varyetelerindeki yaprak prolin miktarlarının kontrol grubuna göre değişimi (mM prolin / g ıslak doku)



Şekil 3.6. Bor stresi uygulanmış varyetelerdeki yaprak prolin miktarlarının kontrol gruplarına göre değişimi (mM prolin / g yaş doku)

Deneyleerde kullanılan buğday çeşitlerinde bor stresi altında yaprak ve kök dokularındaki prolin miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir. Oluşan bu artışın hassas ve dirençli çeşitler arasında farklılık göstermediği gözlenmektedir. Ancak bora dirençli olan buğday çeşidinde stres sonrası oluşan prolin miktarının hassas çeşide nazaran daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Arpa çeşitlerinde ise bor stresi altında prolin miktarlarında düşüş olduğu gözlenmektedir. Yaprak dokusunda, oluşan bu düşüşün hassas çeşitte daha az olduğu gözlenmiştir. Kök dokularında da benzeri sonuçlarla karşılaşmıştır.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, stres koşulları altında buğday ve arpa çeşitleri, prolin miktarlarındaki değişimler açısından farklılık göstermektedir. Buğday çeşitlerinde her iki dokuda prolin miktarında artış gözlenirken, arpada ise genel anlamda bir düşüş gözlenmektedir. Benzeri sonuçların osmotik strese maruz bırakılmış buğday ve arpa çeşitlerinde de gözlendiği belirtilmektedir (Delauney ve Verma, 1993). Bor stresi altında gözlenen prolin değişimleri buğdayın hassas ve dirençli çeşitleri arasında önemli farklılıklar göstermemektedir. Arpada ise dirençli

çeşitte, hassas çeşide oranla daha yüksek bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç özellikle Anadolu çeşidinin yaprak dokularının kontrol koşullarda oldukça yüksek olarak saptanmış olan prolin miktarından kaynaklanmaktadır. Sonuçlara kesinlik kazandırılabilmesi açısından bu deneylerin daha fazla örnekle tekrarlanması gerektiği görüşünderiz.

3.3. Bor Stresinin Buğday ve Arpa Kök-Gövde Uzunluk ve Ağırlıklarına Etkileri

Çalışmaların bu bölümünde deneylerde kullanılan tüm çeşitlerin kontrol ve stres koşulları altında yaprak ve kök kuru/yaş ağırlık ve uzunluklarındaki değişimler incelenmiştir. Her çeşit ve deney seti (bor stresi ve kontrol) için 30-35 bitki içeren kaplar kullanılmıştır. Verilen sonuçlar bitki başına ortalama değerleri ve \pm standart sapma değerlerini göstermektedir.

Tablo 3.2. 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış Atay varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları. 30-35 bitkiden oluşan denemelerin bitki başına ortalama sonuçları.

	Atay Kontrol	Atay 10 mM H ₃ BO ₃	Değişim (% Kontrol)
Yaprak uzunluğu (cm) \pm ss	11.07 \pm 1.73	10.53 \pm 0.44	-5
Kök uzunluğu (cm) \pm ss	17.41 \pm 0.58	17.59 \pm 1.85	1
Yaprak yaş ağırlığı (mg) \pm ss	257 \pm 23	190 \pm 11	-26
Kök yaş ağırlığı (mg) \pm ss	270 \pm 23	203 \pm 54	-25
Yaprak kuru ağırlığı (mg) \pm ss	222 \pm 45	154 \pm 9.0	-32
Kök kuru ağırlığı (mg) \pm ss	7.7 \pm 5.7	5.9 \pm 1.0	-23

Tablo 3.3. 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış Bolal varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları. 30-35 bitkiden oluşan denemelerin bitki başına ortalama sonuçları.

	Bolal Kontrol	Bolal 10 mM H ₃ BO ₃	Değişim (% Kontrol)
Yaprak uzunluğu (cm)±ss	15.89±0.38	15.55±0.62	-2
Kök uzunluğu (cm) ±ss	18.70±0.21	19.74±0.32	6
Yaprak yaş ağırlığı (mg)±ss	257±16	250±44	-3
Kök yaş ağırlığı (mg) ±ss	20.1±4.4	24.3±7.4	21
Yaprak kuru ağırlığı (mg) ±ss	22.1±5	22.4±3.7	1
Kök kuru ağırlığı (mg) ±ss	0.55±0.14	1.52±0.35	85

Tablo 3.4. 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış Anadolu varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları. 30-35 bitkiden oluşan denemelerin bitki başına ortalama sonuçları.

	Anadolu Kontrol	Anadolu 10 mM H ₃ BO ₃	Değişim (% Kontrol)
Yaprak uzunluğu (cm)±ss	16.52 ± 0.23	16.66 ± 0.22	1
Kök uzunluğu (cm) ±ss	9.37 ± 0.45	10.31 ± 0.41	10
Yaprak yaş ağırlığı (mg)±ss	257.1 ± 8.3	253.3 ± 7.2	1
Kök yaş ağırlığı (mg) ±ss	30.3 ± 2.4	16.8 ± 1.4	-45
Yaprak kuru ağırlığı (mg) ±ss	21.6 ± 8	22.4 ± 0.7	4
Kök kuru ağırlığı (mg) ±ss	4.8 ± 2	4.4 ± 0.2	-8

Tablo 3.5. 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış Hamidiye varyetesinden alınan örneklerin yaprak-kök uzunlukları ve ıslak-kuru ağırlıkları. 30-35 bitkiden oluşan denemelerin bitki başına ortalama sonuçları.

	Hamidiye Kontrol	Hamidiye 10 mM H ₃ BO ₃	Değişim (% Kontrol)
Yaprak uzunluğu (cm)±ss	14.97 ± 0.28	14.65 ± 0.42	-2
Kök uzunluğu (cm) ±ss	11.06 ± 0.23	10.33 ± 0.20	-7
Yaprak yaş ağırlığı (mg)±ss	239.5 ± 9.9	222.7 ± 10	-7
Kök yaş ağırlığı (mg) ±ss	21.4 ± 2.3	20.9 ± 1.6	-2
Yaprak kuru ağırlığı (mg) ±ss	21.9 ± 1.2	20.4 ± 0.9	-7
Kök kuru ağırlığı (mg) ±ss	4.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2	-13

Denemeler sonucunda hem buğday hem de arpa çeşitlerinde uygulanan bor stresinin yaprak ve kök uzunluklarını önemli seviyede etkilemediği gözlenmiştir. En belirgin değişim %10 artışla dirençli arpa çeşidi Anadolu köklerinde oluşmuştur. Dirençli buğday çeşidi Bolal'ın kökleri dışında (%21 artış), diğer tüm çeşit ve dokuların yaş ağırlıklarında genel olarak bir düşüş gözlenmiştir. Benzeri bir durum yaprak ve kök kuru ağırlıklarında da gözlenmektedir.

Sonuçlar, elde edilen bulgular ışığında genel olarak değerlendirildiğinde, arpa çeşitleri arasında incelenen parametreler açısından önemli sayılabilecek farklar gözlenmemektedir. Ancak buğday çeşitlerinde, özellikle kök yaş/kuru ağırlıkları dirençli ve hassas çeşitler arasında çok belirgin farklar göstermektedir. Dirençli çeşit Bolal'da kök yaş ve kuru ağırlıklarında sırası ile %21 ve %85'lik bir artış gözlenirken, hassas çeşit Atay'da aynı değerler %25 oranında düşüş göstermiştir. Dolayısıyla, bu gözlemlerin buğdayın diğer dirençli ve hassas çeşitleri üzerinde de teyit edilebilmesi durumunda, bor stresi altında yaprak kuru ve yaş ağırlık ölçümleri dirençli ve hassas çeşitlerin belirlenmesinde kullanılabilecek pratik bir yöntem olarak kabul edilebilir. Ancak deneylerde gözlenen yüksek sapmalar nedeniyle, kanattimizce bu sonuçların aynı çeşitler ve diğerleri üzerinde örnek ve tekrar sayısı artırılarak tekrar edilmesi gerektiği görüşündeyiz.

3.4. Hücre Zarı Geçirgenlik Analizleri

Bilindiği gibi farklı çevresel stres koşulları altında oluşan serbest radikallerin özellikle de aktif oksijen türleri, hücre içerisinde nükleik asit, protein ve lipid gibi biomoleküllerin yapılarında dolaylı ve dolaysız hasara neden olmaktadır. Lipidlerde, dolayısıyla hücre zarlarında oluşan bu hasarı belirlemenin en yaygın kullanılan yöntemlerinden biri de iyon geçirgenlik testidir.

Araştırmanın bu bölümünde bor stresinin hücre zarlarında oluşturabileceği etkilerin belirlenebilmesi amacıyla, stres uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerin kök ve yaprak numuneleri iyon geçirgenlik testine tabi tutulmuştur. Tablo 3.7’de verilen sonuçlar iki deneyin ortalaması olup (her deneyde ölçümler üç paralel numune üzerinde gerçekleştirilmiştir), kontrol bitkilere oranla hücre zarlarında oluşan % zararı göstermektedir.

Tablo 3.6. Atay, Bolal (buğday) ve Anadolu, Hamidiye (arpa) varyetelerinde 10 mM H_3BO_3 stresi sonrasında hücre zarlarında oluşan yüzde zarar. (% zarar)

	Bolal	Atay	Anadolu	Hamidiye
Yaprak örnekleri	% 61.1	%83.3	% 102.9	% 68.8
Kök örnekleri	% 72.7	%96.2	% 117.4	% 95.3

Deney sonuçları, tüm çeşit ve dokularda bor stresinin hücre zarlarında önemli sayılabilecek hasarlara neden olduğunu göstermektedir. Tüm çeşitlerde, kök örneklerinin hücre zarlarında oluşan hasarın, yaprak örneklerine göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

Buğdayda, hem kök hem de yaprak dokusunda dirençli çeşit Bolal'ın, hassas çeşit Atay'a oranla daha düşük bir hücre zarı hasarına uğradığı gözlenmektedir. Arpa çeşitlerinde ise tersine bir durum söz konusu olup, dirençli çeşitte oluşan hücre zarı hasarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmalarda en dikkat çekiçi husus, toksik bor derişimlerinin bitki hücre zarlarında belirgin bir hasara neden olduğunun gözlenmesidir. Bu hasarın nedenin belirlenebilmesi amacıyla ilerideki çalışmalarda, bor toksisitesinin H₂O₂ miktarı ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi planlanmaktadır. Bulguların ve deney tekrarlarının hassas ve dirençli çeşitler arasında gözlenen farklılıkların net olarak irdelenebilmesi açısından yetersiz olduğu görüşünde olup, deneylerin tekrarına gidilmesinin yararlı olacağı görüşündeyiz.

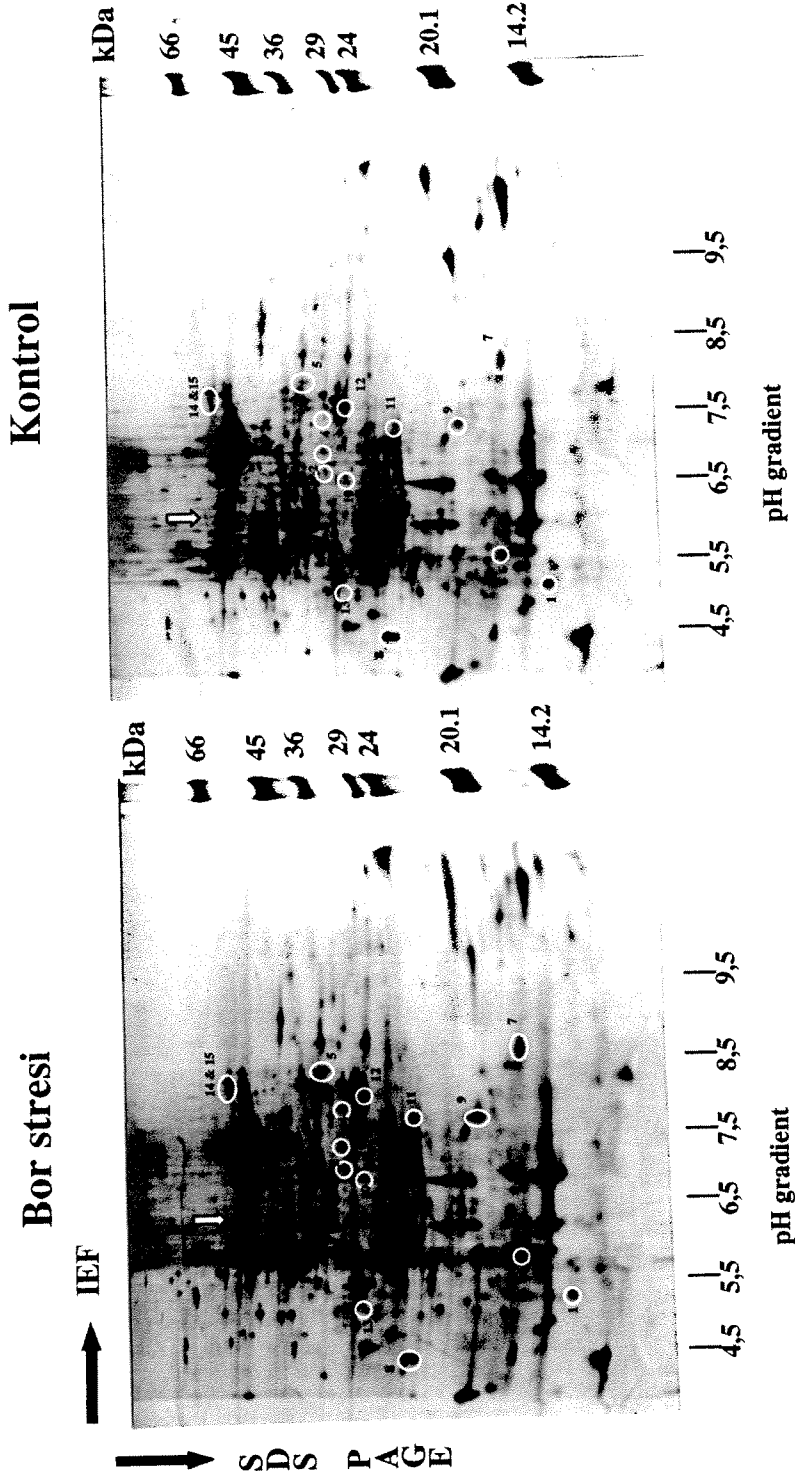
3.5. Protein Profillerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Bor stresinin protein profilleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler arpa çeşitlerinden Anadolu ve Hamidiye, buğday çeşitlerinden Bolal ve Atay'ın kök ve yaprak dokularında çalışılmıştır. Raporda sunulan şekiller en az üç bağımsız deney sonrası benzeri sonuçların elde edildiği deneylerin örneklerini göstermektedir.

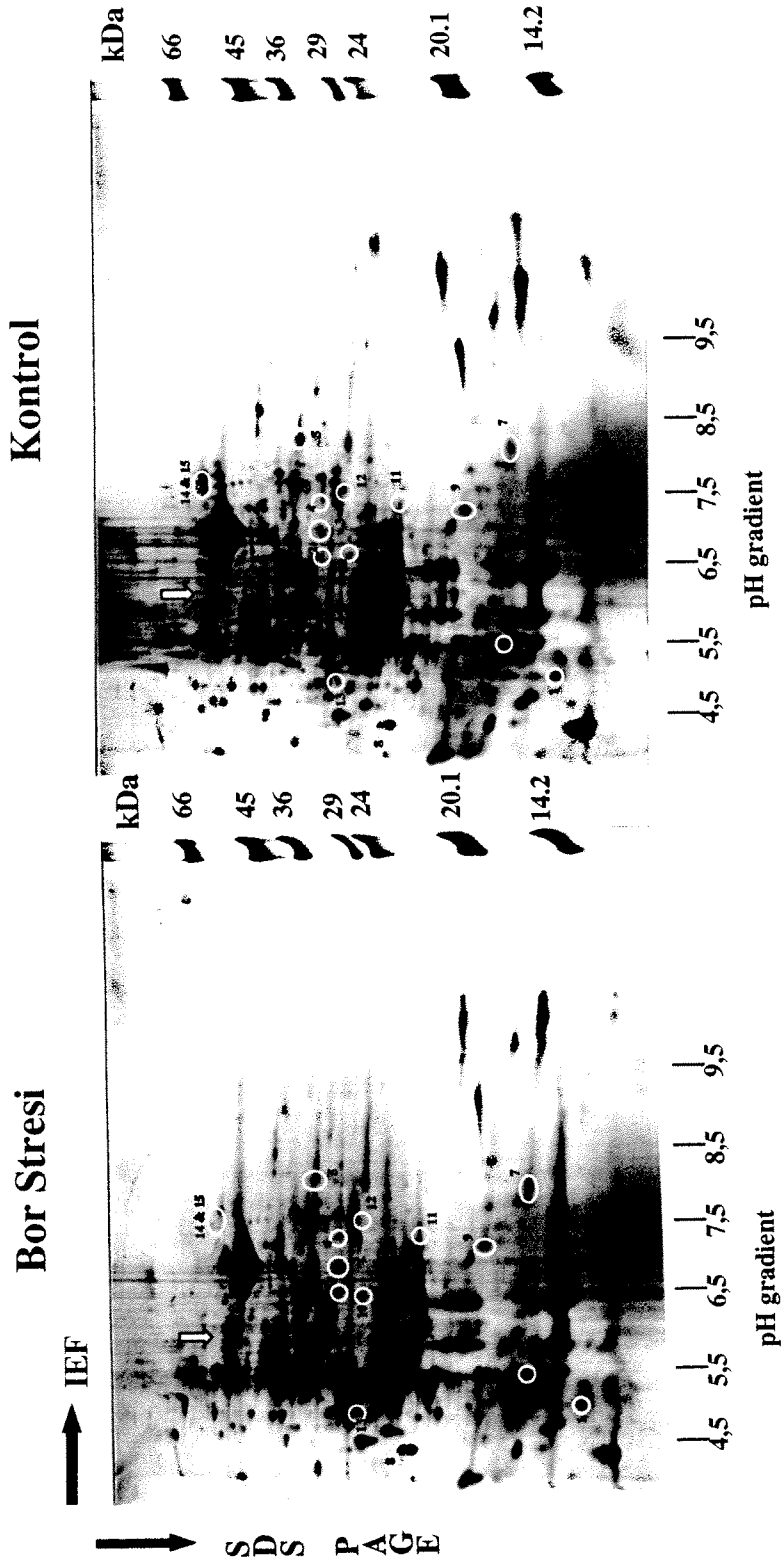
3.5.1 Bor Stresinin Arpa Kök ve Yaprak Protein Profilleri Üzerine Etkisi

Arpa çeşitlerinin bor stresi sonrası yaprak dokularında oluşan protein profillerindeki değişiklikler Şekil 3.7 ve 3.8'de gösterilmektedir. Şekillerden de görüleceği gibi genel anlamda dirençli çeşit olan Anadolu'da bazı proteinlerde kontrole nazaran artışlar oluşurken, hassas çeşit Hamidiye'de benzeri değişimler gözlenememiştir. Oluşan bu değişiklikler Tablo 3.7'de özetlenmektedir. Bor stresi altında diğer çevresel stres faktörlerinde (örneğin sıcak, kurak, tuz gibi) gözlenen yeni proteinlerin sentezine belirgin olarak rastlanamamıştır. Bu nokta bor stresinin direnç mekanizmasının diğer çevresel stres faktörlerinden daha farklı olduğu ihtimalini gündeme getirmektedir.

Kök proteinlerinde, yaprak proteinlerinde olduğu kadar belirgin değişiklikler gözlenememekle birlikte, dirençli çeşidin bazı proteinlerinde artış gözlenmiştir. Buna ek olarak dirençli çeşitte bor stresi altında, hassas çeşitte gözlenmeyen yeni bir proteinin sentezlendiği de gözlenmektedir. Protein profillerindeki değişimler Tablo 3.8'de verilmektedir.



Şekil 3.7 Anadolu (bor dirençli) arpa çeşidinde 7 günlük 10 mM bor stresi sonrası yaprak total protein profillerindeki değişim. Daire içine alınan proteinler değişimlerin gözlemlendiği proteinleri göstermektedir. IEF: İsoelektrik fokuslama, SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez yönlerini göstermektedir. pH gradient: IEF jellerinde oluşan pH bölgelerinde oluşan pH bölgelerini göstermektedir. Protein profillerinde oluşan değişimler Tablo 3.7'de özetlenmektedir.



Şekil 3.8 Hamidiye (bora duyarlı) arpa çeşidinde 7 günlük 10 mM bor stresi sonrası yaprak total protein profillerindeki değişim. Daire içine alınan proteinler değişimlerin gözlemlendiği proteinleri göstermektedir. IEF: İsoelektrik fokuslama, SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez yönlerini göstermektedir. pH gradient: IEF jellerinde oluşan pH bölgelerinde oluşan değişimler Tablo 3.7'de özetlenmektedir.

Tablo 3.7. Anadolu (bora dirençli) ve Hamidiye (bora hassas) arpa çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası yaprak proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.

Protein No.	M _r (kDa)	pI	Anadolu	Hamidiye
1	14	5.0	++	+
2	32.5	6.5	++	+
3	33	6.7	++	+
4	32.5	7.3	++	+
5	34.2	7.7	++	+
6	15.8	5.4	++	+
7	15.8	8.0	++	+
8	22.5	4.5	++	++
9	20	7.0	++	-
10	26.5	6.3	++	-
11	22	7.0	+	-
12	29	7.5	+	0
13	29	4.9	++	++
14	58	7.5	+	0
15	58	7.6	+	0

Semboller:

- + : Kontrole göre değişim yok
- ++: Kontrole göre protein miktarında artış.
- : Kontrole göre protein miktarında düşüş.
- 0 : Protein kaybolmuş.

Tablo 3.8. Anadolu (bora dirençli) ve Hamidiye (bora hassas) arpa çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası kök proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.

Protein No.	M _r (kDa)	pI	Anadolu	Hamidiye
1	35	7.8	++	0
2	24	5.9	++	++
3	62.8	5.9	++	++
4	63	6.3	++	++
5	23	6.1	++	+
6	45	6.0	++	+
7	45	6.1	++	+

Semboller:

- + : Kontrole göre değişim yok
- ++: Kontrole göre protein miktarında artış.
- : Kontrole göre protein miktarında düşüş.
- 0 : Protein kaybolmuş.

3.5.2 Bor Stresinin Buğday Kök ve Yaprak Protein Profilleri Üzerine Etkisi

Buğday çeşitlerinin bor stresi sonrası yaprak dokularında oluşan protein profillerindeki değişiklikler Şekil 3.9 ve 3.10 de gösterilmektedir. Şekillerden de görüleceği gibi genel anlamda dirençli çeşit olan Bolal'de bazı proteinlerde kontrole nazaran artışlar oluşurken, hassas çeşit Atay'da benzeri değişimler gözlenmemiştir. Oluşan bu değişiklikler Tablo 3.9'da özetlenmektedir.

Aynı çeşitlerin kök proteinlerinde oluşan değişimler ise Şekil 3.11 ve 3.12'de verilmektedir. Kök proteinlerinde, yaprak proteinlerinde olduğu kadar belirgin değişiklikler gözlenmemekle birlikte, dirençli çeşitte, hassas çeşit Atay'da gözlenmeyen 27.0 kDa ve pI 7.1'de oluşan yeni bir protein gözlenmiştir.

Benzeri bulgular daha önce arpa çeşitleri üzerinde yürütülen deneylerde de gözlenmiştir. Dolayısıyla, bor stresi altında diğer çevresel stres faktörlerinde (örneğin sıcak, kurak, tuz gibi) gözlenen yeni proteinlerin sentezine belirgin olarak rastlanamamıştır. Bu nokta bor stresinin direnç mekanizmasının diğer çevresel stres faktörlerinden daha farklı olduğu ihtimalini gündeme getirmektedir.

Tablo 3.9. Bolal (bora dirençli) ve atay (bora hassas) buğday çeşitlerinin 7 günlük bor stresi sonrası yaprak proteinlerindeki değişim. Proteinlerdeki değişim bor stresi uygulanmamış bitkilerinki ile karşılaştırılmıştır.

ProteinNo.	M _r (kDa)	pI değeri	Atay (hassas)	Bolal (dirençli)
1	22.8	6.2	+	++
2	23.3	6.0	-	++
3	45	6.5	+	++

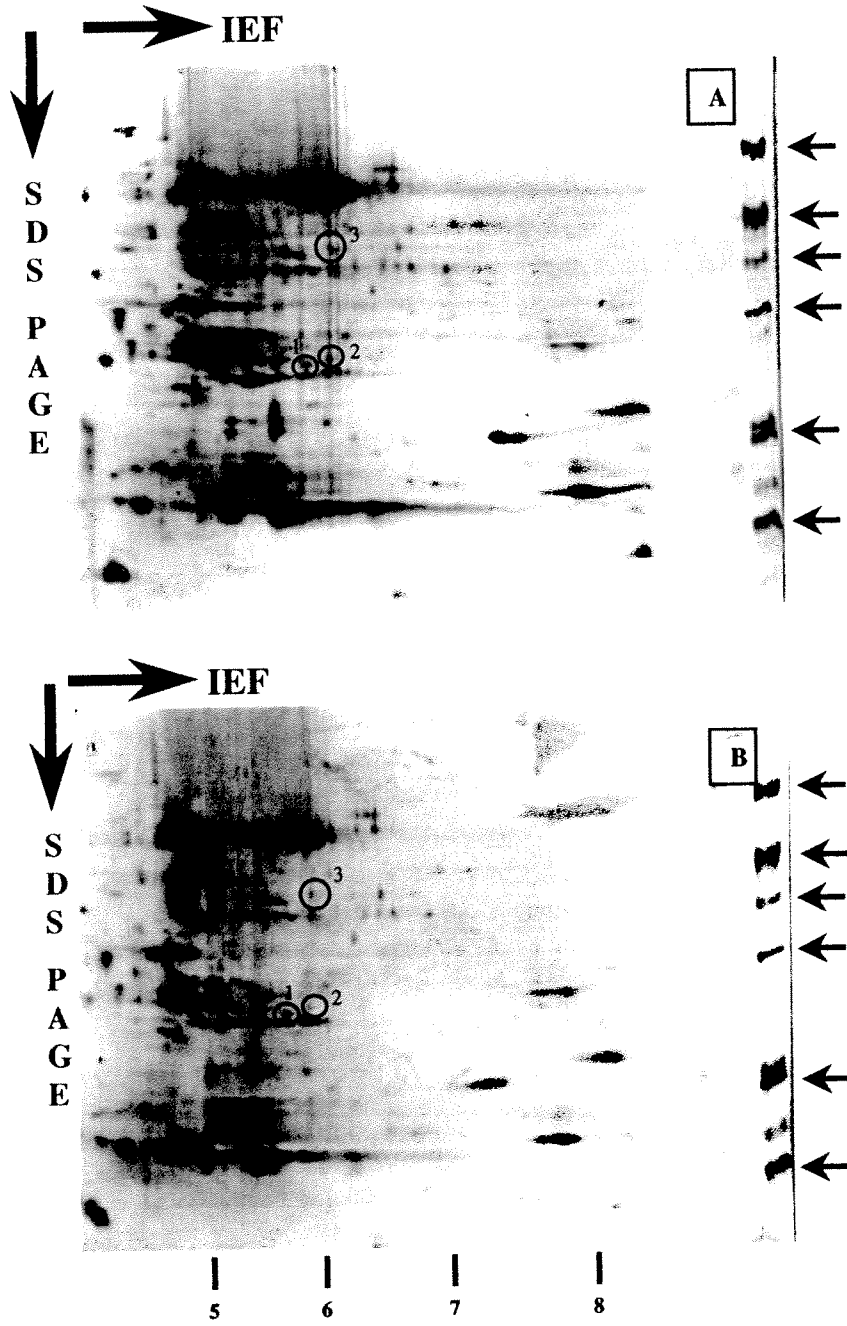
Semboller:

+: Kontrole göre değişim yok

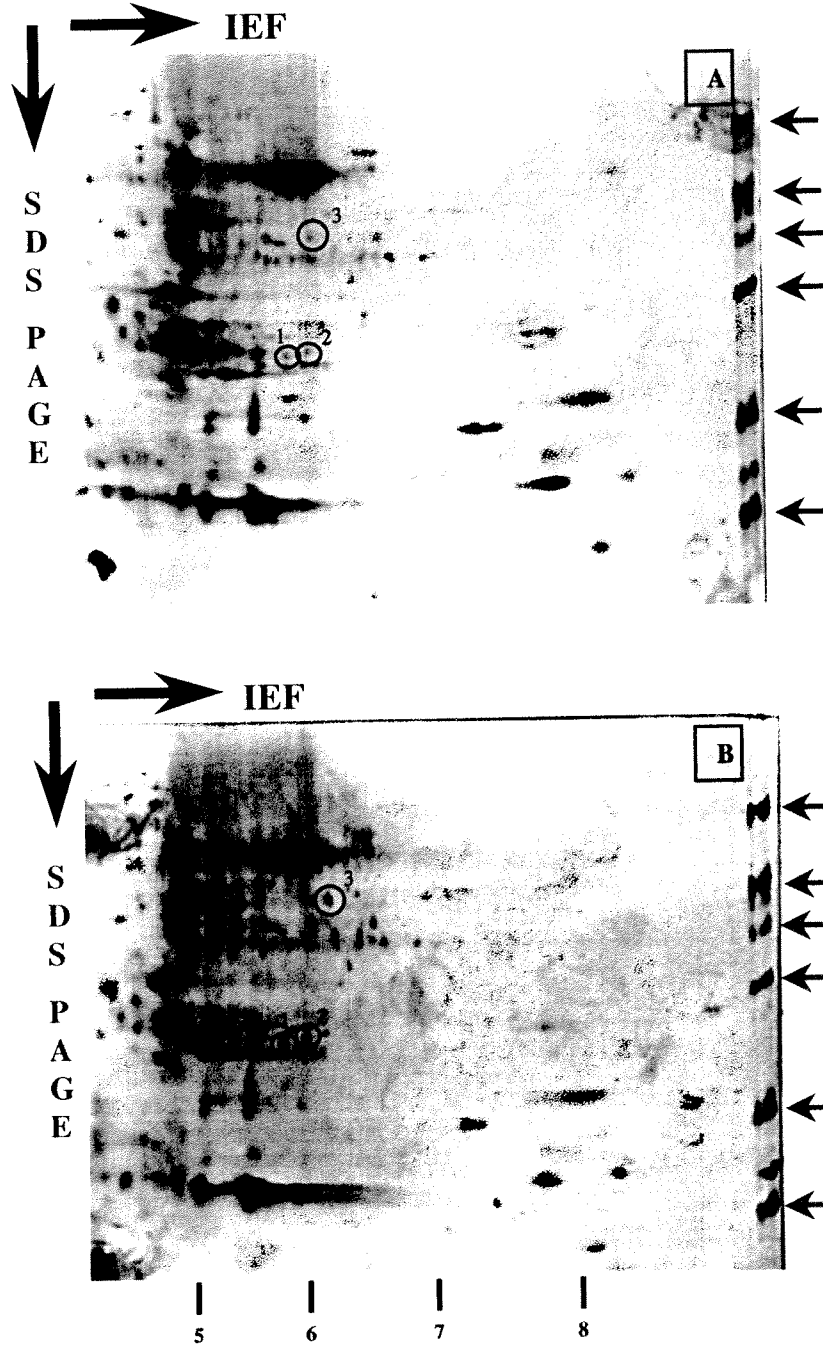
++: Kontrole göre protein miktarında artış.

- : Kontrole göre protein miktarında düşüş.

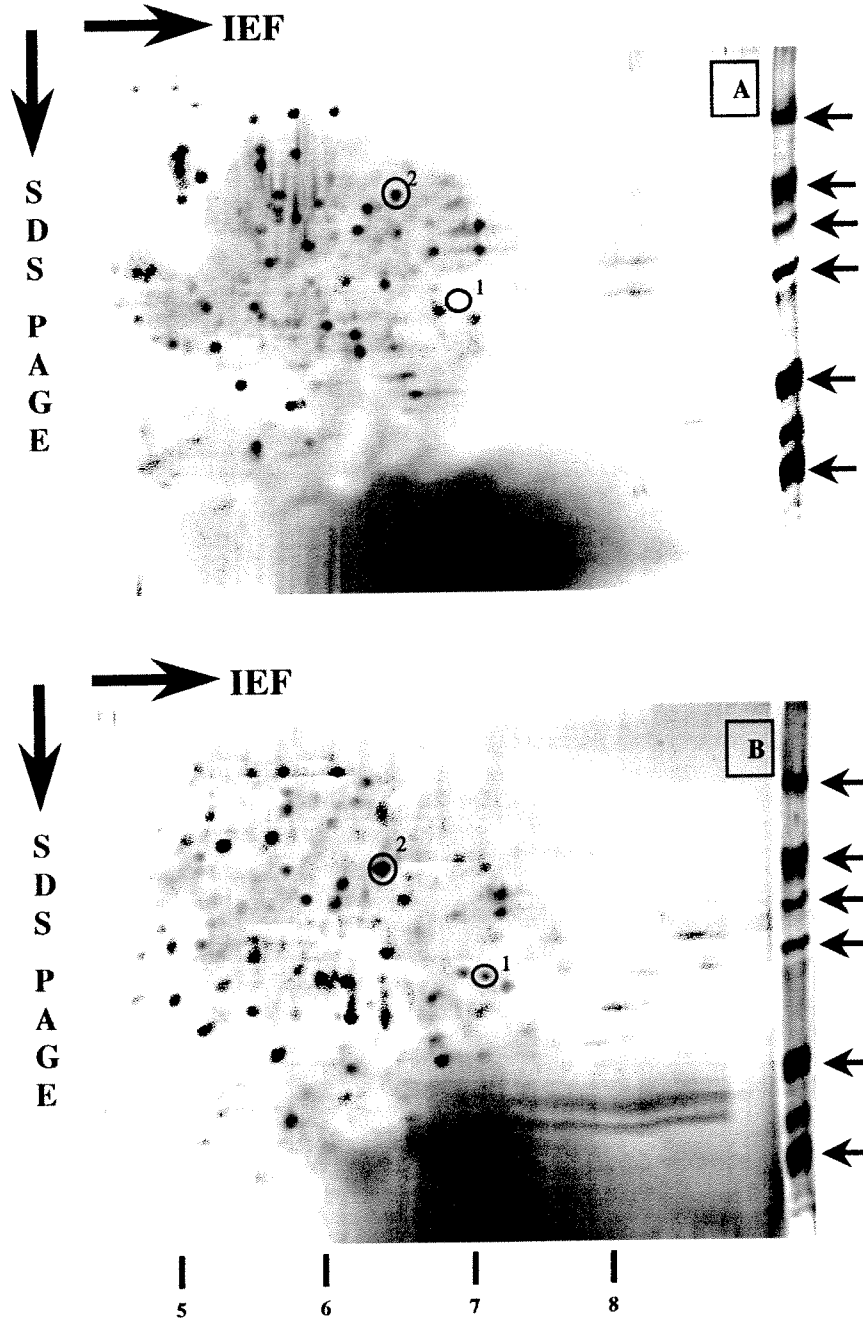
0 : Protein kaybolmuş.



Şekil 3.9 Atay (bora hassas) buğday çeşidinde 7 günlük 10 mM bor stresi sonrası yaprak total protein profillerindeki değişim. Daire içine alınan proteinler değişimlerin gözlemlendiği proteinleri göstermektedir. IEF: İsoelektrik fokuslama, SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez yönlerini göstermektedir. pH gradient: IEF jellerinde oluşan pH bölgelerini göstermektedir. Protein profillerinde oluşan değişimler Tablo 3.9'da özetlenmektedir. Oklar moleküler ağırlık standartlarını göstermektedir. Yukarıdan aşağı: 66, 45, 36, 29, 20.1, 14.2 kD.



Şekil 3. 10 Bolal (bor dirençli) buğday çeşidinde 7 günlük 10 mM bor stresi sonrası gövde total protein profillerindeki değişim. Daire içine alınan proteinler değişimlerin gözlemlendiği proteinleri göstermektedir. IEF: İsoelektrik fokalasyon, SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez yönlerini göstermektedir. pH gradient: IEF jellerinde oluşan pH bölgelerini göstermektedir. Protein profillerinde oluşan değişimler Tablo 3.9’da özetlenmektedir. Oklar moleküler ağırlık standartlarını göstermektedir. Yukarıdan aşağı: 66, 45, 36, 29, 20.1, 14.2 kD.



Şekil 3.12 Bolal (bor dirençli) buğday çeşidinde 7 günlük 10 mM bor stresi sonrası kök total protein profillerindeki değişim. A kontrol, B bor stresi uygulanmış bitkiler. Daire içine alınan proteinler değişimlerin gözlemlendiği proteinleri göstermektedir. IEF: İsoelektrik fokuslama, SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez yönlerini göstermektedir. pH gradient: IEF jellerinde oluşan pH bölgelerini göstermektedir. Oklara moleküler ağırlık standartlarını göstermektedir. Yukarıdan aşağı: 66, 45, 36, 29, 20.1, 14.2 kD.

3.6. Hücre Duvarı Üronik Asit Miktarındaki Değişimler

Projenin bu bölümünde arpa ve buğdayın dirençli ve hassas çeşitlerinin yaprak ve kök dokularında, kontrol ve stres altındaki koşullarda, hücre duvarlarında bulunan üronik asit miktarlarında oluşan değişiklikler belirlenmiştir. Deneyler 3,5 ve 7 gün süre ile 10 mM bor stresine tabi tutulmuş ve kontrol bitkilerin kök ve yaprak dokuları üzerinde yürütülmüştür. Her set deney en az 5 kez tekrar edilmiştir. Deney sonuçları SPSS for windows istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir.

DeneySEL bulgular aşağıda tablolar halinde sunulmaktadır. Özet olarak bor stresi sonucunda hassas ve dirençli çeşitlerin hücre duvarı üronik asit miktarlarında önemli bir değişiklik meydana gelmemektedir. Bu bulgular, bor toksisitesine direnç mekanizmasında hücre duvarının önemli bir rol oynamadığı sonucunu çıkartmaktadır.

Tablo 3.10. Bor uygulamasına bağlı olarak (B:10 mM), Atay ve Bolal çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim. Bor stresi 10 günlük bitkilere, 3,5 ve 7 gün süre ile uygulanmıştır.

Glukoronik asit (% kuru hücre duvarı ağırlığı)				
B uygulaması (gün)	Atay (Hassas) Kontrol	Atay (Hassas) B-uygulanmış	Bolal (Dirençli) Kontrol	Bolal (Dirençli) B-uygulanmış
3	5.7 ± 0.8	6.1 ± 0.9	6.4 ± 0.8	6.1 ± 0.6
5	5.3 ± 0.8	5.4 ± 0.8	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.7
7	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.7	5.8 ± 0.6	6.1 ± 0.8

Tablo 3.11. Bor uygulamasına bağılı olarak (B:10 mM), Atay ve bolal çeşitlerinin kök dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim. Bor stresi 10 günlük bitkilere, 3,5 ve 7 gün süre ile uygulanmıştır.

Glukoronik asit (% kuru hücre duvarı ağırlığı)				
B uygulaması (gün)	Atay (Hassas) Kontrol	Atay (Hassas) B-uygulanmış	Bolal (Dirençli) Kontrol	Bolal (Dirençli) B-uygulanmış
3	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.5
5	2.6 ± 0.3	3.3 ± 0.4	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.3
7	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.0 ± 0.4	2.9 ± 0.3

Tablo 3.12. Bor uygulamasına bağılı olarak (B: 10 mM), Hamidiye ve Anadolu çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim. Bor stresi 10 günlük bitkilere, 3,5 ve 7 gün süre ile uygulanmıştır.

Glukoronik asit (% kuru hücre duvarı ağırlığı)				
B uygulaması (gün)	Hamidiye (Hassas) Kontrol	Hamidiye (Hassas) B-uygulanmış	Anadolu (Dirençli) Kontrol	Anadolu (Dirençli) B-uygulanmış
3	8.0 ± 0.9	7.7 ± 1.0	7.5 ± 0.3	7.5 ± 0.7
5	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6	6.8 ± 0.5
7	6.9 ± 0.8	6.7 ± 0.7	7.7 ± 0.5	7.0 ± 1.0

Tablo 3.13. Bor uygulamasına bağılı olarak (B: 10 mM), Hamidiye ve Anadolu çeşitlerinin yaprak dokularındaki üronik asit miktarındaki değişim. Bor stresi 10 günlük bitkilere, 3,5 ve 7 gün süre ile uygulanmıştır.

Glukoronik asit (% kuru hücre duvarı ağırlığı)				
B uygulaması (gün)	Hamidiye (Hassas) Kontrol	Hamidiye (Hassas) B-uygulanmış	Anadolu (Dirençli) Kontrol	Anadolu (Dirençli) B-uygulanmış
3	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2
5	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.4
7	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.7 ± 0.4

Sonuçlardan da görüldüğü gibi buğday ve arpada hücre duvarı Uronik asit miktarı yaprak ve kök dokularında boron uygulanması ile değişiklik göstermemiştir. Sonuçlar Danell ve arkadaşlarının (1999) sonuçları ile uyum halindedir. Danell ve arkadaşları (1999) ayçiçeği ile yapmış oldukları çalışmalarında boronun hücre duvarında belirli bağlanma bölgeleri olduğunu ve bu bölgelerin uronik asit üzerinde olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada borun buğday ve arpada kök ve yaprak dokularına bağlanma bölgelerinin boron miktarındaki artışla ilgili olmadığı sonucuna varılmıştır.

3.7 . Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

Bu bölümde tüm çeşitlerde kontrol ve stress koşulları altında nitrat reduktaz, glutamat dehidrogenaz ve SOD enzim aktivitelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Çalışmalarda kök ve gövde dokuları kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıda verilmektedir.

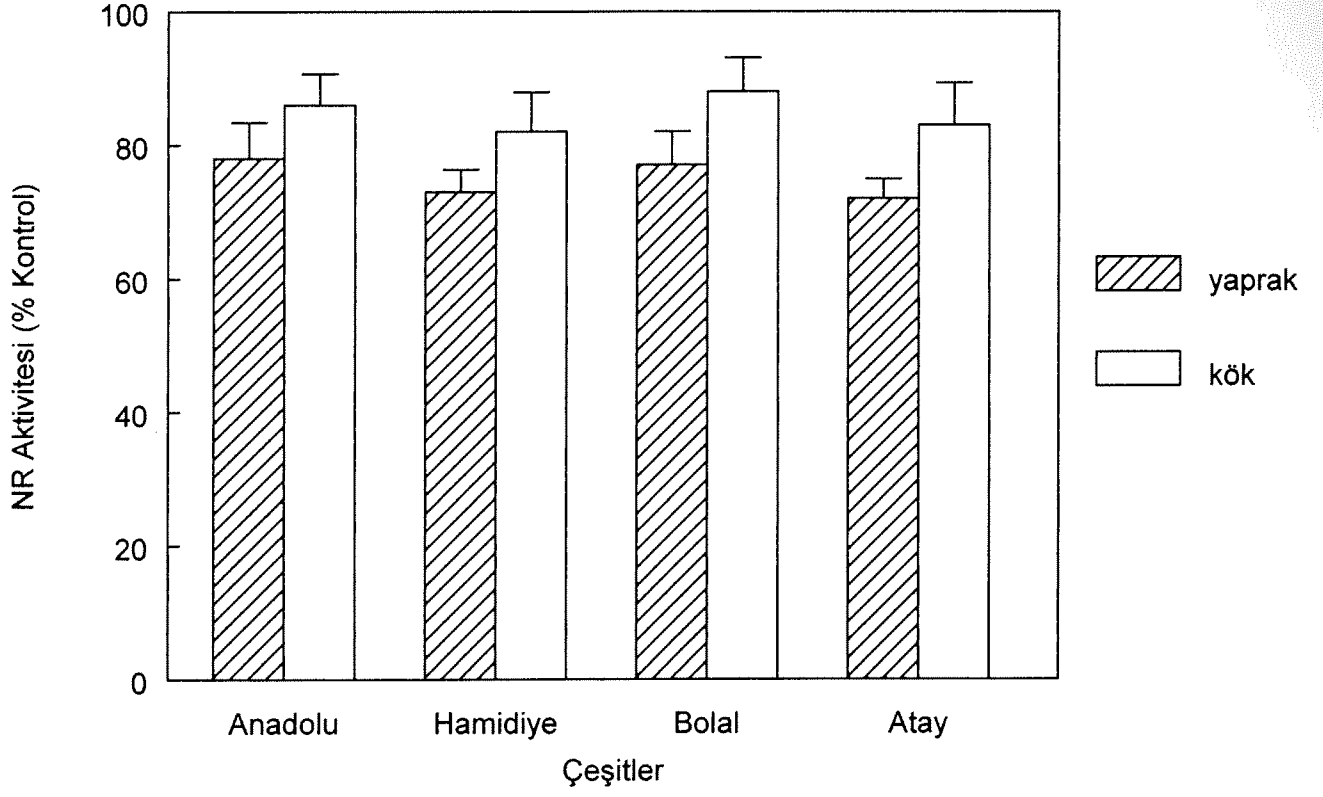
3.7.1 Bor Stresinin Nitrat Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Nitrat redüktaz (NR) aktivitesi bora dayanıklı ve hassas buğday ve arpa çeşitlerinin kök ve yaprak dokularında incelenmiştir. Bor stresi 5 gün süre ile 10 mM H₃BO₃ şeklinde 10 günlük fidelere verilmiş, sonuçlar kontrol bitkileri ile karşılaştırılmıştır.

3.13 şeklinde görüldüğü gibi boron stresi uygulanmasının ardından dayanıklı ve hassas çeşitlerde yaprak NR enzim aktivitesinde azalma gözlenmektedir. NR aktivitesindeki azalma bora dayanıklı buğday çeşitlerinden Bolal'de %13, hassas olan Atay'da %18 olarak bulunmuştur. Arpa çeşitleri için bu değerler bora dayanıklı Anadolu'da %22 ve hassas Hamidiye çeşidinde %17'dir.

Kök dokularındaki değişiklikler şekil 3.13'de görüldüğü gibi buğday çeşitlerinde Bolal %23.2; Atay %28.3 arpada Anadolu %22.4 ve Hamidiye %27.5 azalma olarak gözlenmiştir. %100 NR aktivite ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$) olarak ifade edilmiştir.

Fazla bor miktarının buğday ve arpa yaprak ve kök NR aktivitelerinde direkt azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Ancak çeşitler ve dokular arasındaki aktivite değişimleri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p<0.05$). NR aktivitesinin çevresel stres koşullarına duyarlı olduğu bilinmekte olup yüksek kadmium derişimlerinde ve düşük sıcaklıkta azaldığı gösterilmiştir (Atkin ve Cummins, 1995). NR, Molybdenumun (Mo) gereksinimi olan enzimlerden biridir (Campbell ve Smarelli, 1986). Molybdenumun enzime bağlanmasında boronun antagonist etkisi olabileceği ileri sürülmüş ve fazla bor olduğu durumlarda, bitkilerde Mo miktarında düşüş olduğu Bonilla ve arkadaşları (1980) tarafından gösterilmiştir. Proje kapsamında elde edilen bulgular bu gözlemi doğrular niteliktedir.



Şekil 3.13. 5 gün 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış buğday ve arpa türlerindeki kök-yaprak örneklerindeki NR aktivitesi değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi .

3.7.2. Bor Stresinin Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

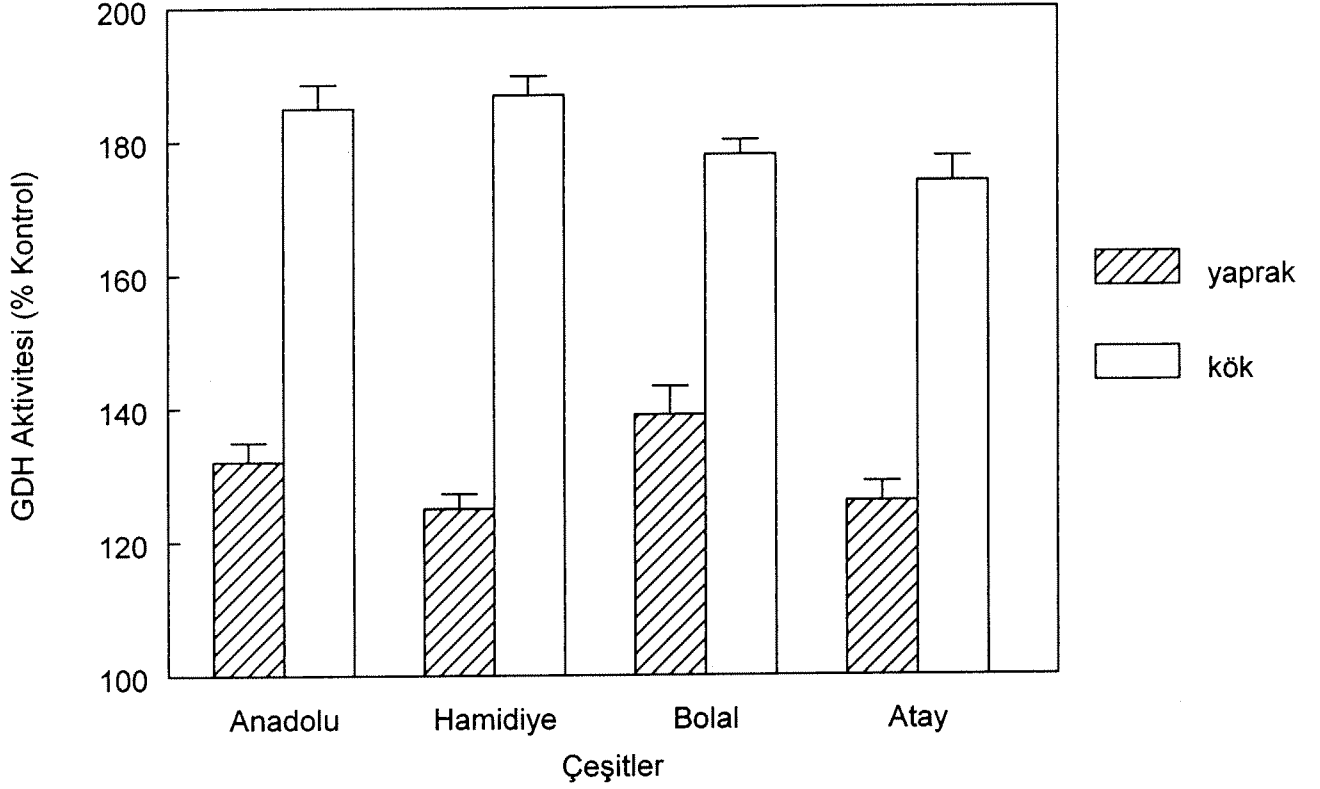
Dayanıklı ve hassas buğday ve arpa çeşitlerinde yaprak ve kök dokularında glutamat dehidrogenaz aktivite ölçümleri bor stresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) numuneler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.14 de görüldüğü gibi bor toksisitesi altında enzim aktivitelerinde önemli artış gözlenmektedir. Kök ve yaprak numuneleri karşılaştırıldığında kök dokusundaki artışın her iki bitki türünde de önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmalarımızda kök dokusunda gözlenen yüksek GDH aktivitesi literatürdeki bulgularla paralellik göstermektedir. (Sirivastara ve Sink, 1987).

Bor toksisitesi sonucunda köklerde %74 ve %87 oranında artış gözlenirken bu artış yaprak dokularında %25 ve %39 oranındadır. Glutamin sentetaz/glutamat sentaz yolu normal büyüme koşullarında anayol olarak bilinmesine rağmen bazı stres koşullarında devre dışı kalmaktadır. Boussama ve arkadaşları (1999) Cd stresi altında GDH'ın koruyucu etkisini rapor etmiştir. Bu grup yüksek Cd koşulları uygulanan arpa fideciklerinde GDH aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde pirinç bitkilerinde 100 mM NaCl stresi altında kök GDH aktivitesinde artış olduğu Lutts ve arkadaşları (1999) tarafından belirtilmektedir.

Yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda bugüne kadar bor toksisitesinin buğday ve arpa GDH aktivitesi üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. GDH'ın amonyak ile inkübasyonu sonucunda artış gösterdiği ve bitki dokularında amonyak akümülyasyonunu baskılamak için bir cevap olarak oluştuğu gösterilmiştir (Peeters ve Vanlaraere, 1992).

Dokularda yeterli miktarda amonyak bulunduğunda GDH'ın direkt olarak prolin biyosentezinde substrat olan glutamat oluşumu ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bor toksisitesi altında GDH aktivitesindeki artışın prolin oluşumunu arttırdığı ve bitkilerde strese dayanıklılık mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülebilir. Şekil 3.14 de görüldüğü gibi buğday dokularında bu gözlenirken arpa dokularında benzeri bir paralellik gözlenmemektedir. Bu bulgular buğdayın arpaya nazaran bor

daha dayanıklı olması hususuna destek sağlayıcı bir gözlem olarak da nitelendirilebilir.



Şekil 3.14 5 gün 10 mM H₃BO₃ stresi uygulanmış buğday ve arpa türlerindeki kök-yaprak örneklerindeki GDH aktivitesi değişimlerinin yüzde kontrol olarak ifadesi

Elde edilen bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, NR aktivitesinin tüm çeşitlerde ve her iki dokuda da bor toksisitesi altında düştüğü gözlenmektedir. Düşüşler hasas ve dirençli çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir.

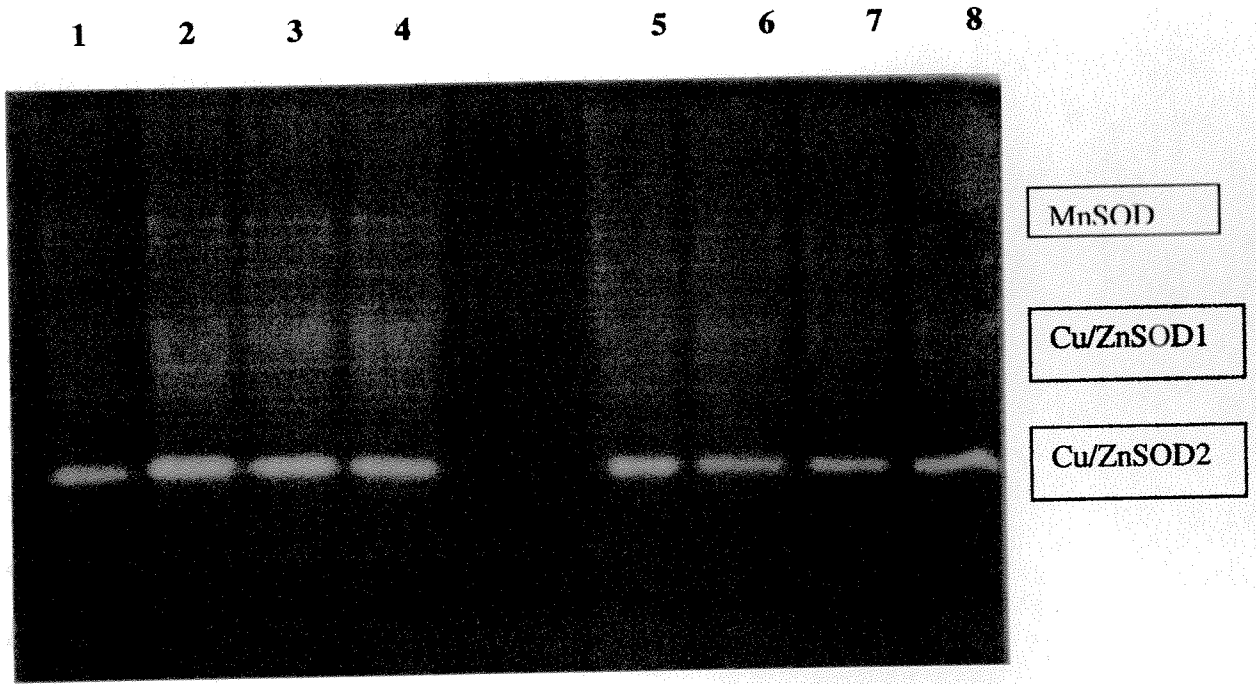
GDH aktivitesinin ise bor stresi altında arttığı, bu artışın ise kök dokularında, yaprağa nazaran istatistiksel olarak daha fazla olduğu gözlenmektedir. Arpadaki artışlar hassas ve dirençli çeşitler arasında farklılık göstermezken, buğdayda dirençli çeşidin yaprak dokusundaki artışın hassas çeşide oranla istatistiksel olarak daha fazla olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçlar, dirençli çeşitlerde GDH'ın yaprak dokusundaki artışın bor toksisitesine direnç mekanizmasında rol oynayabileceğini göstermekle birlikte, arpada benzeri sonuçlar elde edilememiştir. Elde edilen sonuçların, aynı tür ve diğer türlerin hassas ve dirençli çeşitlerinde de araştırılması eğer varsa bu mekanizmanın bor toksisitesine direnç oluşmasında rol aldığını açıklığa kavuşturacaktır.

3.7.3. Bor Stresinin SOD Aktivitesi Üzerine Etkisi

SOD enzim aktiviteleri poliakrilamid jellerde aktivite boyama tekniği ile belirlenmiştir. Boyama sonucu elde edilen aktivite bantları, densitometrik analize tabi tutularak, bant yoğunlukları kontrol ile karşılaştırılarak, farklı çeşit ve dokulardaki SOD aktivitesi % kontrol olarak ifade edilmiştir. Buna ek olarak jeller KCN ve H₂O₂ mumalesi yapıldıktan sonra boyanarak SOD izoenzimlerinin tip belirlemesine gidilmiştir. Proje kapsamında deneyler buğdayda iki kez tekrar edilmiş ve kontrole göre % değişimin ortalama değerleri verilmiştir. Deneylerden elde edilen örnek bir sonuç Şekil 3.15 de gösterilmektedir.

Tuz stresinin, buğdayın kök ve yaprak dokularındaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırdığımız daha önceki çalışmalarda, buğdayda Mn ve Cu/Zn olmak üzere başlıca iki izoenzim olduğu gösterilmiştir (İnci F., 1998). Proje kapsamında arpa üzerinde yürüttüğümüz çalışmalarda da benzeri sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen izoenzim profilleri buğdayla büyük benzerlik göstermektedir. Her iki türde de, total SOD aktivitesinin yaklaşık %90'lık bölümünü Cu/ZnSOD (%40 Cu/ZnSOD1, %50 Cu/ZnSOD2) oluşturmakta olup, MnSOD aktivitesi ise %10 mertebesinde gözlenmektedir. Bu husus total SOD aktivitesi hesaplamalarında da gözönünde bulundurulmuştur.

Elde edilen bulgular bor stresi altında arpa ve buğday çeşitlerinin SOD aktivitelerinde değişimler olduğunu göstermektedir. Yaprak ve kök dokularında kontrole göre % değişimler Tablo 3.14 ve 3.15'de gösterilmektedir.



Şekil 3.15. Bor stresi uygulanmış buğday ve arpa varyetelerindeki SOD izoenzim aktivite değişimleri. Jele yüklenen örneklerin sıralaması aşağıdaki gibidir.
1. Atay kontrol, 2. Atay 10 mM H₃BO₃, 3. Hamidiye kontrol, 4. Hamidiye 10 mM H₃BO₃, 5. Anadolu kontrol, 6. Anadolu 10 mM H₃BO₃, 7. Hamidiye kontrol, 8. Hamidiye 10 mM H₃BO₃, 9. Anadolu kontrol, 9. Anadolu 10 mM H₃BO₃

Tablo 3.14: Bor toksisitesine dirençli (Bolal, Atay) ve hassas (Atay, Hamidiye) buğday ve arpa çeşitlerinde, 10 mM bor stresi sonrası yaprak dokularındaki SOD aktivitesinin kontrole göre değişimi. Toplam SOD aktivitesi hesaplanırken, izoenzimlerin toplam aktivite üzerindeki oranları (Mn/SOD:%10, Cu/ZnSOD1:%40, Cu/ZnSOD2:%50) gözönünde tutulmuştur

	BOLAL	ANADOLU	ATAY	HAMİDİYE
MnSOD	60% ↓	12% ↓	50% ↑	0.3% ↑
Cu/ZnSOD1	30% ↑	55% ↑	40% ↑	24% ↓
Cu/ZnSOD2	35% ↓	28% ↓	70% ↑	34% ↓
TOPLAM SOD	11% ↓	29% ↑	56% ↑	27% ↓

Tablo 3.15: Bor toksisitesine dirençli (Bolal, Atay) ve hassas (Atay, Hamidiye) buğday ve arpa çeşitlerinde, 10 mM bor stresi sonrası kök dokularındaki SOD aktivitesinin kontrole göre değişimi.

	BOLAL	ANADOLU	ATAY	HAMİDİYE
MnSOD	3% ↓	2% ↓	5% ↑	18% ↑
Cu/ZnSOD1	40% ↑	0.1% ↓	30% ↑	178% ↑
Cu/ZnSOD2	30% ↑	31% ↑	10% ↑	175% ↑
TOPLAM SOD	31% ↑	15% ↑	17% ↑	102% ↑

Elde edilen bulgular, bor toksitesi altında SOD aktivitesinin hem izoenzim hem de doku seviyesinde farklı oranlarda değişikliğe uğradığını göstermektedir. Buna ek olarak özellikle yaprak dokularında, buğday ve arpada gözlenen aktivite değişikliklerinde de farklılıklar olduğu saptanmıştır. Örneğin, yaprak dokularında toplam SOD aktivitesi açısından, buğdayın dirençli çeşidinde bir düşüş gözlenirken, arpanın dirençli çeşidinde ise artış gözlenmektedir.

Kök dokularında ise bor toksitesi altında toplam SOD aktivitesinde genelde bir artış gözlenmektedir. Bu artış buğdayın dirençli ve hassas çeşitleri arasında önemli bir fark göstermezken, arpanın hassas çeşidinde gözlenen artışın dirençli çeşide nazaran çok daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, toplam SOD aktivitesi açısından, bor stresi altında hassas ve dirençli çeşitler ve dokular açısından bir bağlantı gözlenememiştir. Ancak deneylerin diğer hassas ve dirençli çeşitler üzerinde tekrar sayısı artırılarak gerçekleştirilmesinin yukarıda bahsi geçen ilişkilerin daha sağlıklı olarak irdelenbilmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

Ülkemizin belirli yörelerinde, topraktaki bitkilere yarayışlı borun toksik seviyelere ulaştığı ve tarımsal üretimi düşürdüğü bilinmektedir (6-18 mg/kg toprak). Ayrıca İzmir, Denizli, Balıkesir yöresindeki yeraltı termal suları yüksek düzeyde bor derişimi içermekte olup bu sularla yapılan sera ısıtıcılığı sonrası suyun çevreye verilmesi sonucunda oluşan bor toksisitesinin tarımsal problemler yarattığı bilinmektedir. Bor toksisitesi özellikle Orta Anadolu bölgesinde Eskişehir ve Konya tarım alanlarında çinko eksikliği ile beraber görüldüğünde zararlı etkileri artan en önemli mikroelement problemidir.

Bu çalışmada bor toksisitesinin buğday ve arpa üzerinde oluşturduğu etkiler moleküler seviyede incelenmiştir. Denemede kullanılan dirençli ve hassas çeşitlerin incelenen parametler açısından farklılıklarından hareketle,

- a: Bu sistemlerin bor toksisitesine direnç mekanizmasında rol oynayıp oynamadığı,
- b: Kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin bor toksisitesine dirençli ve hassas çeşitlerin belirlenmesinde kullanılıp kullanılmayacağı,

sorularına da cevap aranmıştır.

Her ne kadar, verilen sonuçlar en az iki tekrarın ortalaması olsa da, bazı analizlerde gözlenen yüksek sapmalar nedeniyle, ion geçirgenlik, prolin miktarları, uzunluk-ağırlık denemeleri ve SOD aktivite tayinlerinin örnek sayısı artırılarak tekrarında fayda olacağı görüşündeyiz.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, fizyolojik parametreler açısından bor toksisitesinin tüm çeşitlerde FSII aktivitesini düşürdüğü ve hücre zarlarında önemli seviyede hasar oluşturduğu gözlenmektedir. Bahsi geçen bu parametler tüm çeşit ve dokularda benzerlik gösterirken, uzunluk, yaş-kuru ağırlık, ve prolin miktarları hem çeşitler hem de dokular arasında farklı oranlarda değişiklikler göstermektedir.

İncelenen biyokimyasal parametler genel olarak ele alındığında, protein profillerinde çok belirgin farklılıklar gözlenmemekle birlikte, dirençli çeşitlerde bazı yeni

proteinlerin sentezlendiği gözlenmiştir. Protein profillerindeki değişim literatürde diğer stres koşulları (örneğin sıcaklık, tuz gibi) altında oluşan değişimle mukayese edildiğinde çok daha düşük seviyededir. Tüm çeşit ve dokularda hücre duvarı üronik asit miktarlarında anlamlı değişikliklere rastlanamamıştır. Azot redüktaz enzim aktivitesi tüm çeşit ve dokularda düşüşe uğrarken, glutamat dehidrogenaz aktivitesinde kök dokusunda daha belirgin olmak üzere bir artış gözlenmiştir. SOD aktivitesindeki değişimler ise çeşit ve doku bazında farklılıklar göstermiştir. Kök dokularında genel bir artışa rastlanmaktadır.

Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, bor toksisitesinin, her iki türün, incelen tüm çeşitlerinde bazı parametreleri benzeri şekilde etkilediği gözlenmektedir. Ortak olan bu etkiler, FSII aktivitesindeki düşüş, hücre zarlarında oluşan hasar, ve azot metabolizmasında önemli görevi olan NR ve GDH enzimlerinin aktivitelerinde gözlenen sırası ile düşüş ve artışlardır. Bu sonuçlar, toksik bor derişiminin bitkilerde fotosentez ve azot metabolizmasını etkilediği buna ek olarak hücre zarlarında da hasar oluşturduğunu göstermektedir. Hücre zarlarında oluşan zararın nedeninin belirlenebilmesi için ek denemelere ihtiyaç vardır (örneğin H₂O₂, ve lipid peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehid (MDA) tayinleri gibi).

Bor toksisitesine direnç mekanizmasının anlaşılmasına yönelik olarak yapılan değerlendirme sonucunda, özellikle FSII aktivitesinin her iki türün dirençli çeşitlerinde bor toksisitesi altında daha az etkilendiği gözlenmiş olup, bu sistemin direnç mekanizmasında önemli rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer analizlerde ise türler arasında farklılık gözlenmekle birlikte, tür bazında bazı parametrelerin dirençli çeşitlerde, hassas çeşitlere oranla daha iyi bir performans gösterdiği belirlenmiştir (örneğin, buğday yaprak GDH aktivitesi gibi). Ancak bir genelleme yapılabilmesi için diğer türlerin hassas ve dirençli çeşitlerinde de bu bulguların teyid edilmesi gerektiği görüşündeyiz.

Buna ek olarak sonuçlar türlerin bor toksisitesine dirençleri açısından değerlendirildiğinde de ilginç sayılabilecek sonuçlar gözlenmektedir. Genel anlamda buğdayın arpaya nazaran bor toksisitesine daha dirençli olduğu bilinmektedir. Bu durum gözönüne alındığında, prolin miktarındaki değişimlerin (bor stresi altında her iki buğday çeşidinde artış gözlenirken, arpa çeşitlerinde düşüş gözlenmektedir) türler

arasındaki direnç farklılığında önemli rolü olabileceği sonucuna varılmaktadır. Hücre zarlarında oluşan hasarlarda (arpa çeşitlerinde daha yüksek) bu gözlemi doğrular niteliktedir. Ancak bu hususun, prolin metabolizmasında rol alan enzimlerin bor toksisitesi altında aktivite ve ifade seviyelerinin belirleneceği deneylerle de desteklenmesi gerekmektedir

Elde edilen mevcut bulgular ışığında, proje kapsamında kullanılan analizlerden, FSII aktivite tayinlerinin, bor toksisitesine dirençli ve hassas çeşitlerin belirlenmesinde kullanılabileceği sonucu çıkmaktadır. Ancak bu sonuçların aynı ve farklı türlerin diğer hassas ve dirençli çeşitlerinde de teyit edilmesinde fayda olacaktır.

Son olarak, dirençli çeşitlerin köklerinde bor toksisitesi altında gözlenen yeni proteinlerin diğer hassas ve dirençli çeşitlerde de belirlenebilmesi durumunda, bunların bor toksisitesine dirençli çeşitlerin saptanmasında bir markör olarak kullanılabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu sonuç, diğer dirençli çeşitlerde de doğrulanabilmesi durumunda özellikle ileride yürütülebilecek “proteogenomik” araştırmalarında kullanılabilecek niteliktedir.

Proje kapsamında incelenen birçok parametre, literatürden takip edilebildiği kararıyla, buğday ve arpada bor toksisitesi altında ilk kez incelenmektedir. Araştırma kapsamında, iki yüksek lisans ve bir doktora tez çalışması gerçekleştirilmiş, üç adet makale yayınlanmış ve iki adet makale de hazırlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alkan A., Torun B., Köleli N., Çakmak İ., Kalaycı M., Ekiz H., & N., Çakmak İ., Kalaycı M., Ekiz H., Yılmaz A., Genetic variability in response of different wheat genotypes to boron toxicity in Turkish soils, *International Wheat Conference*, Ankara, (Haziran 10-14/1996) Abstracts p: 269.
- Ahmed E.R.A., Labavitch J.M., A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content, *J. Food Biochem.* 1: 361-365, (1977).
- Arnold D.I., Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beat vulgaris*, *Plant Physiol.*, 24, 1-15, (1949).
- Atkin O.K., Cummins W.R., The effect of root temperature on the induction of nitrate reductase activities and nitrogen uptake rates in arctic plant species, *Plant and Soil.* 159: 187-197, (1994)
- Avcı M., Zencirli N.. Mart 1997'de yapılan görüşmeden alınmıştır. TKB, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
- Bagheri A., et al., Genetic variation in response of pea (*Pisum sativum* L.) to high soil concentration of Boron, *Plant and Soil*, 146, 261-269, (1992).
- Bagheri A., et al., The response of *Pisum sativum* L. germplasm to high concentrations of soil boron, *Euphytica*, 75, 9-17, (1994).
- Blum H., Beier H., H.J. Gross., Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 8: 93-99 (1987)
- Blumenkrants N., Asboe-Hensen G., New method for quantitative determination of uronic acid, *Anal. Biochem.*, 54, 484-489, (1973).
- Bonilla I., Cadahia C., Carpena O., Hernando V., Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet, *Plant and Soil*, 57: 3-9, (1980)
- Boussam N., Ouariti O., Ghorbal M.H., Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress, *J. Plant Nutr.*, 22 (4&5): 731-752, (1999).
- Burke J.J., Oliver J.M., Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutase, *Plant Physiology*, 100, 103- 107, (1992).
- Campbell W.H., J.J. Smarrelli, 1986. Nitrate reductase biochemistry and regulation. In *Biochemical Basis of Plant Breeding*. Ed. C, Neyra. pp. 1-39. CRC Press, Boca Raton, FL. 1986.
- Campbell T. A., et al., Breeding wheat for tolerance to soil boron, *International Wheat Conference*, Ankara, Haziran 10-14 (1996), Abstracts 280-281.

- Chantachume R. et al., Screening for boron tolerance in wheat by solution culture in filter paper, *Plant and Soil*, 177, 249-254, (1995).
- Chetti M.B., Nobel P.S., High temperature sensitivity and its acclimation for photosynthetic electron transport reactions, *Plant Physiol.*, 85, 1063-1067, (1987).
- Chunyuan H., Robin D.G., Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at cellular level, *Plant and Soil*, 126,295-300, (1990)
- Çakmak İ., Zinc deficiency and boron toxicity as critical nutritional problems in wheat production in Turkey, *International Wheat Conference*, Ankara, (Haziran 10-14, 1996), Abstracts, 279.
- Damerval C., de Vienne D., Zivy M., Thiellement H., Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins, *Electrophoresis*, 7: 52-54, (1986).
- Delauney A.J., Verma D.P.S., Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.*, 4, 215-223, (1993).
- Epstein E., The anomaly of silicone in plant biology, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 91, 11-17, (1994).
- Goldberg S., Boron and its role in crop production, Chemistry and mineralogy of boron in soils, CRC Press, 1993, pp: 334.
- Graham R.D., Effect of zinc deficiency on accumulation of boron and other mineral nutrients in barley, *Soil Sci. Soc. Am.J.*, 51, 652-657, (1986).
- Gupta U.C. and Jane Y.W., Boron deficiency and toxicity , *Canadian Journal of Soil Science*, 65, 381-409, (1985).
- Holloway R.E. and Alston A..M., The effects of salt and boron on growth of wheat, *Aust. J. Agric. Res.*, 43, 987-1001, (1992).
- Hochstrasser D.F., Harrington M.G., Hochstrasser A.C., Miller M.J., Merril C.R., Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis, *Anal. Biochem*, 173: 424-435, (1988).
- Hu H., Brown P.H., Localisation of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin, Evidence for a structural role of boron in the cell wall, *Plant Physiol.* 105: 681-689, (1994)
- Hu H., et al., Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin, *J. of Exp. Botany*, 47 (295), 227- 232, (1996).
- İnci F., *Characterization of wheat superoxide dismutase isoenzymes under stress conditions*, (M.Sc.), O.D.T.Ü., Biyoteknoloji A. B. D., Ankara, (1995).

- İnci F., Öktem H.A., Yücel M., Effect of water deficit conditions on superoxide dismutase isoenzyme activities in wheat, *Cereal Research Communications*, vol.26, No.3, pp.297- 304, (1998).
- Inze D., Van Montagu M., Oxidative stress in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 6, pp. 153-158, (1995).
- Jaworski E.G., Nitrate reductase assay in intact plant tissues, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 43(6), 1274-1279, (1971).
- Kalayci M., Alkan A., Cakmak I., Bayramoglu O., Yilmaz A., Aydin M., Ozbek V., Ekiz H., Ozberisoy F., Studies on differential response of wheat cultivars to boron toxicity, *Wheat: Prospects for global improvement*, ed: Braun H.L., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, (1998), p: 189-195.
- Krishnan M., Nguyen H.T., Drying acrylamide of slab gels for fluorography without using gel drier and vacuum pump, *Anal Biochem.*, 157, 51-53, (1990).
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, (1975).
- Lutts S., Majerus V., Kinet J.M., NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings, *Physiol. Plant*, 105: 450-458, (1999).
- Matoh T., Ishigaki K., Ohno K., Azuma J., Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots, *Plant Cell Physiol.* 34: 639-642, (1993).
- Mengel K., Kirkby E.A., . "Boron". Principles of plant nutrition 4th ed Bern, Switzerland, (1987), pp:559-572.
- Nable R.O., Resistance to boron toxicity among several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism, *Plant and Soil*, 112,45-52, (1988).
- Nable R.O., Paull G., Mechanism and genetics of tolerance to boron toxicity in plants, *Current Topics in Plant Biochem. & Phys.*, 10, 257-273, (1991).
- Nable R. O., Banuelos G.S., Paull J.G., Boron toxicity, *Plant and Soil*, 198, 181-198, (1997).
- Nanjo T. et al., Antisense supression of the proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.*, 461, 205-210, (1999).
- Naqvi S.M.S, Özalp V.C., Öktem H.A., Yücel M., Two-dimensional electrophoresis of protein with a different approach to isoelectric focusing, *The analyst*, 119, 1341-1344, (1994).
- Neilsen G.H., Yorston J., Van Lierop W., Hoyt D.B., *Can. J. Soil Science*, 65, .213, (1985)
- Özkan F., *Physiological and biochemical responses of wheat varieties to heat stress*, (M.Sc.), O.D.T.Ü., Biyoloji Bölümü, Ankara, (1994).

- Paull J. B., et al., Response of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron, *Euphytica*, 39, 137-144, (1988)
- Paull J. G., Nable R.O., Rathjen A.J., Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding, *Plant and Soil*, vol. 146, pp.251-260, (1992).
- Peeters K.M.U., Vanlaraere A.J., Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat senescing in the dark, *Physiol. Plant.*, 84: 243-249, (1992).
- Ramagli L.S., Rodriguez L.V., Quantitation of microgram amounts of protein in 2-dimensional PAGE sample buffer, *Electrophoresis*, 6: 559-563, (1985).
- Rhodes I. D., Ingvabon R.D., Hatcher J.J., Laboratory determination of leachable soil boron, *Soil. Sci. Soc. Am. Proc*, 34, 871-875, (1970).
- Sage R.F., Ustin S.L., Manning S.J., Boron Toxicity in the Rare Serpentine Plants *Streptanthus morrisonii*, *Environmental Pollution*, 61, 77-93, (1989).
- Singh J.P., et al., Boron uptake and toxicity in wheat in relation to zinc supply, *Fertilizer Research*, 24, 105-110, (1990).
- Srivastava H.S., Singh R.P., Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants, *Phytochemistry*, 26, 597-610, (1987).
- Valentine J.S., Wertz D.L., Lyons T. J., Liou L. L., Goto J.J., Gralla E. B., The dark side of dioxygen biochemistry, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, 253-262, (1998).
- Van Camp W., Capiav K., Van Montagu M., Inze D., Slooter L., Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants over expressing Fe- Superoxide dismutase in chloroplasts, *Plant Physiology*, 112, 1703-1714, (1996).
- Vermaas W.F.J., Functional effects of structural changes in Photosystem II as measured by chlorophyll fluorescence kinetics, *Methods in Cell Biology*, 50, 15-30, (1995).
- Wallace W., The distribution and characteristics of nitrate reductase and glutamate dehydrogenase in the maize seedling, *Plant Physiol.*, 52, 191-196, (1973).
- Welch R.M., Micronutrient nutrition of plants, *Critical Reviews in Plant Science*, 14, 49-82, (1995).
- Yücel M., et al., Sıcaklık, soğukluk, kuraklık, tuzluluk ve metal stresine dayanıklı zirai bitkilerin biyokimyasal ve fizyolojik yöntemlerle tespiti ve gen transferine yönelik çalışmalar, TÜBİTAK, Ankara,, TBGAG-DPT-31 nolu proje sonuç raporu, sayfa 158