

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BOR STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY FİDELERİNE DIŞTAN UYGULANAN
PROLİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

MART 2019
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**BOR STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY FİDELERİNE DIŞTAN UYGULANAN
PROLİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde “DOKTOR (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :23/01/2019

Tezin Savunma Tarihi :11/03/2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Trabzon 2019

ÖNSÖZ

“Bor Stresi Altındaki Buğday Fidelerine Dıştan Uygulanan Prolinin İyileştirici Etkisinin Araştırılması” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmada danışmanlığımı üstlenen, kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca daima yanımda olan sayın hocalarım ve arkadaşlarım Prof Dr. Rabiye TERZİ, Doç.Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER, Doç.Dr. Aykut SAĞLAM, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY, Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN, Öğr. Gör. Asiye SEZGİN ve Cansu ALTUNTAŞ’a teşekkür ederim.

Tez savunma sınavımda bulunarak beni onurlandıran sayın hocalarım Prof. Dr. Ökkeş ATICI VE Doç. Dr. Utku AVCI’ya teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana güvenen, destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen eşim Meral YEDİYILDIZ, oğlum Arda ve kızım Asya’ya ve kıymetli annem, babam ve diğer aile üyelerime sonsuz teşekkür ederim.

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ
Trabzon 2019

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bor Stresi Altındaki Buğday Fidelerine Dıştan Uygulanan Prolinin İyileştirici Etkisinin Araştırılması” isimli bu çalışmanın tamamını danışmanım Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’nun gözetiminde tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/03/2019

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Buğday.....	4
1.3. Stresin Tanımı ve Stres Çeşitleri.....	6
1.3.1. Metal Toksisitesi	7
1.3.2. Bor	9
1.4. Bitkiler ve Bor	10
1.4.1. Borun Bitkilere Alınımı ve Taşınımı.....	10
1.4.1.1. Pasif Taşıma	11
1.4.1.2. NIP Kanallarınca Kolaylaştırılmış Taşınım (difüzyon)	12
1.4.1.3. Aktif Taşıma.....	14
1.5. Bor Toksisitesi ve Bitki Cevapları	15
1.6. Prolin	17
1.6.1. Prolin Sentez Yolu.....	18
1.6.2. Prolin ve Stres Toleransı	19
1.6.2.1. Ozmotik Ayarlama	20
1.6.2.2. Dehidrasyon Esnasında Hücresel Yapıların Korunması	20
1.6.2.3. Redoks Tamponu.....	20
1.6.2.4. İndirgeyicilerin (Redüktanların)Taşınması ve Depolanması	21
1.6.2.5. Sinyal Molekülüdür	21
1.6.2.6. Diğer Antioksidan Moleküller İçin Öncüdür	22

1.6.2.7. Metal Şelatörü Olarak Prolin.....	22
1.6.2.8. Reaktif Oksijen Türleri Süpürücüsü.....	23
1.7. Serbest Oksijen Radikalleri (Oksidanlar).....	24
1.7.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar	26
1.7.2. DNA’da Meydana Gelen Hasarlar	27
1.7.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar	27
1.8. Antioksidan Savunma Sistemi	27
1.8.1. Enzimatik Savunma Sistemi.....	28
1.8.1.1. Katalaz (EC 1. 11. 1. 6).....	28
1.8.1.2. Süperoksit Dismutaz (EC 1.15.1.1).....	29
1.8.1.3. Askorbat Peroksidaz (EC 1. 11. 1. 11).....	30
1.8.1.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1. 6. 4. 2).....	31
1.8.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi	32
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	34
2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan Uygulamalar.....	34
2.2. Su Potansiyeli Ölçümü.....	36
2.3. Lipid Peroksidasyonu Tayini	36
2.4. İçsel Prolin Tayini.....	36
2.5. İçsel H ₂ O ₂ Tayini	37
2.6. Fotosentetik Pigmentlerin Tayini.....	37
2.7. Klorofil Floresans Analizleri	38
2.8. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	38
2.9. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Tayinleri.....	39
2.9.1. Katalaz Aktivitesi.....	39
2.9.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	40
2.9.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
2.9.4. Peroksidaz Aktivitesi	40
2.10. Moleküler Çalışmalar.....	41
2.10.1. Real Time PCR Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması.....	41
2.10.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi	42
2.10.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi.....	42
2.11. Bor İçeriği	43
2.12. İstatistik Analizler	433

3.	BULGULAR.....	45
3.1.	Uygulama Yapılan Bor ve Prolin İçin Konsantrasyon Belirleme.....	45
3.1.1.	Bor Konsantrasyonunun Belirlenmesi	45
3.1.2.	Prolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	45
3.2.	Su Potansiyeli.....	48
3.3.	Lipid Peroksidasyonu.....	49
3.4.	Prolin İçeriği	50
3.5.	H ₂ O ₂ İçeriği.....	52
3.6.	Toplam Klorofil ve Karoteneid İçerikleri.....	54
3.7.	Klorofil a ve Klorofil b İçerikleri.....	55
3.8.	Klorofil Floresansı Parametreleri.....	56
3.8.1.	PS2 Maksimum Kuantum Verimi (Fv/Fm)	56
3.8.2.	Fotokimyasal Olmayan Floresans Kullanımı (NPQ).....	56
3.8.3.	Fotokimyasal Floresans Kullanımı (QP).....	57
3.8.4.	PS 2 Fotokimyasal Verimi	58
3.9.	Antioksidan Enzim Aktiviteleri	59
3.9.1.	Katalaz Enzim Aktivitesi	59
3.9.2.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	61
3.9.3.	Peroksidaz Aktivitesi	62
3.9.4.	Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi	63
3.10.	Prolin Metabolizmasında Görevli Bazı Genlerin İfade Düzeyleri.....	64
3.10.1.	<i>Prolin 5- Karboksilat Sentaz (P5CS)</i> Geni İfade Seviyesi	64
3.10.2.	<i>Prolin 5 Karboksilat Redüktaz (P5CR)</i> Geni İfade Seviyesi	65
3.11.	Bor İçeriği	66
4.	TARTIŞMA	67
5.	SONUÇLAR.....	77
6.	ÖNERİLER.....	79
7.	KAYNAKLAR.....	80
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

BOR STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY FİDELERİNE DIŞTAN UYGULANAN
PROLİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2019, 88 Sayfa

Prolinin bitkilerdeki bor stresinin olumsuz etkilerini azaltabileceği ve bitkinin antioksidan sistemini etkileyeceği hipotezini test etmek için bor stresi altındaki buğday fidelerinde dıştan prolin uygulanmasıyla su potansiyeli, membran hasarı, H₂O₂, içsel prolin ve fotosentetik pigment içerikleri, klorofil floresans parametreleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki (CAT, SOD, POD, GR) değişimler belirlenmiştir. Ayrıca prolin biyosentezinde görev alan Δ1-pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) ve Δ1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyeleri incelendi ve stresle birlikte gen ifadelerinin arttığı bununla birlikte prolin uygulaması ile gen ifadelerinin azaldığı tespit edildi. Yapılan analizlerde bor stresi altında 5 mM prolin ön uygulamasının bitki su durumunu iyileştirdiği belirlendi. Bor stresi koşullarında artan membran hasarı ve H₂O₂ içeriğinin prolin ön uygulaması yapılan fidelerde azaldığı gözlemlendi. Fotosistem 2 maksimum kuantum verimi, klorofil ve karotenoid seviyeleri stresle birlikte prolin ön uygulaması yapılan fidelerde sadece bor uygulanan fidelere göre arttı. SOD ve CAT aktivitelerinin bor stresi koşullarında prolin ön uygulaması yapılan fidelerde uygulama yapılmayanlara göre daha yüksek, GR ve POD aktivitelerinin ise daha düşük olduğu görüldü.

Sonuç olarak, prolin ön uygulaması yapılarak bor stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde antioksidan sistemin uyarıldığı ve prolinin ozmotik düzenleyici ve antioksidan olarak bor stresi etkilerinin yatıştırılmasında etkili bir bileşik olduğu ve fotosentetik verimin devamlılığını sağladığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan enzimler, buğday, bor, prolin, oksidatif stres, *Triticum aestivum* L.

PhD Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE AMELIORATING EFFECT OF EXOGENOUSLY APPLIED PROLINE TO WHEAT SEEDLINGS UNDER BORON STRESS

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2019, 88 Pages

To test the hypothesis that proline may reduce the negative effects of boron stress and affect the antioxidant system in plants, exogenous proline was applied to wheat seedlings under boron stress and the changes in water potential, membrane damage, the contents of H₂O₂, endogenous proline and photosynthetic pigment, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, POD, GR) were determined. In addition, the expressions of genes coding Δ -1-pyrrole-5-carboxylate synthase (P5CS) and Δ -1-pyrrole-5-carboxylate-reductase (P5CR) enzymes involved in the proline biosynthesis were investigated. It was determined that the levels of gene expressions increased under boron stress while the expressions decreased with proline treatment under the stress. Proline pretreatment under boron stress was found to improve the plant water status. Membrane damage and H₂O₂ content increased in the seedlings exposed to boron stress while they decreased in proline pretreated seedlings. Photosystem 2 maximum quantum yield, chlorophyll and carotenoid levels increased in proline pretreated seedlings as compared to only boron applied seedlings. SOD and CAT activities were high in proline pretreated seedlings under boron stress conditions as compared to proline un-treated seedling, while GR and POD activities were low.

As a result, it was concluded that the antioxidant system was stimulated in wheat seedlings exposed to boron stress by proline pretreatment and that proline is an effective compound in stabilizing the boron stress effects as an osmotic regulator and it provides the continuity of photosynthetic efficiency.

Key Words: Antioxidant enzymes, wheat, boron, proline, oxidative stress, *Triticum aestivum* L.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri.....	7
Şekil 2. Borun bitkilere alınımı ve taşınımı	15
Şekil 3. Prolinin yapısı	17
Şekil 4. Bitkilerde prolin metabolizması.....	19
Şekil 5. Prolinin bitkilerdeki fonksiyonları	24
Şekil 6. Bitkilerde SOR üretim alanları ve kaynakları.....	26
Şekil 7. Bitkilerde SOR'ların temizlenmesi	33
Şekil 8. Deney seti 1. gün çimlenmeye bırakılmış tohumlar	35
Şekil 9. Deney seti 11. gün hasat edilmeye hazır fideler	35
Şekil 10. Prolin hesaplamasında kullanılan standart eğrisi ve formülü.	37
Şekil 11. BSA standartlarından elde edilen grafik.	39
Şekil 12. Belirlenen konsantrasyonlara ait klorofil a içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	46
Şekil 13. Belirlenen konsantrasyonlara ait klorofil b içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	46
Şekil 14. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam klorofil içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	47
Şekil 15. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam karotenoid içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.....	47
Şekil 16. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam TBARS içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	48
Şekil 17. Yaprak ve kök su potansiyellerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	49
Şekil 18. Yaprak ve kök TBARS içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle	

gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	50
Şekil 19. Yaprak ve kök prolin içeriğinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	51
Şekil 20. Yaprak ve kök içsel H ₂ O ₂ içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	52
Şekil 21. Toplam klorofil ve toplam karotenoid içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	54
Şekil 22. Klorofil a ve Klorofil b içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	55
Şekil 23. PS2 maksimum kuantum verimi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	56
Şekil 24. Fotokimyasal olmayan floresans kullanımı değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	57
Şekil 25. Fotokimyasal floresans kullanımı değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	58
Şekil 26. Deney gruplarında fotokimyasal verim seviyesinin belirlenmesi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	59
Şekil 27. Yaprak ve kök katalaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.	60
Şekil 28. Yaprak ve kök süperoksit dismutaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık	61

- Şekil 29. Yaprak ve kök peroksidaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık..... 62
- Şekil 30. Yaprak ve kök glutatyon redüktaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir..... 63
- Şekil 31. Yaprak ve kök prolin karboksilat sentaz (P5CS) geni ifade seviyesi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. 64
- Şekil 32. Yaprak ve kök prolin 5 karboksilat redüktaz (P5CR) geni ifade seviyesi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. 65
- Şekil 33. Yaprak Bor içeriklerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık 66

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Buğdayın sistematik yeri.....	5
Tablo 2. Prolinin kimyasal özellikleri	17
Tablo 3. Deney seti.....	34
Tablo 4. Bradford Standartlarının Hazırlanması.	39
Tablo 5. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler.....	42
Tablo 6. RT PCR protokolü.....	43
Tablo 7. RT PCR reaksiyon ortamı	43

KISALTMALAR DİZİNİ

APX	: Askorbat Peroksidaz
AQP	: Akuaporinler
CAT	: Katalaz
B	: Bor
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Trım Örgütü
Fv/Fm	: PS2 Maksimum Kuantum Verimliliği
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSA	: Glutamat Semialdehit
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
MDA	: Malondialdehit
NIP	: Nodulin-Link Intrinsic Protein
NPQ	: Fotokimyasal Olmayan Floresans Kullanımı
δOAT	: δ Ornitin Amino Tranferaz
P5C	: Prolin-5-Karboksilat
P5CS	: Prolin 5-Karboksilat Sentaz
P5CR	: Prolin 5-Karboksilat Redüktaz
P5CDH	: Prolin 5-karboksilat dehidrogenaz
PDH	: Prolin dehidrogenaz
POD	: Peroksidaz
Φ _{PS2}	: Etkili Kuantum Verimliliği
Q _p :	: Fotokimyasal Floresans Kullanımı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBARS	: Tiyobarbitürikasit Reaktifleri
UV	: Ultraviyole ışın

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlılar çevreleriyle sürekli iletişimindedir. Buldukları ortamda olumsuz koşullar oluşmasına bağlı olarak adaptasyon yeteneklerine göre streslerle karşılaşır. Stres, çevre koşullarının bitkilerin büyüme ve gelişmesini negatif olarak etkileyecek şekilde değişmesi durumunda bitkide oluşan olumsuz durum şeklinde belirtilir. Diğer bir açıklamayla stres, bitkiler üzerinde negatif etkileri olan çevre faktörleri olarak da tanımlanabilir (Ashraf, 1994; Büyük vd., 2012).

Bitkiler yaşamları boyunca çeşitli stres faktörü ile karşılaşır ve hayvanlardan farklı olarak bu stres faktörlerine doğrudan maruz kalır. Bu durum büyüme ve gelişmeyi negatif yönde etkilerken, bitki yapısının ölmesine de sebep olabilir. Boyer'e göre (1982) stres faktörleri tahıl üretiminin %70'ni etkileyebileceğini öne sürer. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporuna (2007) göre dünyadaki karasal alanın sadece %3,5'inin herhangi bir çevresel stresten etkilenmediği belirtilmiştir (Boyer, 1982; Velthuisen vd., 2007). Streslerin sebep olduğu yıkım; bitkinin türüne, tolerans ve adaptasyon yeteneğine göre farklılık oluşturabilir (Büyük vd., 2012). Bitkiler, streslerin neden olduğu olumsuzluklarla mücadele edebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Hayat vd., 2012).

Stresler dünyada tarımsal ürün kaybının ana sebeplerinden biridir. Küresel iklim değişiklikleri sebebiyle gelecekte abiyotik streslerin sıklığının ve süresinin artacağı belirtilmektedir. Bu sebeple dünyadaki gıda güvenliğinin sağlanması için streslere toleranslı tahıl çeşitlerinin elde edilmesi çok sayıda ıslah çalışmaları için önemli hale gelmiştir (Duque vd., 2013). Artan nüfusla birlikte beslenme, ülkemizde ve dünyada önemli bir sorun olarak belirmiştir. Dünya üzerinde tarımsal alanların artırılmasının söz konusu olmadığı düşünülürse, nüfusun artmasıyla birlikte ihtiyaç duyulan besin miktarının karşılanması için var olan tarımsal alanlardan daha fazla verimin alınması sağlanmalıdır. Bu çalışmalar ileri derecede geliştirilmiş ıslah yöntemleri ve genetik mühendisliği uygulamaları ile istenilen özelliklere sahip bitkilerin elde edilmesidir (Mohammad vd., 2014). Bitkiler, hayatları süresince doğada çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıkları göz

önüne alındığında stresle alakalı sistemlerin belirlenmesi ve dirençli türlerin ve çeşitlerin tespit edilmesi ve geliştirilmesi değer kazanmaktadır (Büyük vd., 2012).

Bitkiler yaşamalarını devam ettirmeleri için birçok çevresel faktöre gereksinim duyarlar. Bunlardan en önemlilerinden biri besin elementleridir. Bitki dokularında doğada bulunan elementlerin hemen hemen tamamını bulmak mümkündür. Bu elementlerin onaltı tanesi (C, H, N, O, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, B, Cl ve Mo) tüm bitkiler için mutlak gerekli besinlerdir. Diğer altı elementler (Co, Al, Na, Si, Ni ve V) ise yalnızca bazı bitkiler veya metabolik olaylar için gerekli görülen yararlı elementlerdir (Okçu vd., 2009). Metaller, elementlerin çoğunluğunu oluştururlar ve tepkimelerde elektron verirler. Bitkilerde oluşturdukları zararlar incelenirken metal yerine “ağır metal” terimi kullanılmaktadır. Çinko (Zn), krom (Cr), kadmiyum (Cd), nikel (Ni), bakır (Cu), kurşun (Pb), civa (Hg) gibi metaller ağır metal olarak tanımlanır. Bununla birlikte alüminyum (Al) gibi hafif metaller de aynı zararları oluştururlar. Bazı metaller [Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Co] bitkiler ve hayvanlar için gerekli mikro besinlerdir. Mikro besin elementi olsun ya da olmasın tüm metaller belli bir yoğunluğun üzerinde canlılar için zararlıdır (Ayhan vd., 2006).

Bitkiler için gerekli olan mikro besin elementlerinden bir diğeri de bordur (B). Bor, bitkiler tarafından iyon formlarda alınır. Bitkilerin, bor elementine oldukça düşük yoğunlukta ihtiyaçları vardır (Tisdale ve Nelson, 1983). Bitkiler tarafından alınan bor elementinin büyük bir çoğunluğu hücre çeperinde toplanır ve bu yapının kararlılığını artırır (Pan vd., 2012). Bor, nükleik asit ve protein sentezleri ile ilişkili bir elementtir. Bor genel olarak bitkilerde şeker metabolizması ve taşınması üzerinde görev alır. Ayrıca kök gelişimi, çiçek ve meyve oluşumu üzerinde fizyolojik göreve sahiptir. Bor bakımında yetersiz beslenen bitkilerde bu olaylar azalır, bununla birlikte normalin üzerinde bor beslenmesi de zararlı etkiler oluşturur. Bor toksisitesinin dünya çapında tarımsal alanlardaki ürün verimi sınırlayan bir problem olduğu kaydedilmiştir. Bor toksik etkisi nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stres, bitkilerde kök hücre bölünmesinde, lignin-süberin içeriğinde, fotosentetik hızı gibi birçok metabolizma olaylarında azalmalara neden olur (Juan vd., 2008; Ardıç, vd., 2008; Tanaka ve Fujiwara, 2008). Normal seviye üzerinde bor beslenmesi solunum hızını arttırdığı, böylece mutlak asimilasyonu düşürdüğü ifade edilmektedir. Bitkilerde doğal bor beslenmesi olaylarında asimilasyon yapılarındaki bor miktarı genel olarak 2-100 ppm arasındadır (Uygan ve Çetin, 2004). Her bitkinin bor ihtiyacı ve bor içeriği değişiktir. Tek çenekliler, çift çeneklilerden daha az bora ihtiyaç

hissederler. *Ficus* ve Papaya gibi bitkiler ise bora büyük ölçüde ihtiyaç duyarlar. Bor yoğunluğunun belirli değerin üzerinde olması halinde bitki büyümesi durur. Bitki yaprağında sararmalar, yanmalar ve yaralanmalar, olgunlaşmamış yapraklarda solma ve dökülme, büyüme hızının gerilemesi ile bitki veriminin düştüğü görülür (Wilcox, 1958).

Bitkiler kendilerini ağır metal stresinden korumak için çeşitli savunma yöntemleri geliştirmişlerdir. Bunlardan bazıları; antioksidan enzim miktarlarının ve faaliyetlerinin artırılması, prolin, glisin betain, trehaloz, fenolik bileşikler, poliaminler ve tokoferoller gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin fazla miktarda üretilmesi ve biriktirilmesidir (Szafranska vd., 2011).

Optimal olmayan sıcaklıklar, ağır metaller, kuraklık, tuzluluk ve yaralanmalar gibi çeşitli çevresel streslere cevap olarak hücrel homeostasiyi ayarlamak için bitkilerde prolin birikiminin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010; Szafranska vd., 2011). Örneğin bitkilerin bakır stresi koşullarında çeşitli osmolitler biriktirdikleri bilinmektedir. Bu kapsamda prolin en iyi bilinen osmolitlerdendir. Ayrıca prolin dahil bu bileşiklerin antioksidan olarak görev yaptıkları bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009; Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010). Örneğin bakır stresine maruz kalan bitkiler, çeşitli dokularında prolin konsantrasyonunu arttırarak strese cevap oluştururlar (Ku vd., 2012). Yüksek miktarda Bor elementine maruz kalan birçok bitkinin dokularında prolin biriktiği gösterilmiştir (Leblebici ve Ünal, 2017). Prolin bir amino asit olarak elektron kaçaklarının önlenmesinde, makromoleküllerin kararlılığının korunmasında, hücre çeperi bileşeni olarak etkili bir antioksidandır. Ayrıca bitkilerde ağır metal streslerinin azaltılmasında ozmotik düzenleyici, serbest radikalleri temizleyici, metal şelatörü olarak görev yaptığı kaydedilmiştir (Szafranska vd., 2011; Yang vd., 2011).

Bitkiler, antioksidan mekanizmalarla çevresel streslerin olumsuz etkilerini bertaraf etmek konusunda yetersiz olabilirler. Bu nedenle araştırmacılar, genetik iyileştirme veya kimyasal muamelelerle stres toleransının arttırılmasına yönelik çalışmalar yürütmektedirler. Bunlardan genetik mühendisliği yöntemleriyle bitkilerde tolerans geliştirmek daha uzun zaman alan ve daha kompleks işlemlerdir (Ashraf ve Foolad, 2007). Bitki büyümesini ve gelişimini uyarıcı maddelerin bitkilere uygulanması stres toleransını arttırmak için kolay, düşük maliyetli, düşük riskli ve etkili bir yaklaşımdır. Söz konusu kimyasallar arasında özellikle antioksidanlar, sinyal bileşikler, bitki büyüme düzenleyicileri ve osmoprotektanlar bulunmaktadır (He vd., 2009; Hamdia ve Shaddad,

2010). Bir amino asit olarak prolin bu ozmolitler arasında en yaygın olanıdır. Bakterilerden bitkilere kadar birçok canlıda hücrel prolin seviyesinin artışı ile çevresel streslerde hayatta kalma arasında güçlü bir ilişki vardır.

Tahıllar bora karşı hassas bitki çeşitleridir (Eaton, 1944). Tahıl çeşitlerinin bor toksisitesinden etkilenmelerinin sebebi, buğday ve arpanın topraktaki ve dokularındaki bor'un fazlalığına diğer bitki çeşitlerine göre büyük duyarlılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Nebiler vd., 1999; Özkurt, 2000; Başalp vd., 2011). Ülkemizde bor yataklarının yoğun olarak bulunduğu bölgelerde buğday tarımının yapılması göz önüne alınarak bor stresinin buğday üzerine toksik etkisi ve prolinin bu toksik etkideki iyileştirici rolünün belirlenmesi amacıyla çalışmamız için buğday bitkisi seçilmiştir.

Daha önce ifade edildiği gibi ağır metal stresi de dahil olmak üzere diğer çevresel stres durumlarında prolin birikimi ve ozmoprotektan özelliği birçok çalışmada gösterilmiştir (Abraham vd., 2010; Hasanuzzaman vd., 2014; Papon, 2015; Nounjan, 2015; Bordo, 2015). Ancak bor stresi ile prolin birikimi ve prolinin antioksidan özelliği arasında ilişkiyi gösteren bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Prolinin bor stresinde diğer metal streslerinde de olduğu gibi koruyucu özelliği olabileceği ile ilgili bir hipotez geliştirilmiş ve bu hipotezi test etmek için buğday bitkisinde bor stresinde dıştan prolin uygulamasıyla lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksit ve pigment içerikleri analizleri yapılmıştır. Ayrıca birçok çalışmada prolinin çevresel streslerde hem antioksidan madde ve hem de antioksidan sistemi uyaran molekül olduğu gösterilmiştir. Bu durumu net bir biçimde ortaya koyabilmek amacıyla antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPX ve GR), prolin, MDA, H₂O₂, pigment içerikleri ve klorofil floresansları belirlenmiştir. Ayrıca prolin biyosentezinde görev alan $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) ve $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyeleri incelenmiştir.

1.2. Buğday

Tarım faaliyetlerinin başlaması yaklaşık 10.000 yıl öncesine dayandığı belirtilmektedir. Buğdayın bu çağlarda ilk olarak ülkemizin güneydoğusu, Suriye ve İran'ın belirli bölgelerini içeren Mezopotmaya bölgesinde yetiştirilmeye başlandığı söylenmiştir. Kapalı tohumlu ve tek çenekli olan buğdayın (Tablo 1) Dünyada 20.000'den fazla çeşitinin bulunduğu ifade edilmektedir. Buğday bitkisi tek yıllık bir bitki olup

vegetasyon süresi 120-150 gün ve günlük ortalama optimum 20 °C sıcaklıkta yetişen bir bitkidir.

Tablo 1. Buğdayın sistematik yeri

Alem :	Plantae
Bölüm :	Kapalı Tohumlu
Sınıf :	Tek Çenekli
Takım :	Cyperales
Familya :	Poaceae
Cins :	<i>Triticum</i>
Tür :	<i>Triticum aestivum</i> L.

Dünya genelinde tahıllar üretim açısından en yaygın ürünlerdir. Ülkemizde tarımsal üretim bakımından ekim alanı içinde %70 payı bulunmaktadır. İnsan ve hayvan beslenmesinde önemli bir besindir. Endüstride ham madde şeklinde kullanılması, son yıllarda tarım teknolojisindeki gelişmelere ve buğday ürünlerine olan talebin artışıyla doğru olarak artmaktadır.

Buğdayın hammadde olması, adaptasyon alanının genişliği, üretiminin, taşınmasının, depolamasının ve işleme kolaylığının olması gibi sebepler nedeniyle dünya nüfusunun yaklaşık %35-40' ının temel besin maddesidir. Buğday tanesi ortalama %70 nişasta, %9-15 protein, %1-5 yağ, %1,5-3 şeker, %1-2 kül, %10-15 su içerir. Buğday tanesinde karbonhidrat, yağ ve proteinlerin yanında, insan ve hayvan beslenmesinde önemli derecede rolü olan vitaminler de bulunmaktadır (Kün, 1983).

1802 yılında bir milyardan fazla dünya nüfusu, 1927 yılında ortalama iki milyar olmuş ve 2020'de sekiz buçuk milyar, 2030'da dokuz buçuk milyar, 2050'de ise oniki milyar olacağı tahmin edilmektedir. Nüfus artışı ile birlikte artan dünya buğday üretimi de 1960'li yıllarda yaklaşık 222 milyon ton, 2000'li yıllarda 585 milyon ton, 2010 yılında ise 650 milyon ton olarak belirlenmiştir. Dünyada kişi başına buğday tüketimi günümüzde kişi başı 100 kg civarında olduğu tahmin edilmektedir. Dünya ortalama buğday verimi dekar başına 300 kg'a yükselmiş, ancak 2010 yılı itibarıyla mevcut ekim alanlarında ulaşılabilen potansiyelin yaklaşık 1/5'ini üretebiliyoruz demektir.

Ülkemizde, 1930'lu yıllarda 2,5 milyon ton olan buğday üretimi 1967 yılında 10 milyon tona, 2009 yılında ise 20,5 milyon tona çıkmıştır. Bu dönemdeki buğday üretim

artış oranı %72'dir. Bu artışta üretimin yanında ekim alanlarındaki artışların, uygulanan tarımsal tekniklerin ve ıslah çalışmalarının da rolü vardır. Nitekim 1930 yılında 2,8 milyon ha olan buğday ekim alanları, 1967 yılında 8 milyon hektara, yani 2010 yılındaki düzeyine ulaşmıştır. Birim alandan elde edilen verim ise 1930 yılında 92 kg/da iken, 1967 yılında %35,9 artışla 125 kg/da olmuştur. 1967'den 2010'a ekim alanlarındaki artış %1,0 olurken verimdeki artış %104,8 olarak gerçekleşmiştir. Türkiye'nin nüfusu 1927 yılında yaklaşık 13,6 milyon iken, 2010 yılı itibarıyla 73,7 milyon olmuştur. Buna göre 1930 yılından 2010 yılına nüfustaki artış oranı %442 iken, buğday üretimindeki artış oranının %724 olması, genel olarak ülkemizde buğday talebinin karşılanması konusunda bugüne kadar ciddi bir sıkıntının yaşanmamasını sağlamıştır.

Dünyada ana buğday yetiştiren ülkelerin son 10 yıllık analizleri incelendiğinde, 1999 yılında 213 milyon ha olan ekim alanlarının yıllık %0,5 artış ile 2009 yılında 225 milyon ha'ya ulaşmıştır. Bu süre içinde ekim alanlarındaki toplam artış %5,1 civarındadır. Buğday üreten ülkelerin üretim kapasitelerinin oranlarına bakacak olursak %12,6'lık oranla Hindistan, bu ülkeyi %11,80 ile Rusya, %10,74 ile Çin, %8,95 ile ABD takip etmektedir. Türkiye yaklaşık 8 milyon ha ekim alanı ile Dünya buğday ekim alanlarının %3,56'sını oluşturmaktadır. Öte taraftan Avrupa Birliği ülkelerinin %11,37 oranı ile 3.sıradadırlar.

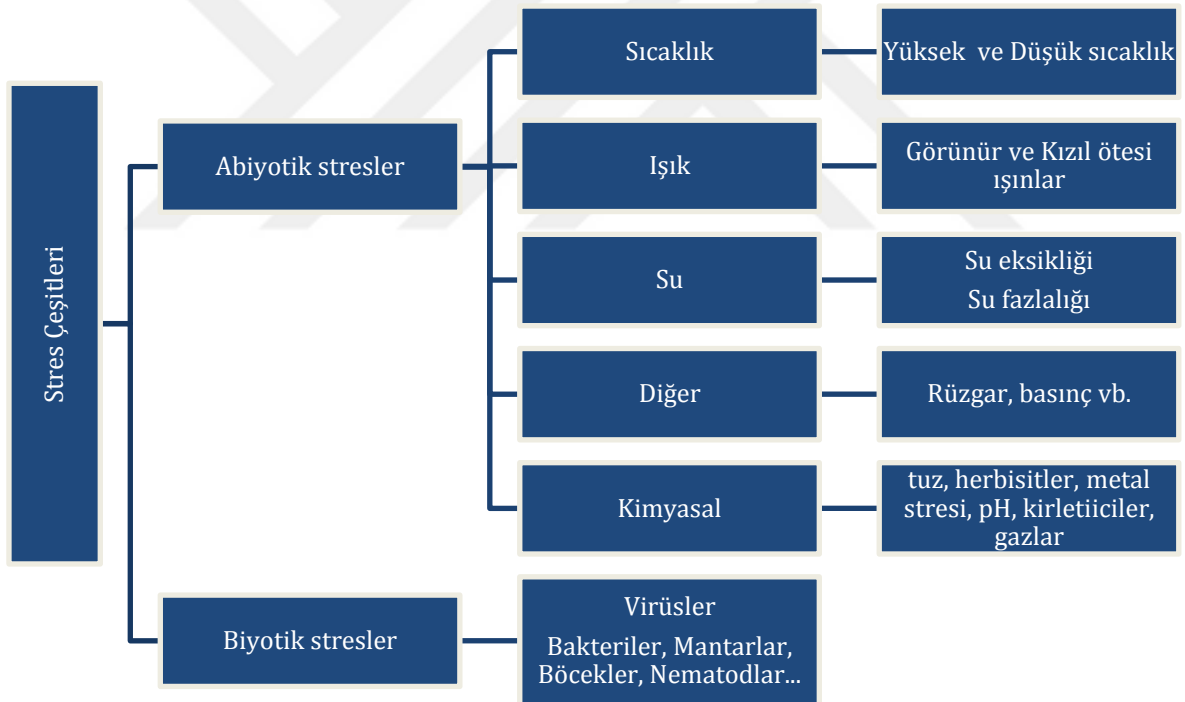
Buğday ekiminin kıtalara göre en çok buğday ekim alanı %45,25 oranında Asya kıtasında, %27,10 oranında Avrupa kıtasında ve %17,31 oranında Amerika kıtasında olduğu görülmektedir. Bu verilere göre buğday yetiştirilen alanların büyük çoğunluğu kuzey yarımkürede bulunmaktadır. Ilıman iklim kuşağının tipik bitkisi olan buğday, Dünyada hemen her yörede yetişebilmektedir (Serpi vd., 2011).

1.3. Stresin Tanımı ve Stres Çeşitleri

Bitkilerde metabolizma, gelişme ve büyümeye etki eden veya durduran, olumsuz olan herhangi bir durum, etken veya madde stres olarak tanımlanır ve bitkilerin toleransı ile yakından alakalıdır (Özcan vd., 2001). Diğer bir deyişle organizmada doğal sistemin çalışmasını durdurma eğiliminde olan negatif etkilere ya da güçlere stres denir (Kadıoğlu vd., 2011).

Levitt'e (1972) göre bitkileri etkileyen başlıca stres faktörleri, canlı (biyotik) ve cansız (abiyotik) olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 1). Abiyotik (cansız) stres faktörleri: yüksek veya düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, sel, zararlı ışınlar, çeşitli kimyasal

maddeler, rüzgâr, oksidatif stres ve besin kıtlığı; biyotik (canlı) stres faktörleri: virüsler, bakteriler ve funguslar gibi patojenler, böcekler ve herbivorlardır (Lichtenhaler, 1996; Ashraf ve Foolad, 2007; Keleş, vd., 2011; Yılmaz vd., 2011; Büyük vd., 2012). Strese maruz kalan bir bitkide; hücre zarının yapısal bütünlüğü bozulur, proteinlerde aktivite kaybı meydana gelir ve oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türleri aşırı derecede üretilir. Bunun sonucunda fotosentez inhibisyonu, metabolik bozukluklar, büyüme bozuklukları, üremede azalma, mitokondri ve peroksizomların yapısında bozulma ve erken senesens meydana gelir (Krasensky ve Jonak, 2012; Sharma vd., 2012). Bitkiler bu durumda hayatta kalmayı sağlamak için çeşitli tolerans mekanizmaları geliştirirler (Sankar vd., 2007). Bu mekanizmalar bitkilerde iki şekilde etkilidir. Birincisi önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin olumsuz etkilerini önlemek ikincisi tolerans mekanizmalarıyla karşı koymak ve yaşamlarını devam ettirmek (Sharma vd., 2012).



Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011).

1.3.1. Metal Toksisitesi

Bitkilerin beslenmeleri için ihtiyaç duydukları elementlere, “Bitki besin elementleri” adı verilmektedir. Bunlar metaller ve ametallerdir (Brohi vd.,1994). Metaller içerisinde ağır metal olarak isimlendirilen, derişimi 5 g/cm^3 'ten fazla olan elementlere denir. Bunlar kurşun, krom, kadmiyum, kobalt, demir, bakır, nikel, çinko ve civa olmak üzere 60'tan fazla element içermektedir. Bu elementler doğada genellikle sülfür, karbonat ve silikat halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunurlar (Kahvecioğlu, vd., 2007). Yüksek derişimlerdeki bazı ağır metaller, bitkileri insanları ve hayvanları olumsuz olarak etkilemektedir. Ağır metaller içinde en zararlı olanlar Cd, Pb ve Hg'dır (Okcu vd., 2009).

Metaller doğada kendiliğinden oluşur (Terzi ve Yıldız, 2013) ve bazıları yeryüzü ekosistemlerinin gerçek elemanlarıdır. Bir kısım metaller gerekli yoğunlukta bitkiler için faydalı, bazıları ise faydalı veya zararlı oldukları henüz belirlenememiştir. Örneğın kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi metallerin bitkiler için faydalı oldukları bilinmemektedir. Bununla birlikte bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi metaller bitki yaşamı için gereklidir. Çinko, metabolizma olaylarında görev alan enzimler için gereklidir. Yüksek konsantrasyonda zararlı olmalarına karşın, bakır (Cu) ve çinko (Zn), fotosentetik elektron taşınımında görev alan moleküllerin parçası ve enzimlerin aktiviteleri için gerekli mikro besin elementleridir (Raven vd., 1999; Okçu vd., 2009). Bu elementler madencilik, enerji ve petrol üretimi, güç transferleri, askeri operasyonlar ve yoğun tarım gibi insan faaliyetleri nedeniyle toprakta birikmektedirler. Bu durum bitkiler, birincil ve ikincil tüketiciler ve insanlar için risk oluşturmaktadır. Cu ve Zn başta olmak üzere ağır metaller proteinler ve birçok enzim için gereklidirler. Ancak ağır metallerin gereğinden fazla toprakta bulunması toksik etki yapmakta ve metabolizma bozulmasına neden olarak bitkide ürün verimini, büyüme ve gelişmeyi inhibe etmektedir. Toksik etki, ağır metallerin proteinlerin sülfür gruplarına bağlanması sonucu proteinlerin yapısını bozması ve aktivitelerini durdurması nedeniyle oluşmaktadır. Ayrıca metallerin bitki dokularında birikmesi sonucunda hücrelerin farklı yapılarında serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olurlar. Bunun sonucunda oluşan oksidatif zarar nedeniyle fotosentez metabolizması ve elektron taşıma sistemi zararları nedeniyle fotosentez hızı yavaşlar. Örneğın bakır fotosentezde ışık reaksiyonu üzerine olumsuz etkisi sonucu fotosistem II'de tilakoid membranlar ve klorofil pigment içerikleri ve karbon fiksasyonu reaksiyonlarının zarar görmesine neden olmaktadır (Okçu, vd., 2009).

Ağır metallerin zararlı etkisi; metal konsantrasyonuna, bulunuş durumuna (metal, iyon, organik bileşik, vs.), çeşidine, etki süresine, bulunduğu ortama vb. faktörlere göre farklılık göstermektedir (Okçu, 2009).

Atom numarası 20'den büyük olan elementler periyodik cetvelin geçiş elementleri olarak tanımlanırlar. Bu grupta 70 kadar element bulunur ve ekolojik olarak yirmisi de önemlidir. Bu elementlerden biri de bor.

1.3.2. Bor

Bor metallerle ametaller arasında metaloid grubundan bir elementtir (Stiles vd., 2010). Periyodik tabloda 2. periyot 3/A grubunda yer almaktadır. Atom numarası 5, moleküler ağırlığı $10,81 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir. Bu grupta Silicon (Si), Arsenic (As) ve Germanyum (Ge) gibi elementler yer almaktadır (Bolanos vd., 2004). Diğer elementlerle kovalent olarak bağlanmaktadır. Doğada boraks, borik asit (H_3BO_3) ve boratlar olarak yer alır. Ortam sıcaklığında çözeltilerde borik asit şeklinde, renksiz, kokusuz, yarısaydam kristaller veya beyaz granüller halinde bulunur (O'Neil vd., 2004). Borik asit zayıf bir asittir, pKa değeri 9.2'dir (Tanaka and Fujiwara, 2008). Doğada az bulunmasına rağmen litosferde ve hidrosferde doğada rastlanan bileşiklerinin (borat minerallerinin) suda çözünürlüğü nedeniyle belli yerlerde yüksek yoğunlukta bulunabilir. Nötral çözeltilerde ve toprakta genelde borik asit ($\text{B}(\text{OH})_3$) şeklinde yer alır. Borik asit üç değerlikli elektrona sahip küçük bir moleküldür. (Brown vd., 2002; Devirian vd., 2003).

Bor, mineral kayaçların aşınması, jeotermal kaynaklar, okyanuslar ve denizler buharlaşmalarla önemli bor kaynaklarıdır (Tanaka ve Fujiwara, 2008). Tarımsal ve endüstriyel faaliyetler, fosil yakıtların kullanılması ve evsel atıklar sonucunda da çevreye bor salınımı gerçekleşmektedir. Ancak bu yolla salınan bor miktarı diğer bor kaynaklarına göre daha azdır (Marco vd., 2012). Bor cevherinin esas maddesi $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 'dur. Bu madde Dünya'da en yaygın olarak Kaliforniya ve Türkiye'de yer almaktadır. Türkiye, Dünyanın en büyük bor yataklarına sahiptir. Ülkemizde özellikle Batı Anadolu Bölgesi dünyada genelindeki bor yataklarının %61'ine sahip durumdadır. Ayrıca yapılan çalışmalar, Orta Anadolu ve GAP bölgelerindeki bor toksisitesinin optimum üretimi sınırlandırarak kadar yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir (Alıcı ve Öncel, 2008).

Bor endüstride yaygın olarak kullanılır. Ticari ürünlerde ve materyallerde bor pentahidrat, boraks, sodyum perborat, yalıtım maddeleri, borsilikat cam, yangın önleyici

ürünler, cam elyafı, yüksek teknoloji ürünleri, herbisit, kimyasal gübreler ve seramik gibi birçok ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Tanaka ve Fujiwara, 2008).

1.4. Bitkiler ve Bor

Borun bitkilerdeki temel görevi 1923 yılında bakla (*Vicia faba*) ile yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Bolanos vd., 2004; Zhao vd., 2010). O tarihten beri bitkiler için birçok metabolik olayda rol alan önemli bir mikrobesein elementi olduğu bulunmuştur (Bolanos, 2004; Kocabek vd., 2009; Zhao vd., 2010; Pang vd., 2010; Keleş vd., 2011; Lamdan vd., 2012). Bitkilerde bor elementi karbohidratların taşınmasında, hücredeki fenol seviyesinin kontrolünde ve kök gelişmesinde, nükleik asit metabolizmasının uyarılmasında, pektin ve lignin bileşiklerinin sentezlenmesinde ve bunlarla kompleks oluşturarak ince fakat dayanıklı bir hücre çeperinin oluşumunun sağlanmasında, membran fonksiyonlarının muhafaza edilmesinde ve membran bütünlüğü fonksiyonunda, enzimlerin aktivasyonunda, çiçeklerin açması ve polen üretimim ve çimlenmesinde (Bowen ve Gauch , 1965; Rerkasem, 1997; Toprak, 2001; Gezgin vd., 2005; Pan vd., 2012) protein, oksin (indol asetik asit) ve azot metabolizmalarında, hormonların hareketinde, meyvelerin olgunlaşmasında, bitki-su ilişkisinde, solunumda, hayvanlarda karbohidrat, mineral metabolizmalarında, enerji tüketiminde ve bazı enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi gibi olaylarda rolü olduğu kabul edilmekle birlikte moleküler temelleri tam olarak anlaşılamamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar borun hücre çeperi yapısındaki pektin çapraz bağlarının oluşumunda görev aldığı gösterilmiştir (Alicı ve Öncel, 2008; Tanaka ve Fujiwara, 2008; Juan, vd. 2011).

1.4.1. Borun Bitkilere Alınımı ve Taşınımı

Bor hareketli bir besin elementi olmadığından yaşlı yapraklarda birikmekte ve yapraklarda klorozis ve nekrozisler gibi tipik toksisite septomlarına neden olmaktadır (Tanaka 2008; Keleş vd., 2011; Masood vd., 2012). Uzun zaman bitkilerin boru topraktan almalarının tek yolu olarak pasif taşıma düşünülmekteydi (Raven, 1980; Hu ve Brown, 1997; Dannel vd., 2001; Kato vd., 2009). Daha sonraki çalışmalarla borun pasif taşınımının dışında iki yolun daha olduğu gösterilmiştir. Köklerden alınan bor yapraklara

ksilem veya floem yoluyla taşınır. Ksilemde bor taşınımında terleme olayı etkilidir ve taşınan bor genel olarak yaşlı yapraklarda yaprağın tabanından ucuna doğru biriktirilir. Floem yoluyla alınan bor ise aktivitenin yüksek olduğu genç yapraklar, meyve ve tohumlara taşınır. Bazı bitki türlerinde bor dokulara alındıktan sonra yeniden dağıtımı yapılır (Dannel vd., 2001; Tanaka, 2008; Marco vd., 2012). Birçok bitki türünde bor yetersizliği durumunda yaşlı yapraklarda biriktirilen bor ile giderilir. Elma, badem, şeftali ve erik gibi bitkilerde bor yetersizliği durumunda bor dokulara eşit şekilde dağıtılır. Hatta bu bitkilerde bor konsantrasyonu genç yapraklarda yaşlı yapraklara oranla daha fazla bulunmuştur. Bu durum borun bitkilerdeki dağılımının sadece ksilemle terleme yoluyla olmadığını göstermektedir. Bu tür bitkiler mannitol ve sorbitol gibi şeker alkollerini yüksek miktarda üretirler. Bu şeker alkollerini borik asite kolayca bağlanan cis hidroksil grupları (Poli-B kompleks) içerir. Bu durum borun floemde taşınmasını sağlar. Gerçekten de Hu ve vd. (1996) kerevizin floem özsuyunda poli-B komplekslerini ölçmüşler ve borun mannitol, sorbitol ve fruktoz gibi şekerlerle kompleks yaptıklarını göstermişlerdir. Transgenik tütün bitkisinde de sorbitol sentez geninin ifadesinin yabancı türe göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tanaka, 2008; Dannel vd., 2001).

Borik asitin membrandan taşınmasında üç mekanizmanın olduğu bilinmektedir.

- I. Pasif taşıma (difüzyon)
- II. BOR taşıyıcıları ile aktif taşıma
- III. NIP (nodulin-link intrinsic protein) ile yapılan kolaylaştırılmış taşıma (kolaylaştırılmış difüzyon)

1.4.1.1. Pasif Taşıma

Yüksüz bir molekül olan borik asit, lipid membrandan çok yüksek bir geçirgenlik katsayısına sahiptir. Raven (1980) teorik olarak borik asit için lipid geçirgenlik katsayısını $8 \times 10^{-6} \text{ cm S}^{-1}$ olarak tahmin etmiştir. Hu ve Brown (1997) borik asit lipid geçirgenlik katsayısı ile ilgili yaptıkları çalışmada Raven'in sonuçlarına benzer değerler elde etmişlerdir. Bununla birlikte bu araştırmacılar sakız kabağının (*Cucurbita pepo*) kök plazma membranında ve *Chara corallina* alg hücrelerinde yaptıkları borik asit geçirgenlik katsayısı çalışmalarında Raven'in bulunduğu değerlerden daha düşük değerler bulmuşlardır. Bu sonuçlar pasif difüzyonun yüksek borik asit konsantrasyonlarında bor taşınmasında

önemli olduğunu göstermektedir. Birçok çalışmada yüksek bor konsantrasyonunda borun bitkilere pasif taşıma yoluyla alındığı gösterilmiştir (Dannel vd., 2001; Kato vd., 2012; Tanaka ve Fujiwara, 2008) Düşük bor konsantrasyonlarında ise bitkinin ihtiyacı olan borun karşılanmasının açıklanması gerekir. Bu durumda bor taşınmasında akuaporinlerin (AQP) önemli bir rol oynadıkları bulunmuştur (Hossain vd., 2014).

1.4.1.2. NIP Kanallarınca Kolaylaştırılmış Taşınım (difüzyon)

İntrinsik proteinler (MIPs), *Arabidopsis*'te borik asit taşınmasında en önemli kanal proteinleri olarak ileri sürülmüştür. 2006'da Tanaka ve vd. *Arabidopsis*'te bor sınırlaması altında normal büyüme döneminde borik asit alınımı için NIP5:1 proteinini tanımlamışlardır. Bu gen mikrodizin analizlerinde bor sınırlaması altında ifadesi artan (upregulasyon) bir gen olarak tanımlanmıştır. NIP5:1 MIP ailesine ait bir aquaporindir (Dannel vd., 2001; Tanaka ve Fujiwara, 2008; Juan vd., 2008; Kato vd., 2009; Pan vd., 2012).

MIP memelilerde, ikiyaşamlılarda, mayalarda, bakterilerde ve bitkilerde altı trans-membran proteinine sahip bir membran proteindir. *Arabidopsis* genomunda 35 MIP geni üyesi bulunmaktadır. Bitkilerde MIP'ler dört alt grup olarak yer almaktadır. Bunlar tonoplast intriksik (gerçek) proteinler, plazma membran intriksik proteinler, küçük temel intriksik proteinler ve nodulin 26 (NOD26) benzer intriksik proteinlerdir (Tanaka ve Fujiwara, 2008; Kato vd., 2009).

NIP alt ailesi bitkiler için spesfiktir. Soya (*Glycine max*) NOD26 NIP alt ailesinin ilk üyesidir. *Arabidopsis*'te NIP genlerinin sayısı dokuzdur. Bazı NIP proteinleri çoklu fonksiyon yaptıkları gösterilmiştir. Gliserol ve üre gibi küçük yüksüz moleküllere aracılık ederler. Borik asitin taşınmasında NIP ailesinin diğer üyeleri *AtNIP2;1*, *OsNIP2*, *AtNIP1;1*, *AtNIP1;2* ve *CpNIP1*'dir. *AtNIP2;1* *Arabidopsiste* laktik asit kanalı olarak tanımlanırken, *OsNIP2* çeltikte silikon kanalları olarak, *AtNIP1;1*, *AtNIP1;2* mayalarda gliserol kanalları ve *CpNIP1* yine mayada üre kanalı olarak tanımlanmışlardır (Tanaka ve Fujiwara, 2008).

NIP'ler hayvanlarda bulunmamaktadır. MIP'lerin diğer üyelerinin hayvanlarda borik asit taşınmasına katılıp katılmadıkları da belli değildir. İnsanlarda akuagliserolporinlerin bazıları AQP3, AQP7 ve AQP9'dur. Bunlar su ve küçük yüksüz moleküllerin taşınmasında görev alırlar. Bu proteinlerden AQP9 geniş substat özgünlüğüne sahiptir. Üre, karbamidler,

polioller, pürinler, pirimidinler ve arsenik gibi moleküllerin taşınmasında görev alırlar (Tanaka ve Fujiwara, 2008).

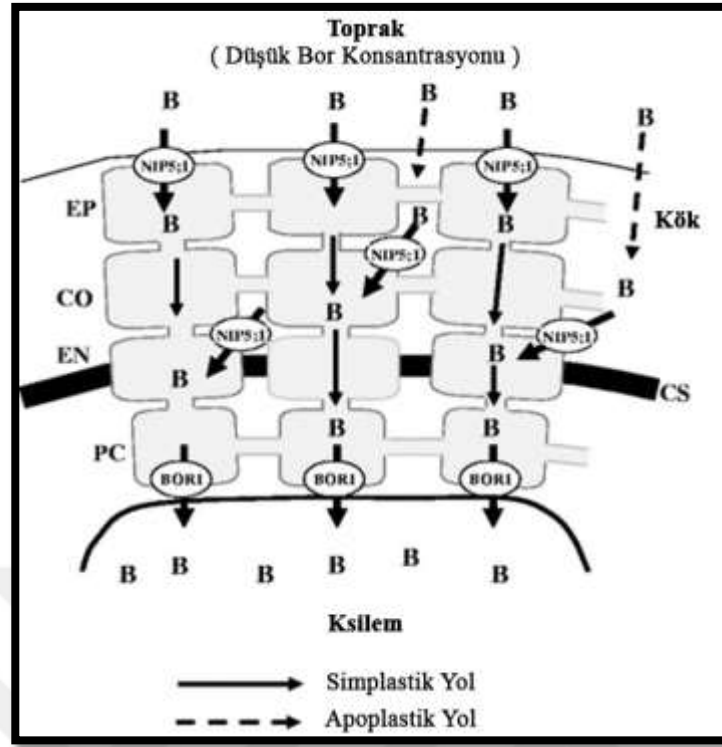
Bitkiler bor eksikliğinde, boru simplastik olarak NIP5;1 aracılığı özellikle kolaylaştırılmış difüzyonla borik asit olarak alırlar. NIP5;1 epidermis, korteks ve endodermiste bulunur. Bu hücresele tabakalarda NIP5;1 tarafından alınan borik asit plazmodesmalar aracılığıyla aktarılır ve perisikle gelir. Perisiklda yer alan BOR1 proteini tarafından aktif taşıma ile apoplasta alınır (Kato vd., 2009; Juan, 2008; Tanaka ve Fujiwara, 2008; Pan vd., 2012; Hossain vd., 2014).



1.4.1.3. Aktif Taşıma

Dannel vd., (2001) yaptıkları çalışmalara kadar uzun zaman boyunca bor taşınımının pasif difüzyonla olduğuna inanılıyordu. Bu araştırmacılar ayçiçeği bitkisinde yaptıkları çalışmada bor taşınmasının konsantrasyon gradiyentine ters gerçekleştiğini göstermişlerdir (Şekil 2). Düşük konsantrasyonda (1 μM) yetiştirilen ayçiçeği bitkisinde dış ortama göre bitki kök hücreleri içeriği ve ksilem özsuyunda daha yüksek bor konsantrasyonları ölçmüşlerdir. Yapılan çalışmaya göre bor eksikliğinde bor alınımının ve ksileme yüklenmesinin aktif taşıma ile yapıldığını ileri sürmüşlerdir (Dannel vd., 2001). 2002 yılında düşük bor koşullarında ksilem yüklenmesi için borun hücreden dışarı atılmasında ilk tanımlanan taşıyıcı BOR1'dir (Kocabek vd., 2009). BOR1 taşıyıcı proteini bikarbonat taşıyıcı üst ailesine (SLC4) aittir. BOR1 plazma zarında yer alır. Maya hücreleriyle yapılan çalışmada *BORI* ifadesi hücrelerdeki borik asit konsantrasyonunu düşürmüştür. Bu nedenle BOR1'in borun hücreden ksileme atılmasında rol aldığı ileri sürülmüştür. BOR1 kökün ortasında perisikl hücrelerinde ifade edilir. BOR1 nokta mutasyonu *Arabidopsis* bitkisinde bor eksikliğinde büyümede ciddi azalmaların olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında bor eksikliğinde BOR1 proteininin borik asitin ksileme yüklenmesinde görevli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2) (Dannel vd., 2001; Tanaka ve Fujiwara, 2008; Juan vd., 2008; Kato vd., 2009).

BORI genine benzer başka genler ökaryotik hücrelerde bulunmuştur. Son zamanlarda çeltikte boron alınması ve ksileme yüklenmesi ile ilgili *OsBOR1* geni, *Saccharomyces cerevisiae*'de *BORI* homologu olan *YNL275w* geni ve memelilerde Na^+ ile bağlanabilen *NaBC1* geni tanımlanmıştır (Juan, 2008; Hossain vd., 2014).



Şekil 2. Borun bitkilere alınımı ve taşınımı (Tanaka ve Fujiwara, 2008)

1.5. Bor Toksisitesi ve Bitki Cevapları

Bor toksisitesi dünya genelinde tarımsal alanlarda ürün verimliliğini sınırlayan yaygın bir problemdir. Kurak ve yarı kurak bölge topraklarında yetişen bitkilerde bor (B) toksisitesinin bitkisel üretime zarar verdiği bilinmektedir (Juan, 2008; Tanaka, 2008; Reid, 2009; Masood vd., 2012). Türkiye’de özellikle Batı Anadolu bölgesinde B kirlenmesinin su kaynaklarını ve tarım alanlarını etkileyen önemli bir problem olduğu bilinmektedir (Kün, 1988; Alıcı, 2008). Dünya genelinde Avustralya, Malezya, Kuzey Afrika, Mısır, Türkiye, Irak, Libya, Suriye, Californiya, Şili, Fas, Ürdün ve Batı Asya gibi bölgelerde düşük yağmur koşullarında toprak tuzluluğu ile birlikte tanımlanmaktadır (Juan vd., 2008; Tanaka, 2008; Stiles vd., 2010;). Bunlara ilave olarak aşırı gübreleme ve sulama suyunda yüksek seviyede bor bulunması toprağın bor açısından zengin olmasına neden olmaktadır. Bor toksisitesi damarlı bitkilerde farklı durumlarda farklı etkiler gösterir. Bor toksisitesinin yaygın görülen semptomları metabolizma değişimi, kök hücrelerinin bölünmesinin yavaşlaması, kuru madde kaybı, tane veriminin azalması, meyve çürümesi, fotosentez oranının düşmesi, yaprak klorofil içeriğinin, lignin-süberin seviyesinin, kök ve sürgün

büyümesinin azalması, (Juan 2008; Reid, 2009) yapraklarda öncelikle uç ve kenarlarda başlayan kahverengi lekeler ile klorozla başlayıp nekrozla devam eden bozulmalar, kabuk nekrozları ve kalsiyum ölümüne bağlı gövde ölümü, yaşlı yaprakların yanık bir görünüm alıp erken dökülmesi şeklindedir (Soy, 2002; Alıcı, 2008; Juan vd., 2008). Ayrıca buğdayda özellikle bitki boyunun uzamasının ve yeşil aksam gelişmesini durduran, büyümeyi geciktiren ve kök gelişimini azaltan bir problem olduğu da çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Alıcı, 2008; Keleş vd., 2011; Masood vd., 2012).

Borun bitkilerdeki optimum ve toksik konsantrasyonu arasındaki aralık son derecedir (Juan vd., 2008; Keleş vd., 2011). Bitkilerdeki bor toleransı türden türe ve aynı türün varyeteleri arasında geniş ölçüde değişkendir. Örneğin sulama suyundaki yeterli bor konsantrasyonuna duyarlı türler için $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ 'den (*Phaseolus vulgaris*) $1-2 \text{ mg L}^{-1}$, yarı toleranslı bitkilerde (*Zea mays* and *Solanum tuberosum*) $2-4 \text{ mg L}^{-1}$, toleranslı (*Daucus carota* and *Cuminos melo*) ve yüksek toleranslı bitkilerde ise $4-6 \text{ mg L}^{-1}$ 'dir. Aynı türlerin daha toleranslı varyeteleri, daha az toleranslı varyetelerine göre daha az bor konsantrasyonuna sahiptir. Bu durum toleranslı bitkilerin boru kökün dışında tutma yetenekleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu bitkiler boru dışarıda tutmak için:

- i. Zar geçirgenliklerini azaltabilirler, veya
- ii. Boru, *BOR* ve *NIP* gibi bor taşıyıcılarıyla sitoplazmadan dışarı atarak birikimini düşürebilirler.

Borun içsel konsantrasyonu $1-5 \text{ mg}$ arasında artırıldıkça büyümeyi engellediği görülmekle birlikte bu durumun protein sentezi veya enerji metabolizmasıyla ilgili olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak bor toksitesisi birçok hücresel süreci zincirleme geciktirdiği ve ışıkta foto-oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (Marco vd., 2012).

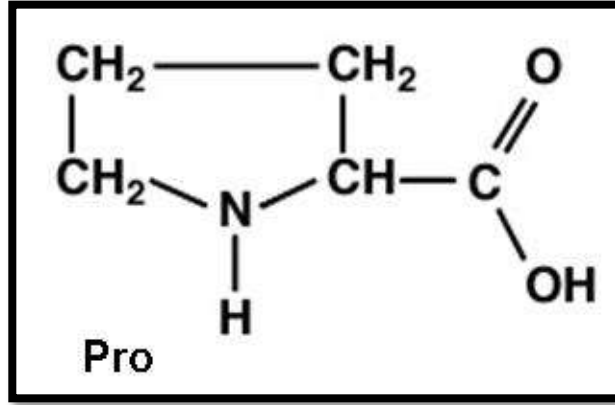
Bitkilerde bor toksitesisinin fizyolojik etkileri tam olarak aydınlatılamamakla birlikte bu konuyla ilgili 3 hipotez ileri sürülmüştür:

- i. Hücre çeperinin yapısında meydana gelen değişimler,
- ii. ATP, NADH ve NADPH gibi moleküllerin riboz şekerlerine bağlanmasıyla oluşan metabolik yıkım,
- iii. Serbest şekerler ve RNA riboz şekeri gibi şekerlere bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişimindeki bozulmalar,

Bitkiler kendilerini bor toksisitesinden korumak için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bu stratejilerden bazıları antioksidan enzim aktivitelerinin artırılması, prolin, fenolik bileşikler, poliaminler, tokoferoller, trehaloz ve glisin-betain gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin fazla miktarda üretilmesi ve biriktirilmesidir (Szafranska vd., 2011).

1.6. Prolin

Bitkiler yaşamaları boyunca tuzluluk, ultra viole ışınlar, yüksek sıcaklık, toksik metal iyonları, soğuk ve kuraklık gibi çeşitli tiplerde çevresel streslere maruz kalırlar. Bu stresler bitkilerde büyüme ve gelişimi, çiçeklenmeyi, meyve verimini ve üreme gibi birçok canlılık olaylarını olumsuz etkilerler (Deivanai vd., 2011; Hayat, 2012; Sharma vd., 2012). Bitkiler bu tip abiyotik streslerin yıkıcı etkilerine karşı koyabilmek için çeşitli fizyolojik mekanizmalar geliştirmişlerdir (Hossain vd., 2014). Optimal olmayan sıcaklıklar, ağır metaller ve yaralanmalar gibi çeşitli çevresel streslere cevap olarak hücrel homeostasiyi ayarlamak için bitkilerde prolin (Şekil 3-Tablo 2) birikimi birçok çalışmada gösterilmiştir (Szafranska vd., 2011; Hossain vd., 2014).



Şekil 3. Prolinin yapısı (URL-1)

Tablo 2. Prolinin kimyasal özellikleri

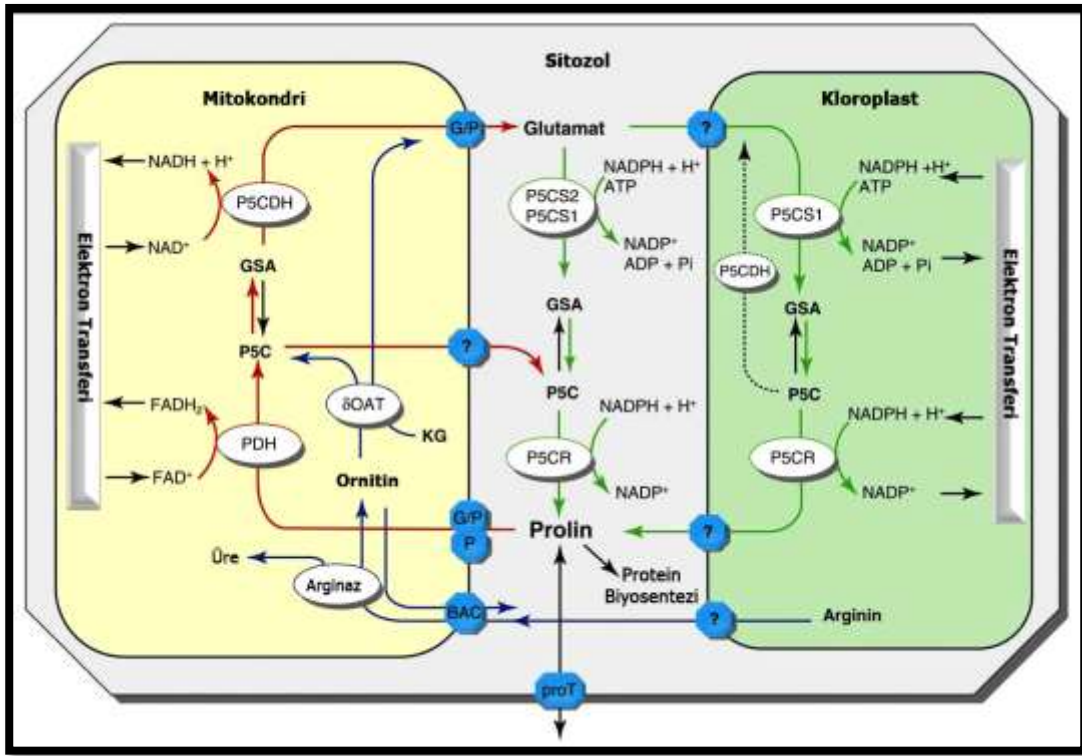
Molekül formül	C ₅ H ₉ NO ₂
Molekül ağırlığı	115,13 g/mol
Erime noktası	205 °C
Molekül kütlesi	115,13 g.mol ⁻¹

Prolin Son zamanlarda yapılan proteomik, genomik ve metabolik çalışmalar prolinin işlevinin başlangıçta inanıldığı gibi basit olmadığını göstermiştir. Yapılan moleküler çalışmalarda prolinin abiyotik streslere tolerans sağlamada önemli bir ozmolit olduğu belirlenmiştir (Hossain vd., 2014). Prolin bir amino asit olarak elektron kaçaklarının önlenmesinde, makromoleküllerin sabitlenmesinde, hücre duvarı bileşeni olarak etkili bir antioksidandır. Bitkilerde ağır metal streslerinin azaltılmasında ozmo-redoks düzenleyici, serbest radikalleri temizleyici, antioksidan sistem aktivatörü, sitoplazmik pH solüsyonu, enerji, azot ve karbon kaynağı, hücresel yapıların kararlılığının sağlanması, metal şelatörü gibi birçok görevi olduğu ileri sürülmüştür (Szafranska vd., 2011; Hossain vd., 2014). Ayrıca kuraklık ve tuzluluk gibi stres durumlarında ozmotik ayarlayıcı olarak rol oynamaktadır (Parida vd., 2008). Bununla birlikte hassas proteinlerin etrafında bir hidrasyon kabuğu oluşturarak stres zararlarına karşı bu proteinleri korurlar (Hossain vd., 2014). NaCl kaynaklı potasyum akışını azaltarak Na^+ ve K^+ ayarlaması yapmaktadır. Ayrıca bitki büyüme ve gelişiminde düzenleyici fonksiyona sahiptir. Prolin birikimi çevresel streslerin belirlenmesinde bir indikatördür ve önemli derecede koruyucu bir role sahiptir (Kırbağ Zengin ve Munzuroğlu, 2006). Birçok yüksek yapılı bitkilerde ağır metal stresi prolin seviyesinde artışa neden olduğu belirtilmiştir. Prolin ROS'ların neden olduğu hücresel zararlara karşı koruma sağlar (Parida, 2008; Yang vd., 2011).

1.6.1. Prolin Sentez Yolu

Yüksek yapılı bitkilerde prolin biyosentezi iki yolla yapılır. Birinci yol glutamat yolu, diğeri ise ornitin yoludur. Glutamat yolunda iki enzim görev alır: $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS; EC 2.7.2.11) ve $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR)'dir. *Arabidopsis thaliana*'da glutamat yoluyla prolin biyosentezi, çift işlevli $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) enzimi tarafından denetlenir. P5CS enzimi glutamik asiti fosforile ederek glutamil-5-semialdehit (G5SA)'e dönüştürür. Bu enzimin P5CS1 ve P5CS2 olmak üzere iki izoformu bulunur. Prolin, G5SA'den pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR; EC 1.5.1.2) enzimi katalizörlüğünde sentezlenir. Bu reaksiyonun hızını belirleyen basamak, P5CS enziminin γ -glutamil kinaz aktivitesidir. Bitkiler üzerinde son yapılan çalışmalarda prolin artışının glutamat artışına bağlı olduğu gösterilmiştir. Ornitin üzerinden prolin biyosentezi ornitin- δ -amino transferaz (δ -OAT) enziminin katalizinde gerçekleşir (Şekil 4). Prolin, sitozol ve kloroplastlarda sentezlenirken

oksidasyonu (yıkımı) mitokondri organelinde iki enzimin ardışık çalışması sonucu gerçekleşmektedir. Prolin burada tekrar glutamata yıkılır. Prolin katabolizması enzimleri prolin dehidrogenaz (PDH; EC 1.5.99.8) ve prolin-5-karboksilat dehidrogenaz (P5CDH; EC 1.5.1.12)'dir. PDH prolini P5C'ye dönüştürdüktan sonra P5CDH, P5C'yi glutamata dönüştürür (Şekil 4) (Kavi Kishor vd., 2005; Szekely vd., 2008; Parida vd., 2008; Abraham vd., 2010; Liang vd., 2013; Singh vd., 2014; Hossain vd., 2014). Stres durumunda içsel prolin seviyesinin birikimi yüksek oranda prolin biyosentezi ile prolin yıkımındaki değişimin toplam etkisi sonucudur. Bu nedenle hücre içi prolin içeriği prolinin biyosentezi, katabolizması ve bitkinin diğer dokularından taşınmasına bağlıdır (Hossain vd., 2014).



Şekil 4. Bitkilerde prolin metabolizması (Szabados ve Savoure, 2010)

1.6.2. Prolin ve Stres Toleransı

Bitkilerde çevresel streslerin zararlı etkilerine karşı içsel prolin seviyesinin artışı önemli bir fizyolojik tepkidir. Birçok çalışmada prolin birikimi ile çevresel streslere tolerans arasında pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür. Bu durum ilk olarak solmuş çimlerde gözlenmiştir. Bitkilerde tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak, ağır metal gibi birçok

abiyotik stres koşullarında çözülebilir maddelerin birikimi genel bir koruyucu mekanizmadır (Kavi Kishor vd., 2005; Hayat vd., 2012; Hossain vd., 2014; Yaish, 2015).

Prolin bitki abiyotik stres fizyolojisinde yaygın olarak çalışılan bir moleküldür. Biyotik ve abiyotik stres tolerans ile ilgili çok sayıda işlevi olduğu belirtilmiştir (Şekil 5).

1.6.2.1. Ozmotik Ayarlama

Prolinin ozmotik ayarlamadaki temel rolü tuzluluk, kuraklık ve aşırı sıcaklık koşullarının neden olduğu hücrel dehidrasyona karşı direnç yeteneğini artırmasıdır. Prolin gibi sitoplazmik ozmolitlerin hücrelerde birikimi hücre su potansiyelinin düşmesi ile ortaya çıkan zararların minimize edilmesinde rol oynar. Bitkiler prolini genel olarak sitoplazma ve kloroplast stromasında biriktirir (Şekil 5). Buralarda biriken prolin miktarı bitkinin tüm dokularında biriktirilen prolin miktarından daha fazladır. Prolinin sitozolik seviyesindeki çok küçük bir değişimi osmotik ayarlama oldukça etkilidir (Kavi Kishor vd., 2005; Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).

1.6.2.2. Dehidrasyon Esnasında Hücrel Yapıların Korunması

Dehidrasyon, bitki büyüme ve gelişiminde en önemli çevresel sınırlayıcıdır. Prolin ozmotik stres durumunda proteinler ve membranlar gibi hücrel yapıların sabitlenmesi, hücrel fonksiyonların korunması ve ROS'ların temizlenmesi gibi birçok işleve sahiptir (Şekil 5). Hücrelerde su içeriği düştüğü zaman prolin hidrofilik etkileşimler yaparak ve hidrojen bağları kurarak ozmotik ayarlama yapar ve hücrel yapıları dehidrasyondan korur. Stres altında fotosentetik aktivitenin ve mitokondride elektron taşıma kompleksi-II'nin korunmasını sağlar (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014). Örneğin polen ve tohumlarda dehidrasyon esnasında osmolit olarak prolin birikimi gösterilmiştir (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).

1.6.2.3. Redoks Tamponu

Çevresel stres durumunda redoks döngüsü bitkilerin antioksidan savunmalarında hayati bir bölümdür. Prolin biyosentezi sırasında NADP⁺ üretilirken, oksidasyonu

sırasında NADPH meydana gelir. Bu nedenle farklı hücrel organeller, sitoplazma ve plastitlerde prolin yıkımı ve sentezi döngüsü redoks için çok önemlidir (Şekil 5). Dolayısıyla bu durum prolinin stres toleransında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Kuraklık stresinde yüksek seviyede prolin birikiminin redoks tamponu olarak önemli bir fonksiyon yaptığı ileri sürülmüştür. Tütün bitkisinde ve fasulye fidelerinde prolin, glutatyon redoks durumunu koruyarak tuz ve kadmiyum stres toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir. Prolinin antioksidan özellikleri yanında hücre içi glutatyon havuzlarını korur. Prolin metabolizması redoks dengesinin sürdürülmesinde hayati bir öneme sahiptir. Stres koşullarında kloroplastlarda prolin biyosentezinin artırılması, düşük NADPH/NADP⁺ oranının sürdürülmesine, redoks dengelenmesine, fotosentez inhibisyonunun ve fotosentetik kısımların zararlarının azaltılmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Hossain vd., 2014).

1.6.2.4. İndirgeyicilerin (Redükthanların)Taşınması ve Depolanması

Prolin ozmotik ayarlamadaki osmolit rolüne ek olarak enerjinin transferi veya depolanmasında ve azalan potansiyelde hayati bir role sahiptir. Bu olay prolinin sentezlendiği yere ve döneme bağlıdır ve bitkinin ihtiyacı olan enerjiyi doğru yerde ve doğru zamanda kullanmasına yardımcı olur (Şekil 5). Stres sonrası büyüme ve gelişimin tekrar devamı için azalan azot ve karbon kaynaklarının tedarikçisi olarak depolandığı kabul edilmektedir. Stresin ortaya çıkmasından sonra prolin içeriğindeki hızlı azalma stres sonrası gelişimin tekrar başlaması için önemlidir. Bu durum stres toleransı için önemli bir belirleyicidir (Hossain vd., 2014).

1.6.2.5. Sinyal Molekülüdür

Stres koşullarında prolin metabolizması ve prolinin çok sayıda işlevi 45 yıldır çalışılmasına rağmen, sinyal yolları ile ilişkili metabolizması hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Son yapılan proteomik ve metabolik çalışmalar göstermektedir ki prolin metabolizması büyük oranda stres sinyalleri tarafından düzenlenmektedir (Şekil 5). Uzun zamandır prolin sadece osmolit olarak düşünülmesine rağmen; son yapılan çalışmalar stres durumunda adaptasyon, iyileşme ve sinyal molekül gibi fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir. Biyotik ve abiyotik stres durumunda metabolit havuzlarının düzenlenmesi,

redoks dengesinin sağlanması, stres ile ilgili genlerin ifadesinde, bitki büyüme ve gelişiminde bir sinyal molekül olarak görev yaptığı birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bunlara ek olarak stres durumunda alternatif enerji kaynağı ve birçok stres tepkisinin hızlı bir şekilde aktivasyonunda hayati önemi olan düzenleyici bir sinyal moleküldür. Aynı zamanda stres sonrası iyileşmede, mitokondriyal fonksiyonların, hücre bölünmesinin ve hücre ölümünün, gen ifadelerinin, bitki büyüme ve gelişiminin, çiçeklenmenin ve protein sentezinin düzenlenmesinde sinyal molekül ve ozmolit olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Tüm bu sonuçlar prolinin hücrelerde çok yönlü bir sinyal molekül olarak birçok fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Kavi Kishor vd., 2005; Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).

1.6.2.6. Diğer Antioksidan Moleküller İçin Öncüdür

Abiyotik stres nedeniyle prolin birikimi uyarılmasının aynı zamanda çok fonksiyonlu antioksidan olan glutatyonun biyosentezini de etkilediği bulunmuştur. Çünkü her iki molekül de glutamattan sentezlenmektedir. Prolin seviyesinin genetik düzenlenmesinin GSH içeriğini de değiştirdiği bulunmuştur (Şekil 5). Kuraklık stresinde antisense transformant bitkilerde prolin içeriğinin düşerken, GSH içeriğinin arttığını, sense transformant bitkide ise GSH içeriğinin düşerken prolin içeriğinin arttığı gösterilmiştir. Benzer ilişki prolin ve poliaminlerin sentezinde de bulunmuştur. Hem prolin hem de poliaminler glutamattan sentezlenir. Sıcaklık stresi altında aşırı prolin üreten transgenik bitkilerin yapraklarında prolin içeriğindeki artışın az olmasına rağmen putresin içeriğinde anlamlı bir artışın olduğu gösterilmiştir. Muhtemelen stres başlangıcında prolin oksidasyonunun poliamin sentezi için bir kaynak sağlamasından kaynaklanmaktadır (Hossain vd., 2014).

1.6.2.7. Metal Şelatörü Olarak Prolin

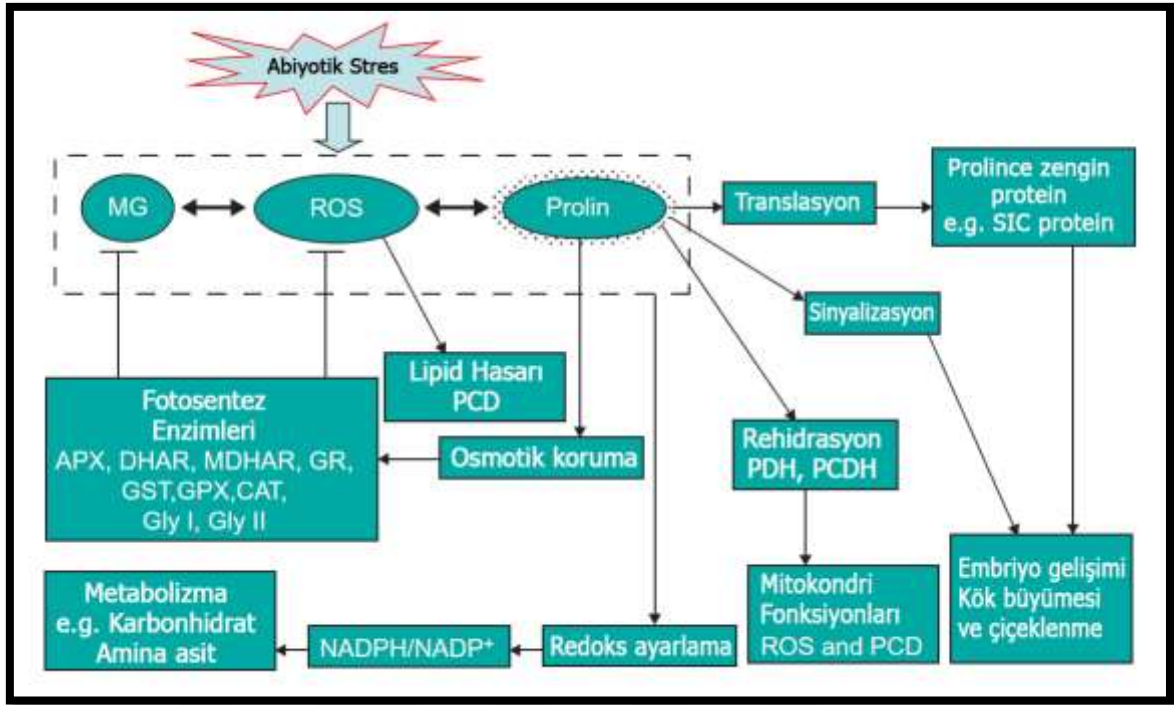
Metal toleransı olan bitkilerin olmayanlara göre hem normal hem de stres koşullarında daha fazla prolin biyosentezi yaptıkları görülmüştür. Bunun sonucunda prolinin metal iyonu şelatörü olduğu ileri sürülmüştür (Şekil 5). Dıştan prolin uygulamasının Zn ve Cd streslerinde nitrat redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerini koruduğu gösterilmiştir. Bu durumun oluşması muhtemelen prolin-metal

kompleksinin oluşması ile sağlanmıştır. Ayrıca *Armara maritima*'da Cu stresinde prolinin metal şelatlama işlevi gözlenmiştir. Bununla birlikte prolin önemli bir metal iyonu bağlayıcısı olabilir ancak bitki şelatlarıyla kompleks oluşturamaz (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).

1.6.2.8. Reaktif Oksijen Türleri Süpürücüsü

Abiyotik stresler nedeniyle hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir. ROS'lar DNA, proteinler ve lipidlerde oksidasyonlara neden olurlar. Bitkilerde stres durumunda singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil (OH) radikali olmak üzere iki ROS meydana gelir. Çok çeşitli ozmolitler arasında ve OH⁻ gibi ROS'ları temizleyerek hücreleri oksidatif zararlardan koruyan tek molekülün prolin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Şekil 5). Bu çalışmalar prolinin bitki hücrelerinde stres durumunda enzimatik olmayan bir antioksidan olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır. Matysik ve vd. (2002) yaptıkları çalışmada prolinin bitkilerdeki 1O_2 temizlemede oldukça etkili bir rol aldığını ileri sürmüşlerdir. Alia ve ark (2001) prolinin 1O_2 'i süperoksit anyonuna $[O-O]^{2-}$ dönüştürmekle temizlediğini ileri sürmüşlerdir. Rustgi vd. (1977) prolinin OH ile reaksiyona girebileceğini söylemişlerdir. Bunlara ek olarak Fenton reaksiyonundan kaynaklanan çok sayıda metal iyonu radikalini prolin bağlayarak OH⁻ karşı korumada yardımcı olduğu belirtilmiştir (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).

Matysik vd. (2002) yaptıkları çalışmada abiyotik stres koşullarında prolinin antioksidan kapasiteyi artırmada daha az rol oynadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar stresin prolin gibi aminoasitlerin birikimini uyardığını ve bunun sonucunda stresle ilgili poliamin gibi diğer moleküllerin biyosentezinde öncü olan maddelerin sentezini sağladığını ileri sürmüşlerdir. Poliaminler ornitin veya arjininden sentezlenir. Ornitin ise glutamattan sentezlenir. Bu nedenle prolin ve poliamin yolu birbiri ile ilişkilidir. Bitkilerde prolin metabolizması abiyotik stres sinyali için önemlidir ve bu durum birçok çalışmada gösterilmiştir (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014).



Şekil 5. Prolinin bitkilerdeki fonksiyonları (Hossain vd., 2014)

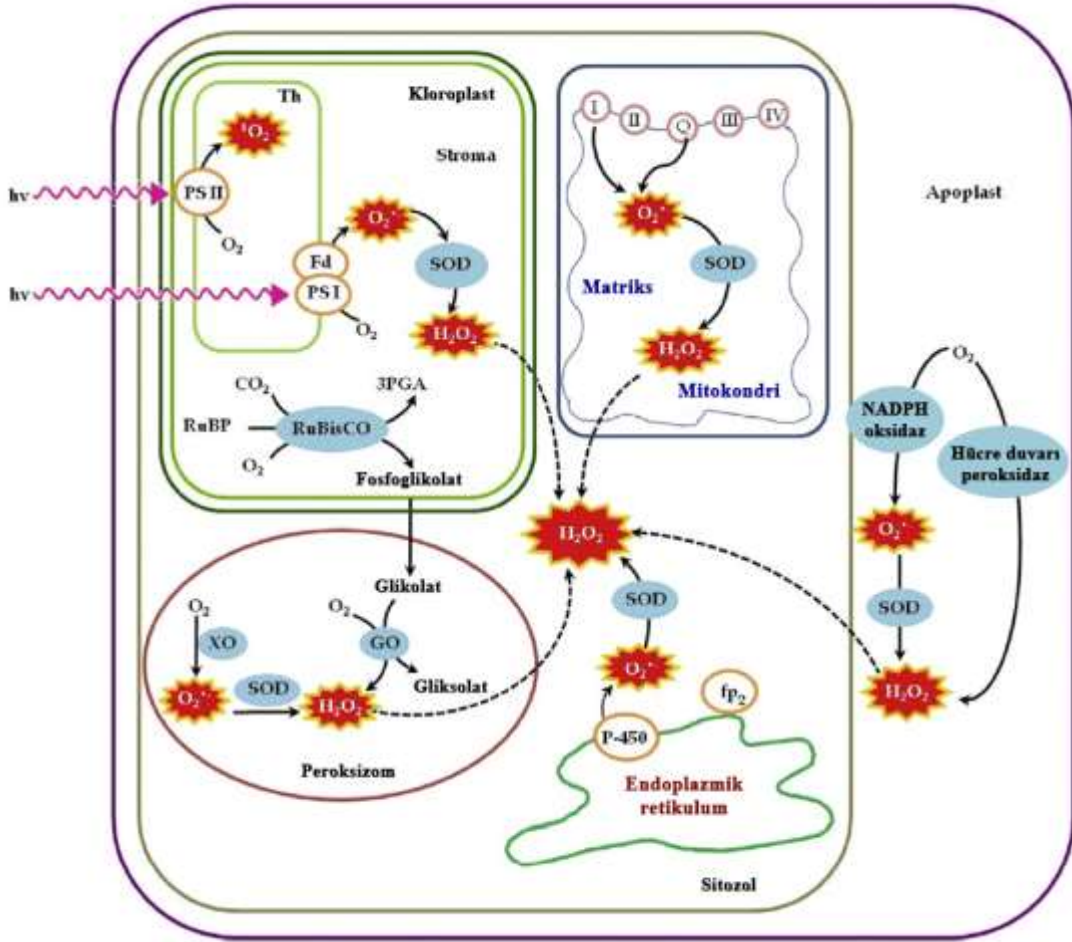
1.7. Serbest Oksijen Radikalleri (Oksidanlar)

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve elektronların bu düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftlenmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftlenmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest oksijen radikalleri” (SOR) denir.

Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Oksidasyon olayı aslında hayatın her evresinde yaşanmakta olan bir süreçtir. Günlük hayatımızda, örneğin kabuğu soyulan bir elmanın bir süre sonra kahverengileşmesini oksidasyon olayına bir örnek olarak verebiliriz. Canlılarda SOR’lar eksojen ve endojen, fizyolojik veya endojen patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir (Şekil 6).

Moleküler oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen, yapısında bulunan iki tane eşleşmemiş elektronu olan biradikal bir molekül olup aynı zamanda canlılarda reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatır ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit unsuru haline gelir.

Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse biyotik ve abiyotik stres faktörlerin etkisi ile oluşur. Metabolizma yan ürünleri olarak oksijen türevli serbest radikaller; süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini ($\cdot OH$) içerir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda ROS'lar üretir (Şekil 6). Hücre içi ROS'un %90'ından fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondri iç membranında üretilir (Gong vd., 2005; Prochazkova, 2001; Wei ve Pang, 2005; Agarwal vd., 2005). İki tarafı keskin bir bıçak gibi kabul edilen ROS, düşük dozlarda çeşitli stres tepkimelerinde sinyal gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlar açar. Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, proteinler, lipidler ve diğer makro moleküllerde hasarlara hatta hücrenin ölümüne neden olur (Prochazkova, 2001; Martin ve Baret, 2002).



Şekil 6. Bitkilerde SOR üretim alanları ve kaynakları (Hossain vd., 2014)

1.7.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar

Proteinlere yapılan oksidatif saldırılar spesifik aminoasit modifikasyonlarına, peptit zincirlerinin parçalara ayrılmasına, çapraz bağ kurmuş ürünlerin kümeleşmesine, elektriksel yük değişimlerine, parçalanmalara duyarlılığın artmasına neden olur. Proteinlerin primer, sekonder ve tersiyer yapısı ve aminoasitlerin çeşidi proteinlerin reaktif saldırılara karşı duyarlılığını değiştirir ve peptidin reaktivitesini etkiler. Özellikle kükürt içeren aminoasitler ve tiol grupları oldukça duyarlı olanlardır (Cicerli, 2004).

Proteinlerin oksidatif olarak zarar görmesi, Fe^{+3} gibi redoks dönüşümü yapabilen metal kofaktörlerin varlığında artar. Böyle durumlarda metal, proteinin iki değerlikli kationları bağlayan bölgesine bağlanır ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonunda hidroksil radikali meydana gelir ve bu radikalde aminoasit dizilerini oksitler (Cicerli, 2004)

1.7.2. DNA'da Meydana Gelen Hasarlar

DNA diğer makromoleküllere nazaran oksidatif hasarlara karşı daha az toleransa sahiptir. Aktif oksijen türleri DNA'da mutasyona kadar birçok ölümcül etkinin oluşumunu tetikler. DNA'nın şeker ve bazları oksidasyona karşı oldukça hassastır ve oksidasyon, bazların degradasyonuna, tek zincirde kırılmalara ve proteinlere bağlanmalara sebep olur (Davies, 2000; Cicerli, 2004).

1.7.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar

Serbest oksijen radikalleri, hücrel membranlara lipit peroksidasyonu yoluyla zarar verir. Peroksidasyon reaksiyonları yağ asitlerinin açıl zincirindeki çift bağlarla serbest oksijen radikalleri arasında gerçekleşir (Cicerli, 2004).

Lipitlerin peroksidasyonu üç farklı adımda gerçekleşir. Bu aşamalar başlangıç, uzama ve sonlanma basamaklarıdır. Reaksiyonun başlama basamağı doymamış yağ asitleri ve hidroksil radikalleri arasında olur. Uzama basamağında ise ilk basamakta meydana gelen yapı triplet oksijenle reaksiyona girer ve ilerleyen reaksiyon basamaklarında lipit peroksitler oluşur. Bu reaksiyonlarda hidroksil radikallerinin rolü yangını başlatan kıvılcım gibidir. Lipit sistemlerinde hidroksil radikallerinin sıra dışı reaktivitesinin temelinde çok düşük konsantrasyonlarda bir zincir reaksiyonu başlatabilmesi yatar. Meydana gelen lipit peroksitler metal katalizleyicilerin varlığında oldukça kararsızdır. Membran lipitlerindeki peroksidasyon reaksiyonu radikal olmayan konjuge ürünleri meydana getirmek için karbon veya peroksi radikalleri ile çapraz bağ kurulduğunda sonlanır. Reaksiyon sonunda malondialdehit gibi aldehitler ve etan ve etilen gibi hidrokarbonlar lipit peroksidasyonunun son ürünleri olarak ortaya çıkar (McKersie, 2000).

İnsanlarında içinde bulunduğu tüm aerobik canlılar oksidatif özellikteki bileşiklerin vereceği hasarlara karşı bir savunma sistemine sahiptir.

1.8. Antioksidan Savunma Sistemi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma

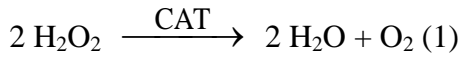
sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir. Antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan iki savunma sisteminden oluşur (Şekil 7).

1.8.1. Enzimatik Savunma Sistemi

1.8.1.1. Katalaz (EC 1. 11. 1. 6)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif bir oksijen türü olup hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda β -oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması gibi normal aerobik reaksiyonlarda oluşturulur ve farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik büyümeden apoptosise kadar birçok hücrel cevap mekanizmasında etkinlik gösterir. Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır. Ayrıca patojenlerin öldürülmesinde de savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 hücrelere zarar verir ve hücrelerde birikimi protein, lipit ve DNA gibi hücrel hedeflerin oksidasyonuna yol açar. Bu durum ise mutasyonların oluşmasına ve/veya hücre ölümüne yol açar. Bu sebeple H_2O_2 'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir ve bu görevde katalaz tarafından yürütülür (Bergmeyer ve Grabl, 1983).

Hidroperoksidaz olarak da isimlendirilen katalaz, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunan ve H_2O_2 'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir (Şekil 7) (Creighton, 1999).



Hidrojen peroksitin (H_2O_2) bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması aerobik ortamda yaşamayı kolaylaştırır (Creighton, 1999).

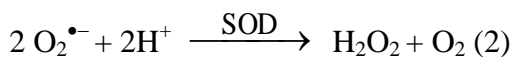
Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend vd., 1992; Streb vd., 1993). Ayrıca H_2O_2 'ye olan zayıf affinitesi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1994). Katalazın büyük bir kısmı peroksizomlarda çok az

miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Katalazın bitki dokusunda H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Patykowski ve Urbanek, 2003). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde H_2O_2 'in ve ROOH gibi bir peroksin radikalliğini gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Chaudiere ve Ferrari-Ilioui, 1999). Bakır stresi altındaki *Spirodela polyrhiza* (Upadhyay ve Panda, 2010), *Atriplex halimus* (Brahim ve Mohamed, 2011) ve fasulye (Andrade vd., 2010) bitkilerinde CAT aktivitesinin uyarıldığı bildirilmiştir.

1.8.1.2. Süperoksit Dismütaz (EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismütaz (SOD), ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve yüksek derecede reaktif olan aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini ($O_2^{\bullet-}$) katalizleyerek organizmalara oksijen varlığında hayatta kalma imkanı veren bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleşir ve sonucunda moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkar. Bu katalitik mekanizma metal iyonunun ardışık oksidasyon ve redüksiyonuna dayanır (Şekil 7). SOD prostetik grup olarak demir, manganez, bakır veya çinkoyu taşıyan bir metalloproteindir. Bu metal iyonları süperoksit radikallerinin enzim aktif bölgesine elektrostatik olarak yönlendirilmesini sağlar. Bu enzim genelde aktif oksijen oluşturan hücre kompartmanlarında bulunur. Cu-Zn içeren SOD birçok ökaryotik canlıdan izole edilmiştir. Ayrıca şaşkırtıcı şekilde birkaç bakteride de rastlanmıştır. Mn-SOD prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondrilerinde tespit edilmiştir. Fe-SOD ise birkaç prokaryotik organizmada bulunmuştur (Öztürk vd., 1999).

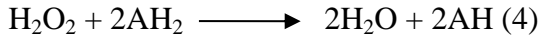
Canlılar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikalinin oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ($O_2^{\bullet-}$) diğerine (H_2O_2) dönüştürür (Şekil 7) (Mehlhorn vd., 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler vd., 1992). *Lolium perenne* L. bitkisinin köklerinde SOD aktivitesinin bakır konsantrasyonundaki artışa paralel olarak uyarıldığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2010). Yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinde tek başına meydana gelen artışların reaktif oksijen türlerine karşı yeterli koruma sağlayamayacağı ve oksidatif stresi tek başına engelleyemeyeceği ileri sürülmüştür (Pitcher vd., 1991).

1.8.1.3. Askorbat Peroksidaz (EC 1. 11. 1. 11)

Askorbat peroksidaz hem peroksidaz enzim ailesinin bir üyesi olup mayadan insana kadar pek çok canlıda bulunur. Askorbat peroksidaz hidrojen perokside bağlı olarak farklı substratları katalizler. Fakat enzimin fizyolojik substratı askorbattır (vitamin C). Askorbatın dışında bazı aromatik substratların (AH₂) da oksidasyonunu katalizler (Şekil 7).



Askorbata bağlı askorbat peroksidaz aktivitesi ilk olarak 1979 yılında bulundu. Bu enzim sınıf I peroksidaz enzim ailesine ait olup bitkilerde, alglerde ve sadece siyanobakterilerde hidrojen perokside bağlı askorbat oksidasyon reaksiyonunu katalizler (Sharp ve Raven, 2003).

Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur (Arora vd., 2002). Bütün askorbat peroksidaz enzimleri elektron vericisi olarak askorbata yüksek özgüllük gösterir. Fakat enzimin fizyolojik koşullarda bulunmayan substratları da okside etme yeteneği de vardır (Raven, 2003). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir. Uzun süre bakır muamelesine maruz bırakılan *Solanum lycopersicon* bitkilerinde APX aktivitesinde önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Chamseddine vd., 2009).

1.8.1.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1. 6. 4. 2)

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir (Şekil 7). Glutasyon redüktaz, redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücrel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. GSH, antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır. Aynı zamanda organik peroksitlerin detoksifiyesinde ve zenobiyotiklerin metabolizmasında görevli glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferaz enzimlerinin substratıdır (Meister, 1983).



GSH'ın antioksidan özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister, 1983; Creissen vd., 1994). GR, bitkilerin kuraklık, yüksek oksijen basıncı ve hava kirleticileri tarafından üretilen oksidatif stresin olumsuz etkilerinin düzeltilmesine ve strese karşı direnç sağlanmasına katkıda bulunur (Sairam vd., 1997). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin temizlenmesinde de görev alır.

Bitkilerde oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi de GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO₂ fiksasyonu azaldığı zamanlarda, NADPH/NADP⁺ oranının ayarlanmasına yardımcı olmaktadır (Şekil 7). Bu nedenle GR tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde büyük bir adım olarak kabul edilmekte (Creissen vd., 1996) ve oksidatif strese karşı korunmada GR'nin önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (Aono vd., 1995). Farklı bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan mısır bitkisinde GR aktivitesinin önemli miktarda arttığı belirlenmiştir (Tanyolaç vd., 2007).

Glutasyon redüktaz hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Bu enzim askorbat glutasyon reaksiyon yolunda görevli önemli bir enzimdir. Bu sistem sayesinde memeliler hemoglobin ve diğer proteinlerini peroksitlerin verebileceği zarardan korur. Glutasyon redüktaz mitokondri ve peroksizomlarda bulunmuştur (Hou, 2004).

1.8.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi

Enzimatik olmayan savunma antioksidan maddeler olarak bilinen salisilik asit (SA), poliaminler, prolin, glutatyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoidler, lignin, tanin gibi bileşikler tarafından yürütülür (Şekil 7) (Senaratna vd., 2000; Szekely vd., 2008; Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010).

Damarlı bitkilerde yaygın olarak bulunan SA bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde ve bitkilerin çevresel streslere cevap oluşturmasında önemli bir görev yapmaktadır (Senaratna vd., 2000). SA etilen sentezini gecikmesine neden olur, membran depolarizasyonunu etkiler, fotosentezi, protein sentezini uyarır ve klorofil içeriğini artırır (Khan vd., 2003; Shakirova vd., 2003). Ayrıca SA'nın ağır metal, herbisist, düşük sıcaklık ve tuzluluk gibi bazı abiyotik strese karşı bazı alışma cevaplarına aracılık ettiği belirlenmiştir (Janda vd., 1999; Metwally vd., 2003).

Poliaminler (PA) bütün bitki hücrelerinde bulunurlar ve biyotik ve abiyotik stres altında savunmada rol oynadıkları kadar büyüme ve gelişimde de etkilidirler (Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010). PA'ların hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, hücre farklılaşması gibi birçok olayda ve sinyal iletiminde ikincil mesajcı olarak görev yaptıkları bilinmektedir (Galston ve Sawhney, 1990). Yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan poliaminler; bir diamin olan putresin (Put), triamin olan spermidin (Spd) ve tetramin spermin (Spm)'dir (Gill ve Tuteja, 2010).

Prolin birikimi stres toleransını birçok yoldan etkileyebilir (Szabados ve Savoure, 2010). Yapılan çalışmalarda birçok bitki çeşidinde strese toleranslı bitkilerde hassas olanlara göre prolin miktarı fazla bulunmuştur (Ashraf v Foolad, 2007). Ayrıca prolin kuraklıkta lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynamaktadır (Molinari vd., 2007).

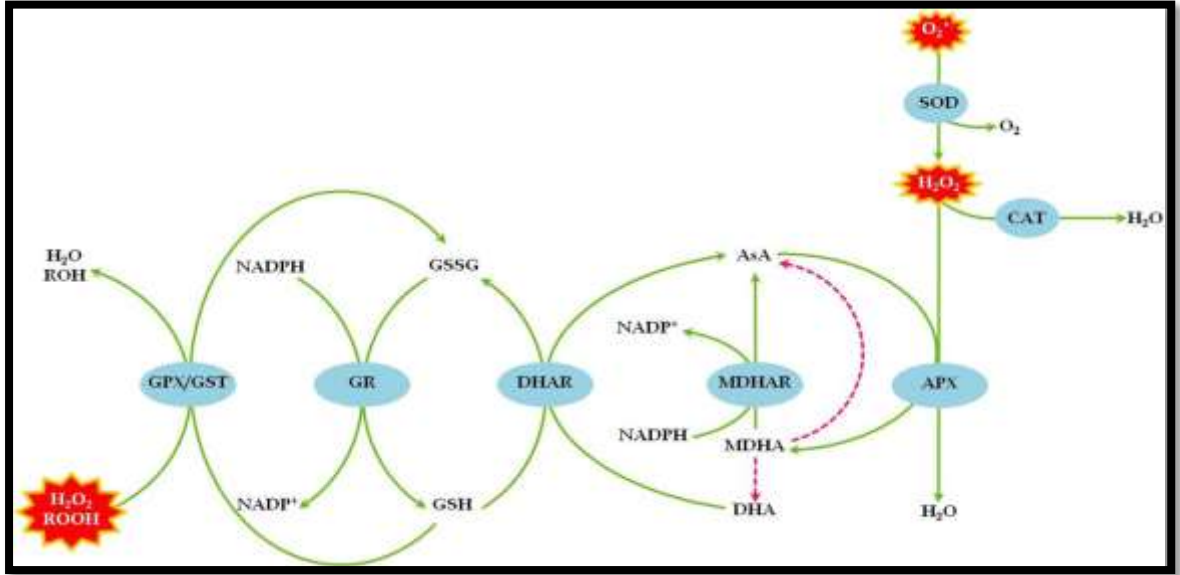
Bir tripeptit olan glutatyon (γ -Glu- Cys-Gly, GSH) düşük moleküler ağırlığa sahip olup dokuda, hücrede ve hücrel kompartmanlarda bulunur. GSH en çok kloroplastlarda mevcuttur, ancak önemli seviyede de sitozolde bulunur. GSH'ın antioksidan özelliği sisteminin sülfidril grubundan kaynaklanır. GSH ikinci bir GSH molekülü ile sülfidril grubundan bağlanarak bir disülfid bağı oluşturur ve okside glutatyon (GSSG) meydana gelir (Şekil 7).

GSH kimyasal olarak singlet oksijen ile süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek ROS'ları etkisiz hale getirmede direk görev alır. Ayrıca lipid

peroksidasyonu sırasında açığa çıkan açıl peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlılığına katkı sağlar (Kanber vd., 1992; Davies, 2000).

Askorbik asit (vitamin C) hayvan ve bitki dokularında bulunan önemli antioksidan bileşikler içerisinde bulunur. Askorbat indirgeyici olarak çalışarak oksidatif hasara karşı koruma sağlar. Ayrıca askorbat birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak da rol oynar.

Hidrofobik doğasından ötürü α -tokoferol membranda yer alır ve iyi bir membran stabilizasyonu gerçekleştirir. Serbest yağ asitleri ile kompleks oluşturabilme özelliklerinden dolayı da membranda deterjan gibi davranarak lipit tabakasının dağılmasına ve membran büzülmesine neden olabilir (McKersie, 2000).



Şekil 7. Bitkilerde ROS'ların temizlenmesi (Hossain vd., 2014)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Yapılan Uygulamalar

Denemelerde bitkisel materyal olarak kullanılan Altındane buğday çeşidi (*Triticum aestivum* L.) tohumları, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Bitki tohumlar sıvı besin solüsyonu (Hoagland) içerisinde çimlendirildi. Prolin ve bor konsantrasyonlarının belirlenmesi için literatüre uygun olarak prolin (Lima-Costa vd., 2010) ve bor (Reid, 2007) uygulamaları gerçekleştirildi. İlk olarak en uygun bor konsantrasyonunu belirlemek için 2mM, 5mM ve 10 mM bor konsantrasyon denemeleri yapıldı. Bitki örneklerinde özellikle yaprak uçları ve köklerde meydana gelen morfolojik değişimler gözlemlendi. Bunun sonucunda 5 mM bor uygulamasına karar verildi. Daha sonra 5 mM bor konsantrasyonu ile birlikte uygulanacak en uygun prolin konsantrasyonu tespit edildi. Bunun için 2 mM, 5 mM ve 10 mM prolin konsantrasyonları denendi. Bu konsantrasyonlarda yetiştirilmiş bitki örneklerinde MDA, klorofil a, klorofil b, toplam pigment ve karotenoid analizleri yapıldı. Analizler sonucunda 5 mM bor konsantrasyonu ile birlikte uygulanacak en uygun prolin konsantrasyonunun 5 mM olduğu görüldü. Ardından deney çalışmaları için tohumlar, sıvı besin solüsyonu (Hoagland) içeren plastik büyütme kaplarına 35 adet tohum olacak şekilde ekildi (Şekil 8-9). Tohumlar sıvı besin ortamında 22-25 °C'de, 16/8 ışık/karanlık ortamında, %50-60 oranda nem içeren yetiştirme odasında çimlendirilip büyütüldü (Şekil 9) (Rizwan vd., 2016). Çimlenen tohumlara öncelikle 3 gün boyunca 5 mM prolin uygulaması yapıldı ve sonrasında 5 gün süreyle 5 mM bor stresine maruz bırakıldı. Çalışmada gerçekleştirilen uygulamaların hepsi Hoagland besin solüsyonu ortamında yapıldı. Deney grupları kontrol, prolin, bor ve prolin-bor şeklinde düzenlendi (Tablo 3). Örneklemeleri takiben yapraklar ve kökler, sıvı azottan geçirilerek -80 °C de saklandı. Su potansiyeli için taze yaprak numunesi kullanıldı.

Tablo 3. Deney seti

Kontrol	5 mM Prolin	5 mM Bor	5 mM Bor-5 mM prolin
---------	-------------	----------	----------------------



Şekil 8. Deney seti 1. gün çimlenmeye bırakılmış tohumlar



Şekil 9. Deney seti 11. gün hasat edilmeye hazır fideler

2.2. Su Potansiyeli Ölçümü

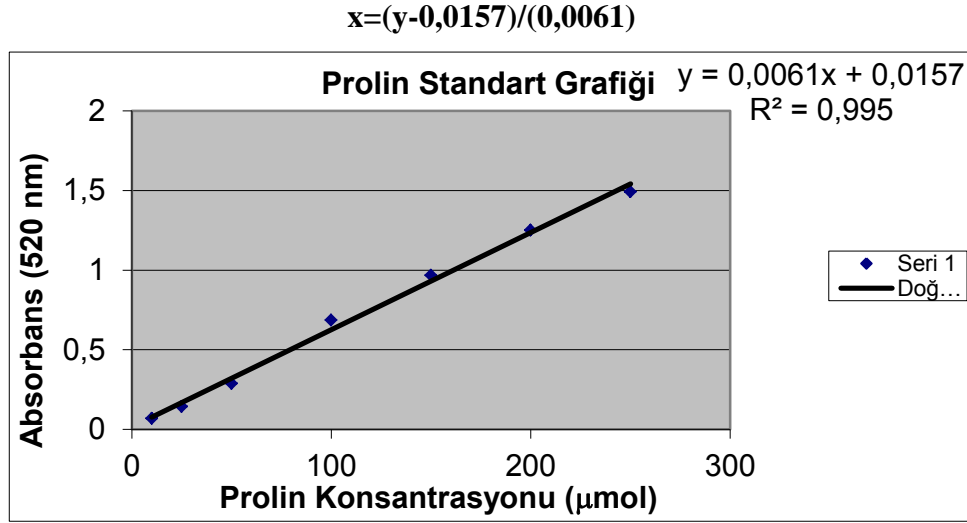
Yaprak su potansiyeli C-52 termocouple psikometre cihazı ile belirlendi (Wescor, Inc., Logan, UT USA). Bitkinin 3. yaprağının geniş yüzeyinden 6 mm çapında alınan diskler, cihazın C52 örnek odacığına yerleştirildi. Numunelerin yaprak su potansiyelleri belirlenmeden önce cihaz 45 dakika kalibre edildi.

2.3. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon miktarı, lipid peroksidasyonun bir ürünü olan tiyobarbitürik asit reaktiflerinin içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968), metoduna göre tayin edildi. Ekstraksiyon %0,1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 15000 g'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, %20 TCA içerisinde hazırlanmış %0,5 tiobarbitürik asit ilave edildikten sonra, süpernatantın absorbansı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç formülde ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) yerine konularak tiyobarbitürikasit reaktifleri (TBARS) konsantrasyonu hesaplandı. ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.4. İçsel Prolin Tayini

Bitki örneklerinden taze ağırlık olarak 0,2 g alınarak 10 ml %3'lük sülfosalisilik asit ile homojenizasyonun ardından filtre edildi. Süzüntü 22 °C'de 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısımlarından 1 ml alınarak üzerine 1 ml asetik asit ve 1 ml ninhidrin ilave edildi. Ninhidrin, asetik asit ve orto-fosforik asit kullanılarak hazırlandı. Daha sonra tüplere konulan örnekler 1 saat 100 °C'de su banyosunda tutuldu ve reaksiyon buz üzerinde sonlandırıldı. Soğuyan örneklerin üzerine 3 ml toluen eklenerek, vorteksle karıştırıldı. Ağzı kapaklı tüplere alınan örnekler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası pipetle üst faz sarsılmadan küvete alındı ve 520 nm'de spektrofotometrede okundu (Bates vd., 1973). Prolin hesaplaması Şekil 10'a göre yapıldı. Sonuçlar gram kuru ağırlık (KA) başına µg olarak ifade edildi.



Şekil 10. Prolin hesaplamasında kullanılan standart eğrisi ve formülü.

2.5. İçsel H₂O₂ Tayini

H₂O₂ içeriği Velikova vd. (2000), metoduna göre belirlendi. Yaprak numunelerinden 0,25 g alınarak, 5 ml %0,1 TCA içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 1000 µl alınarak üzerine 1000 µl 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1500 µl 1 M KI ilave edildikten sonra oluşan sarı renk 390 nm'de spektrofotometrede oluşturulan standart grafikten okundu.

2.6. Fotosentetik Pigmentlerin Tayini

Fotosentetik pigmentlerin (karotenoid ve klorofil) tayini Arnon (1949)'a göre yapıldı. Taze yaprak örnekleri (0,1 g) 5 ml %80 aseton içerisinde homojenize edildi. Homojenat 5000 g'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı 663, 645 ve 450 nm'lerde spektrofotometrede (Nicolet evolution 100, Thermo Scientific, USA) ölçüldü. Pigment içeriklerinin belirlenmesi için Lichtenthaler (1987), tarafından geliştirilen denklemler kullanıldı.

2.7. Klorofil Floresans Analizleri

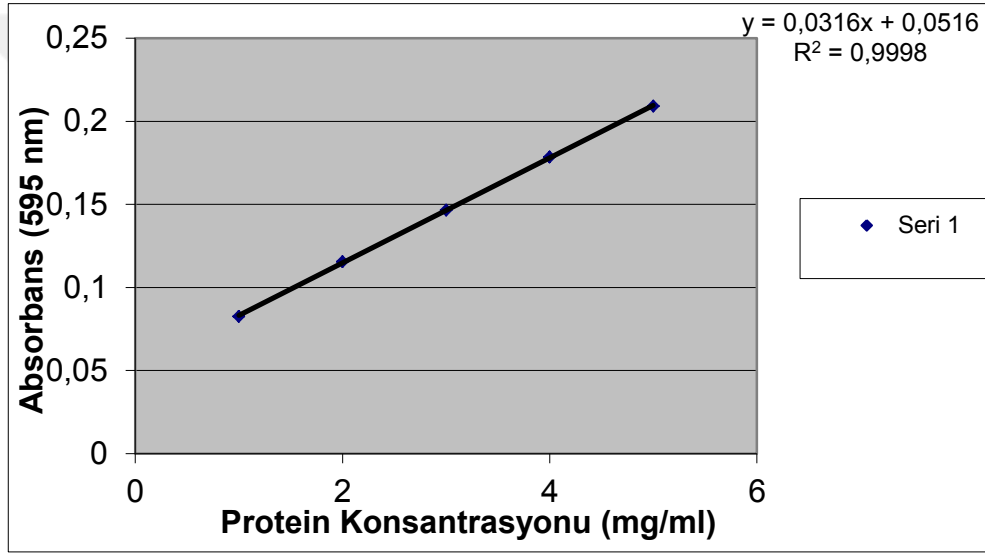
Klorofil floresans ölçümleri OS1-FL, florometre ile Nar vd., (2009)'a göre gerçekleştirildi (OptiScience Corporation, Tyngsboro, MA, USA). Ölçümler, karanlık adaptasyon klipsi ile 30 dakika karanlığa maruz bırakılan bitki örneklerinden gerçekleştirildi. Minimum klorofil floresansı (F_0) modüle edilmiş, zayıf ışık ($\lambda 660$, $<0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında ölçüldü. Maksimum klorofil floresansı (F_m), PS2'yi doyuran $\lambda 690$ beyaz ışığın ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 0,8 s uygulanması ile belirlendi. Karanlık ölçümlerinin ardından, yapraklara güneş ışığı ile beraber aktinik ışık ($5,5 \text{ W}$ 'a halogen lamp, ML S990, Micron, Tokyo, Japan) uygulanarak kararlı hal klorofil floresansı (F_s) elde edildi. Aktinik ışığın yoğunluğu $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di. Aydınlıktaki maksimum klorofil floresansını (F_m') belirlemek için doyurucu beyaz ışık ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 0,8 s süreyle uygulandı. Klorofil floresans parametrelerinin tanımları Van Kooten ve Snel (1990) tarafından belirtildiği gibi kullanıldı. F_v/F_m ve Φ_{PS2} , sırasıyla PS2'nin maksimum ve etkili kuantum verimliliği olarak kabul edildi. NPQ $(F_m - F_m')/F_m'$ denklemi ile Bilger ve Bjorkman (1990)'a göre hesaplandı. F_v/F_m ve Φ_{PS2} ise florometre cihazı tarafından, $(F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ve $\Phi_{PS2} = (F_m' - F_s)/F_m'$) denklemleri kullanılarak Genty vd., (1989)'a göre hesaplandı.

2.8. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Antioksidan enzim aktivitelerinin hesaplanması amacıyla; protein tayini Bradford (1976)'a göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri için hazırlanan ekstraktlardan numune başına $30 \mu\text{l}$ örnek, $170 \mu\text{l}$ distile su ve $1000 \mu\text{l}$ protein boyası kullanıldı. Bovin serum albumin (BSA) standartları hazırlanarak (Şekil 11), Coomassie Brilliant Blue G250 boyar maddesi ile proteinlerin oluşturduğu kompleks 595 nm ölçüldü (Tablo 4). Protein konsantrasyonu mg cinsinden hesaplanarak, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 11).

Tablo 4. Bradford Standartlarının Hazırlanması.

Standartlar	1 mg/mL stok BSA (μ L)	dH ₂ O (μ L)	1X Bradford Ayıracağı (mL)
Kör	0	500	5
0,01 mg/mL	5	495	5
0,02 mg/mL	10	490	5
0,03 mg/mL	15	485	5
0,04 mg/mL	20	480	5
0,05 mg/mL	25	475	5



Şekil 11. BSA standartlarından elde edilen grafik.

2.9. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Tayinleri

Çalışmanın bu aşamasında bazı antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz) aktiviteleri belirlendi.

2.9.1. Katalaz Aktivitesi

Katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesi, Aebi (1983) yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H₂O₂ ve 20 μ l enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmesiyle

belirlendi. Katalaz aktivitesi, H_2O_2 için $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar EU. mg^{-1} protein olarak sunuldu.

2.9.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre belirlendi. 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 μM nitro blue tetrazolyum ve 50 μl ekstrakt ihtiva eden 1 ml reaksiyon ortamına 2 μM riboflavin ilave edilerek reaksiyon başlatıldı, bu karışım 10 dakika boyunca 375 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ şiddetinde beyaz ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Sonuçlar U. mg^{-1} protein olarak sunuldu.

2.9.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. Aktivite tayini için, 200 μl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 μl GSSG ve 500 μl NADPH ihtiva eden karışıma 50 μl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. Sonuçlar U. mg^{-1} protein olarak sunuldu.

2.9.4. Peroksidaz Aktivitesi

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesi, Urbanek vd., (1991) yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H_2O_2 ve 50 μl enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karışımının 470 nm'de 1 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi $\epsilon=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar U. mg^{-1} protein olarak sunuldu.

2.10. Moleküler Çalışmalar

Çalışmanın bu aşamasında toplam RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve genlerin ekspresyon seviyesinde analizleri yapıldı. RT PCR analizleri ise, kullanılan sistemin lisanslı yazılımı olan ve cihazla birlikte tümleşik olarak çalışan Bio-Rad CFX Manager 3.1 ile gerçekleştirildi.

2.10.1. Real Time PCR Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması

Ekspresyon seviyesi belirlenecek genler için gerekli primerler, NCBI veritabanındaki gen sekansları kalıp olarak kullanılarak, Primer 3 plus programı ile tasarlandı (Primer3 Plus, URL-2). Tasarlanan primerler, NCBI veritabanını kullanan “primer3 plus” programı kullanılarak blast yapıldı ve primerlerin, eşleşme oranlarına bakılarak, istenen gen bölgelerine doğru bir şekilde bağlanabildiği belirlendi. Gen ifadelerinin referansı için AKTİN 1 genine ait primerler tasarlandı. Çalışmada ekspresyonu hedeflenen genler ve bu genlere ait primerler Tablo 5’te gösterildi.

Tablo 5. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler

Gen Adı	NCBI Erişim No	Primer Adı ve Sekansı
<i>Aktin</i>	KC775782.1	ACTINTaF: “GCGAATTTTGCCCCAATGGT” ACTINTaR: “GAAGCACTTCCTGTGGACGA”
<i>P5CRTa</i>	AY880317.1	P5CRTaF: “GGTAAACATCCAGGGCAGCT” P5CRTaR: “GCATCTTGTTGTGGCAGCAA”
<i>P5CSTa</i>	AY888045.1	P5CSTaF: “TGAAATGGCTGTTGCTGCAC” P5CSTaR: “TGCCTCTAAAGCATCCGCAA”

2.10.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Toplam RNA izolasyonu için -80 °C’de muhafaza edilen numunelerden 0,1 g kullanıldı. Sıvı azot ile dondurulan örnekler, doku homojenizatörü ile parçalandıktan sonra Toplam RNA izolasyon kiti (RNeasy Plant Mini Kit 74904, Qiagen Hollanda) kullanılarak ve üreticinin yöntemlerine uyularak Toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000, Amerika) ile ölçüldü. Miktarı ve saflığı belirlenen toplam RNA örnekleri cDNA eldesi için -80 °C’de saklandı.

İzole edilen Toplam RNA örneklerinden grup başına 2000 ng olacak şekilde cDNA eldesi yapıldı. cDNA sentezi için Applied marka (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814, Applied Biosystems Amerika) cDNA sentez kiti kullanıldı. Sentezlenen cDNA’lar Real Time PCR analizleri gerçekleştirilene kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

2.10.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi

Bir önceki aşamada örneklerden elde edilen cDNA’lar, gen ifadelerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizlerinde kullanıldı. Analizler için 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermiks (08-36-00008, Solis Biodyne, Estonya) ve CFX Connect Real Time PCR System (BioRad, Amerika) cihazı kullanıldı. RT PCR protokolü ise Solis Biodyne yöntemleri modifiye edilerek; 95 °C’de 12 dakika, 95 °C’de 15 saniye 45 döngü, 60.0 °C’de 30 saniye, 72.0 °C’de 30 saniye, melt curve için 65.0 °C’den 95 °C’ye 0,5 °C’lik

artışlarla olacak şekilde gerçekleştirildi (Tablo 6). Her biyolojik tekrar, 3 teknik tekrar şeklinde analiz yapıldı. Ortalama teknik hata $0,5(\pm 1)$ Cq values şeklinde belirlendi. Ayrıca referans geni için *AKT1N 1* genine ait primerler kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 6. RT PCR protokolü

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95,0 °C	12 dk	1
Denaturasyon	95,0 °C	15 sn	44
Bağlanma	60,0 °C	30 sn	
Uzama	72,0	30 sn	
Plate Okuma	-	-	
Melt Curve Analizi	65,0 °C -95,0 °C arası 0,5 °C'lik artışlar 5 sn aralıklarla plate okuma		-

RT PCR reaksiyon ortamı miks üreticisinin yöntemlerine göre hazırlandı. Reaksiyon ortamında kullanılan bileşikler ve oranları Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. RT PCR reaksiyon ortamı

Reaksiyon Bileşeni	Miktarı (µl)
Süper Miks	4
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	1
Nükleaz içermeyen su	13
Toplam	20

2.11. Bor İçeriği

Bor içeriklerinin belirlenmesi amacıyla kuru bitki örnekleri İstanbul Üniversitesi, Çevre ve Enstrümental Analiz Laboratuvarına yollandı. Örneklerin B içerikleri, Elveren vd. (2015)' e göre belirlendi. Bunun için yaprak örnekleri etüvde 80 °C'de 72 saat kurutuldu. Kurutulan örnekler havanda dövülerek toz hâline getirildi. Toz hâline getirilmiş örnekler ayrı poşetlere konup isimlendirilerek saklandı. Bitki örneklerinden 0,5 gr tartılıp teflon hücrelere konularak, mikrodalga fırında örnekler içine 10 mL %65'lik HNO₃ ilave edildikten sonra bir mikrodalga fırında 280 PSI basınçta ve 180 °C'de 20 dakika yakıldı.

Hücreler mikrodalgadan çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Hücreler içerisindeki örnekler, deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzildükten sonra PERKIN-ELMER marka ICP-OES OPTIMA 7000 DV cihazında uygun dalga boylarında okundu.

2.12. İstatistik Analizler

Üç tekrarlı olarak yapılan ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlendi.



3. BULGULAR

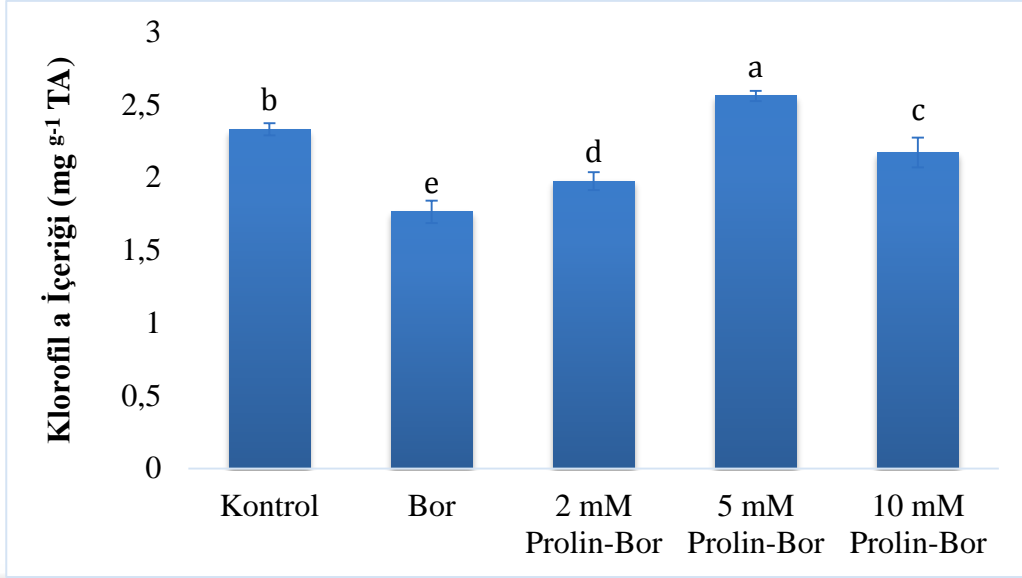
3.1. Uygulama Yapılan Bor ve Prolin İçin Konsantrasyon Belirleme

3.1.1. Bor Konsantrasyonunun Belirlenmesi

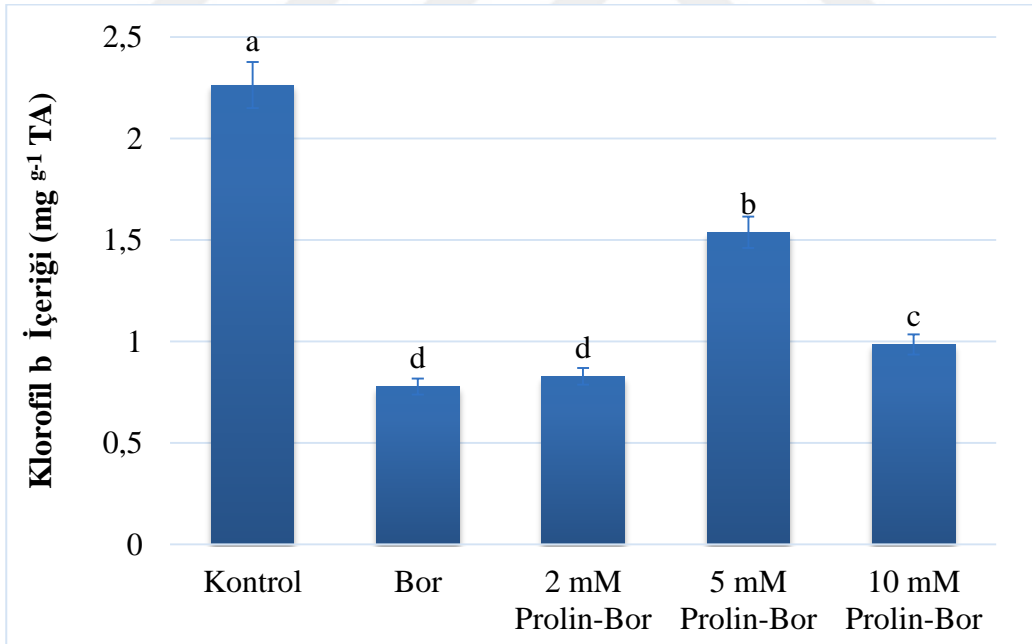
Literatüre paralel olarak yapılan çalışmalarda bor stresi uygulanan bitkilerin fidelerinin kök ve yaprakları morfolojik olarak gözlemlendi. Çalışmamızda 2 mM, 5 mM ve 10 mM bor uygulamalarından sonra, 2 mM bor ile kontrol grubu arasında belirgin bir fark gözlenmezken, 5 mM bor uygulamasının bitki büyümesini azalttığı, 10 mM'ın ise yaprak senesensini uyardığı görüldü. Yapılan gözlemler sonucunda 5 mM borun bitkilerde stres uygulamaları için en uygun konsantrasyon olduğuna karar verildi.

3.1.2. Prolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

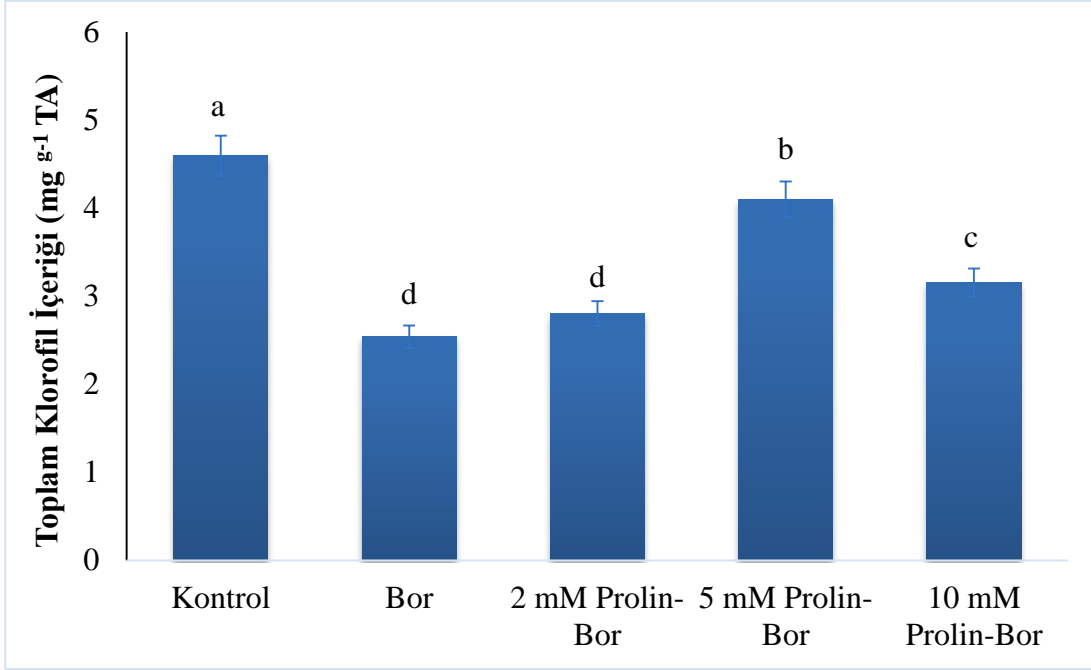
Bitkilerde strese neden olan bor konsantrasyonu ile birlikte uygulanacak prolin konsantrasyonu belirlemek için yapılan denemeler sonucunda genel olarak en yüksek pigment içeriklerinin ve en düşük TBARS seviyesinin kontrol grubunda olduğu tespit edildi. Bununla birlikte en düşük pigment seviyeleri ve en yüksek TBARS içeriğinin sadece bor uygulanan grupta olduğu görüldü (şekil 12-16). Bor uygulaması ile birlikte yapılan 2 mM, 5 mM ve 10 mM prolin uygulamalarında pigment içeriğinde iyileşmenin ve TBARS içeriğinde bir düşüşün olduğu belirlendi. Ancak yaprak pigment analizleri ve TBARS seviyesine bakıldığında iyileşmenin en iyi olduğu konsantrasyon 5mM bor stresi ile birlikte 5 mM prolin uygulaması yapılan grupta olduğu gözlendi (şekil 12-16). Bu sonuçlar ışında çalışmalara sıvı besin ortamı olan Hoagland besin ortamında; kontrol, 5 mM prolin, 5 mM bor ve 5 mM prolin-5 mM bor şeklinde gruplar oluşturularak devam edildi.



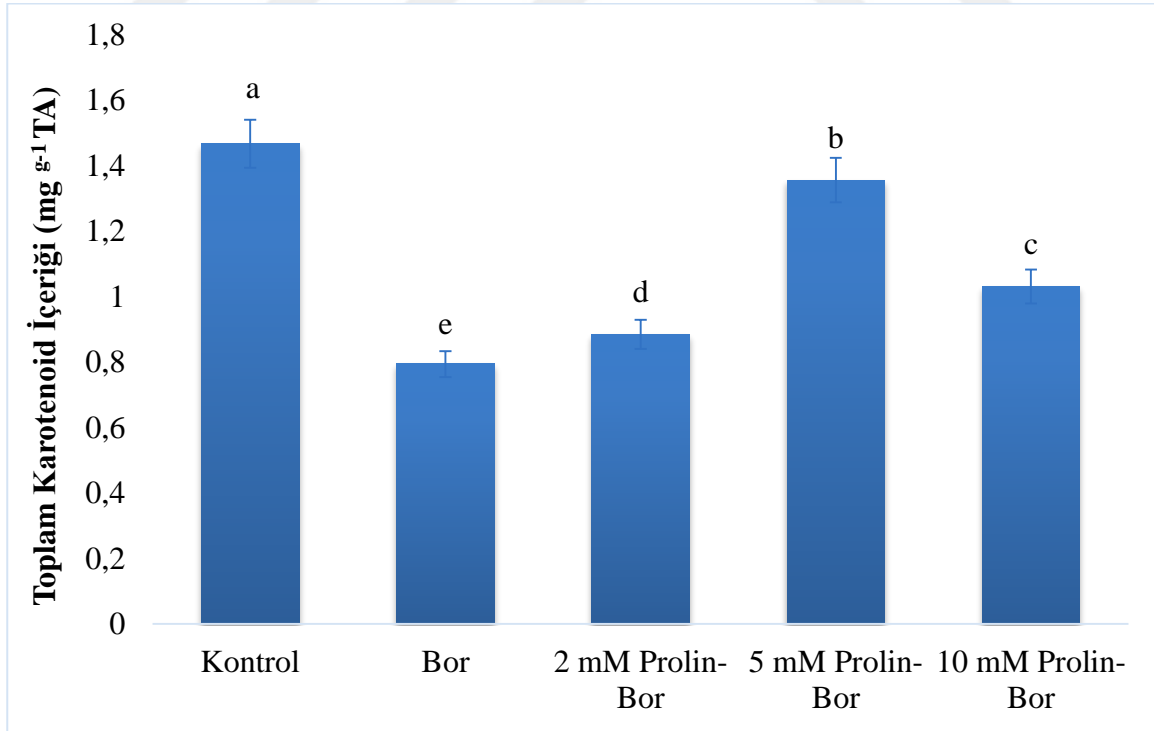
Şekil 12. Belirlenen konsantrasyonlara ait klorofil a içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P < 0.05$) seviyesinde önemsizdir.



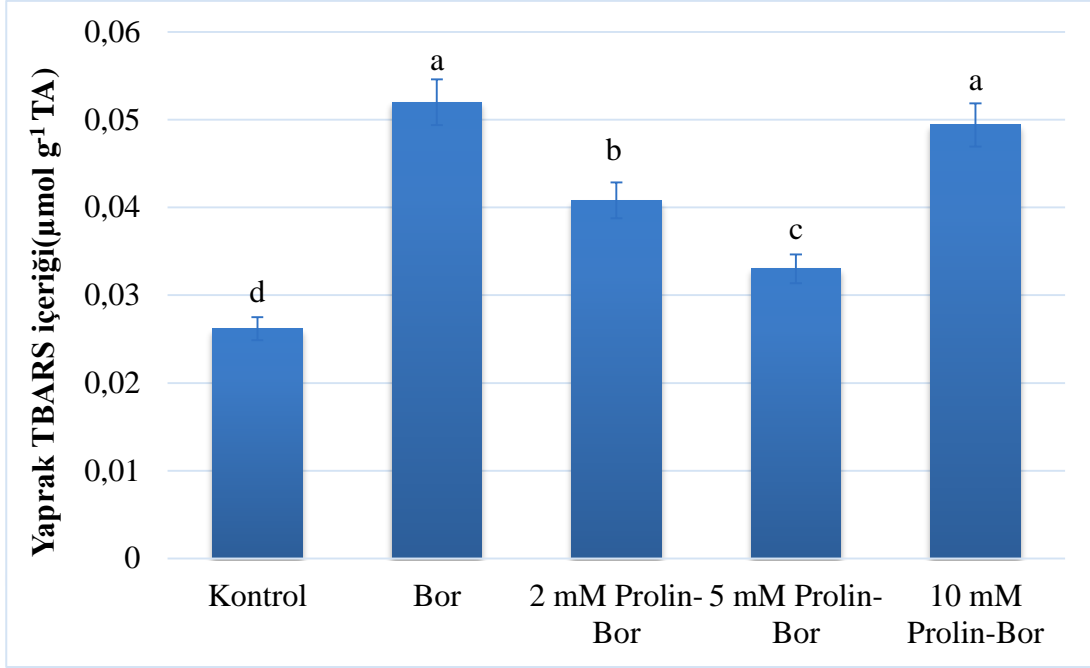
Şekil 13. Belirlenen konsantrasyonlara ait klorofil b içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P < 0.05$) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 14. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam klorofil içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.



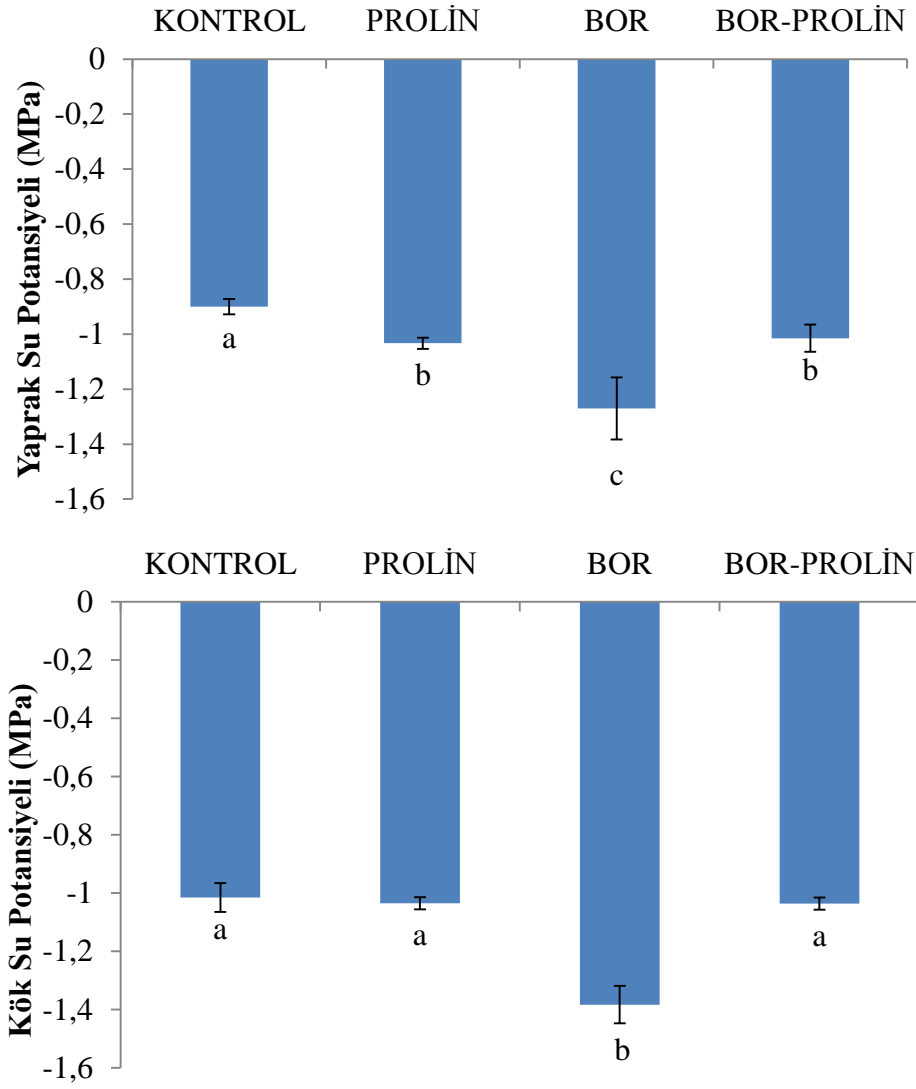
Şekil 15. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam karotenoid içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 16. Belirlenen konsantrasyonlara ait toplam TBARS içeriği. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P < 0.05$) seviyesinde önemsizdir.

3.2. Su Potansiyeli

Deney gruplarında yapılan yaprak su potansiyeli ölçümleri göz önüne alındığında, bor stresi koşulları altında su potansiyelinin diğer gruplara göre anlamlı şekilde düştüğü gözlemlendi. Prolin ön uygulamasının ise bor stresi koşullarında sadece bor uygulanan gruba kıyasla, bitki su durumunu iyileştirdiği belirlendi. Kök su potansiyeline bakıldığında ise yaprak su potansiyeline benzer şekilde, prolin ön uygulamasının bor stresine karşı bitki su durumunu iyileştirdiği bulundu. Bor stresinde ise strese bağlı olarak su potansiyelinin azaldığı belirlendi (Şekil 17).

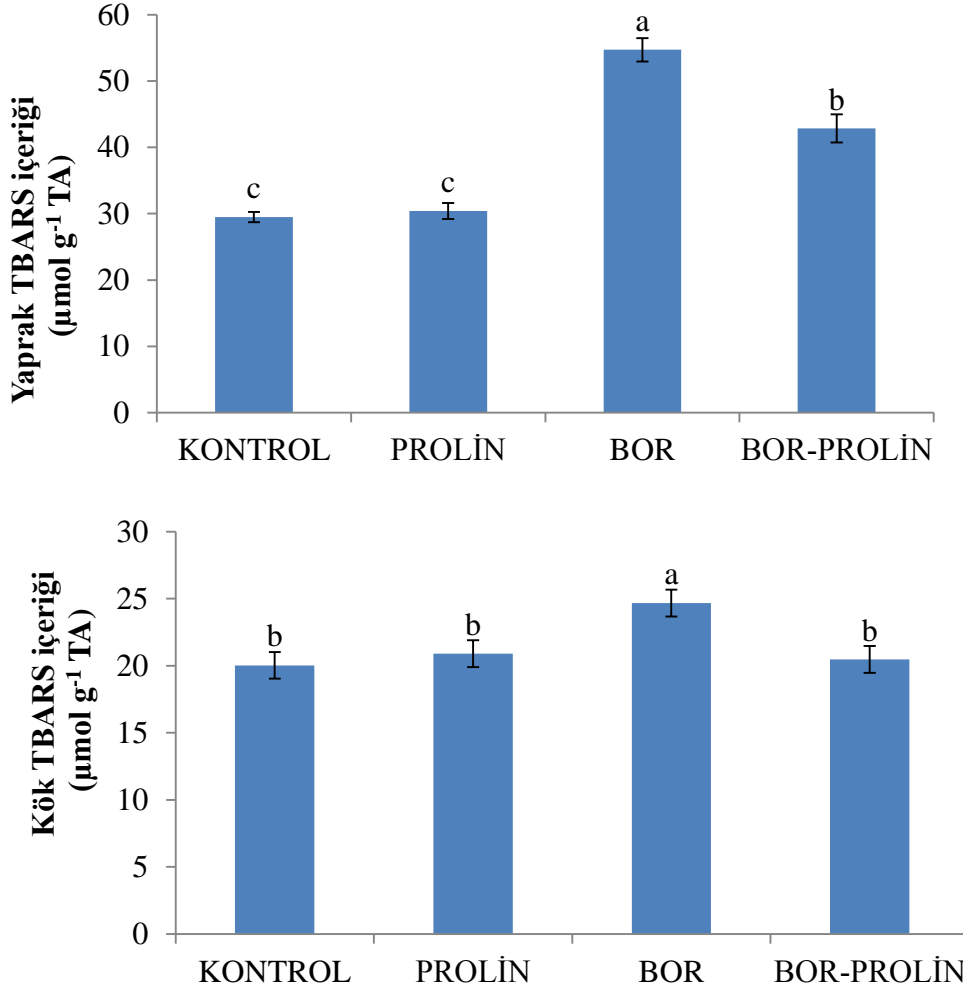


Şekil 17. Yaprak ve kök su potansiyellerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.

3.3. Lipid Peroksidasyonu

Hücrede lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan TBARS içeriğine bakıldığında, prolin ön uygulaması sonucunda bor grubuna kıyasla yaprak TBARS seviyesinin azaldığı tespit edildi. Bununla beraber, kontrol grubu ve sadece prolin uygulaması yapılan grup arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi. Kök MDA içeriği analiz edildiğinde ise sadece bor uygulanan grubun diğer uygulama gruplarına göre daha yüksek TBARS

içerdiği tespit edildi. Buna karşın prolin ön uygulaması ile kontrol ve bor-prolin uygulamaları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 18).

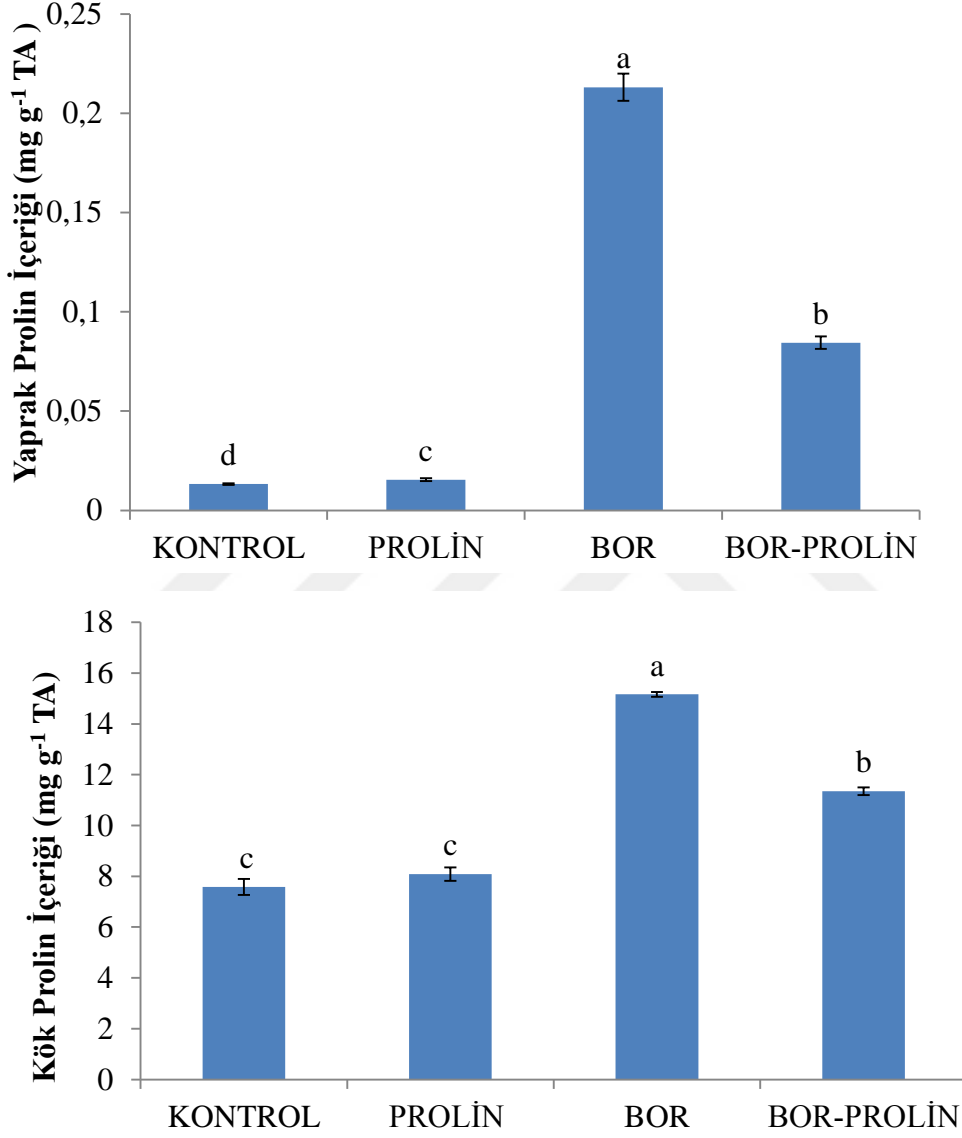


Şekil 18. Yaprak ve kök TBARS içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.4. Prolin İçeriği

Çalışmanın bu aşamasında yapraklardan prolin içeriği ölçüldü. En yüksek yaprak prolin içeriği sadece bor uygulanan grupta belirlendi. Ayrıca bor stresi uygulanmayan kontrol ve prolin gruplarında, diğer gruplara göre daha düşük prolin seviyelerine

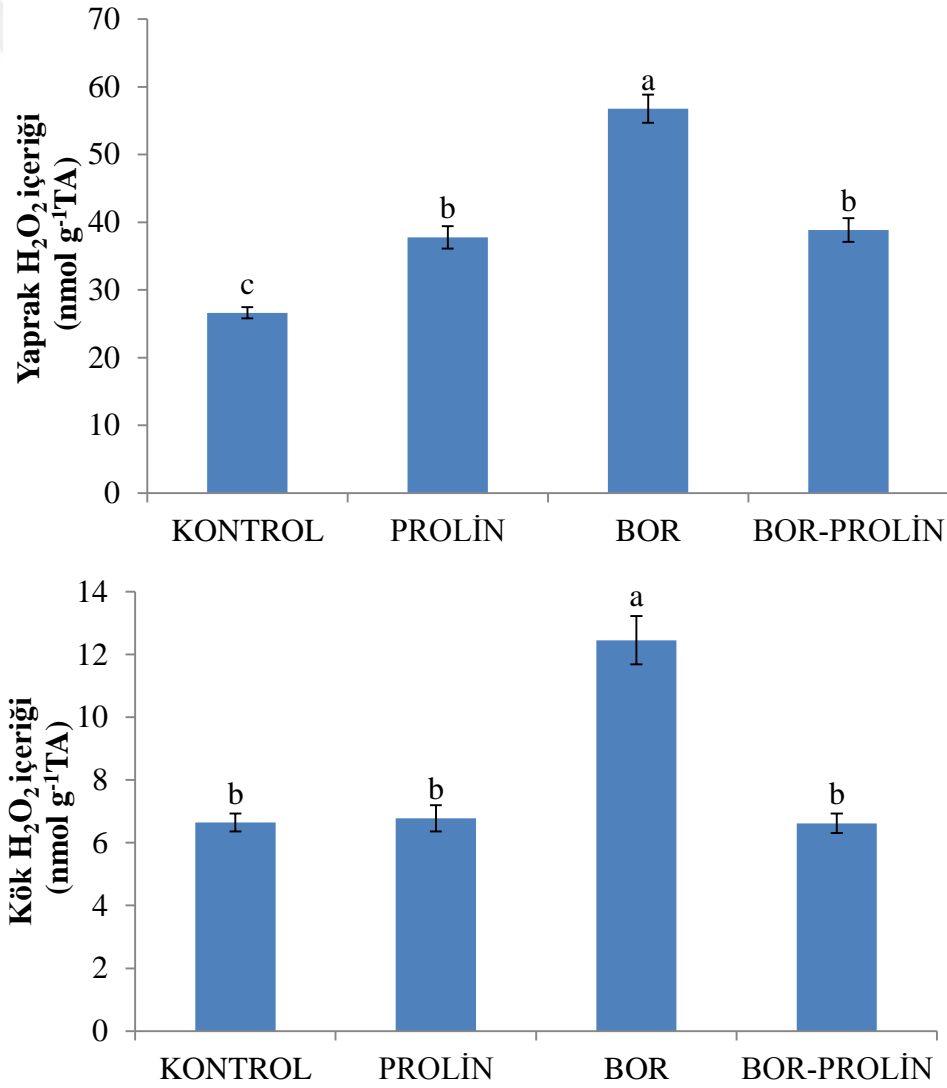
rastlanmıştır. Kök prolin içerikleri incelendiğinde en yüksek içeriğin yine bor grubunda olduğu saptandı. Bor-prolin grubunda ölçülen prolin miktarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. Yaprak ve kök prolin içeriğinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.5. H₂O₂ İçeriği

Yaprak H₂O₂ seviyesi, mevcut çalışmada en fazla olarak bor stresine maruz kalmış grupta en fazla olarak tespit edildi. Bununla birlikte prolin ön uygulaması içsel H₂O₂ seviyesini sadece bor uygulanan gruba göre istatistiksel olarak azaldı. Kök H₂O₂ seviyesi ise, yaprak analizlerine benzer şekilde bor uygulanan grupta diğer gruplara göre daha yüksekti. Yine benzer şekilde prolin ön uygulamasının gerçekleştirildiği gruptaki H₂O₂ seviyesi, bor uygulanan grup hariç diğer uygulama grupları ile benzer şekildeydi (Şekil 20).



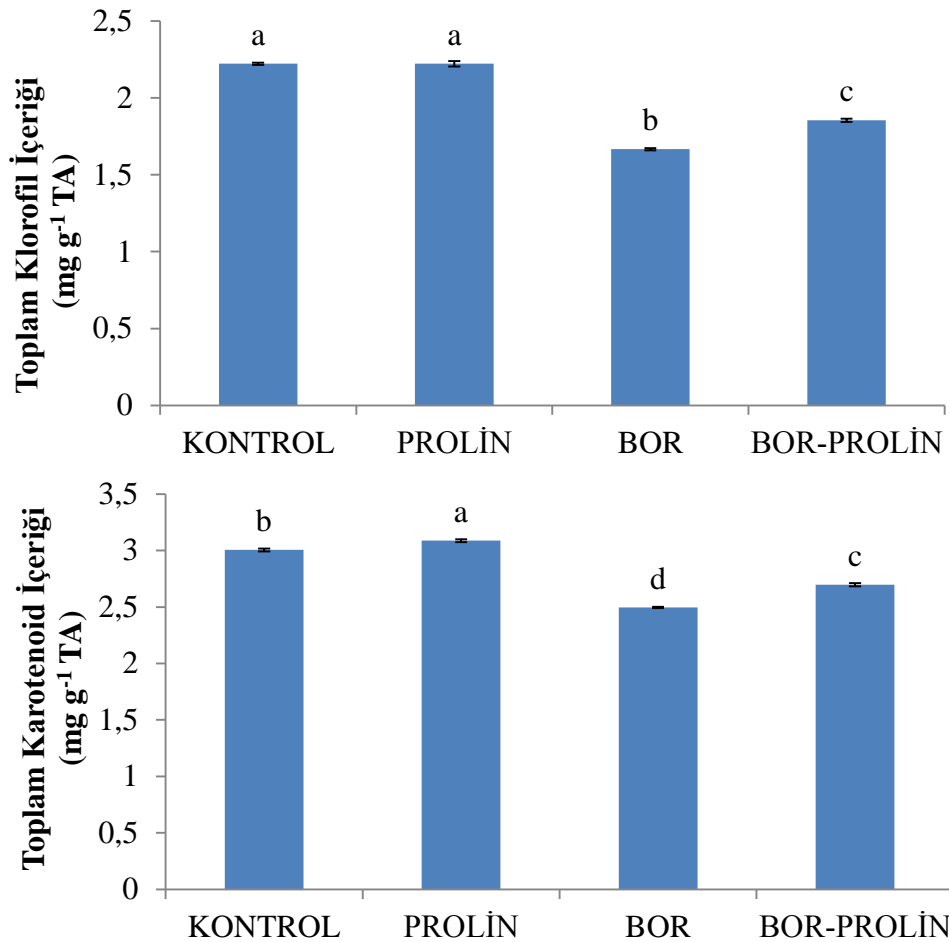
Şekil 20. Yaprak ve kök içsel H₂O₂ içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle

gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.
TA: Taze ağırlık.



3.6. Toplam Klorofil ve Karotenoid İçerikleri

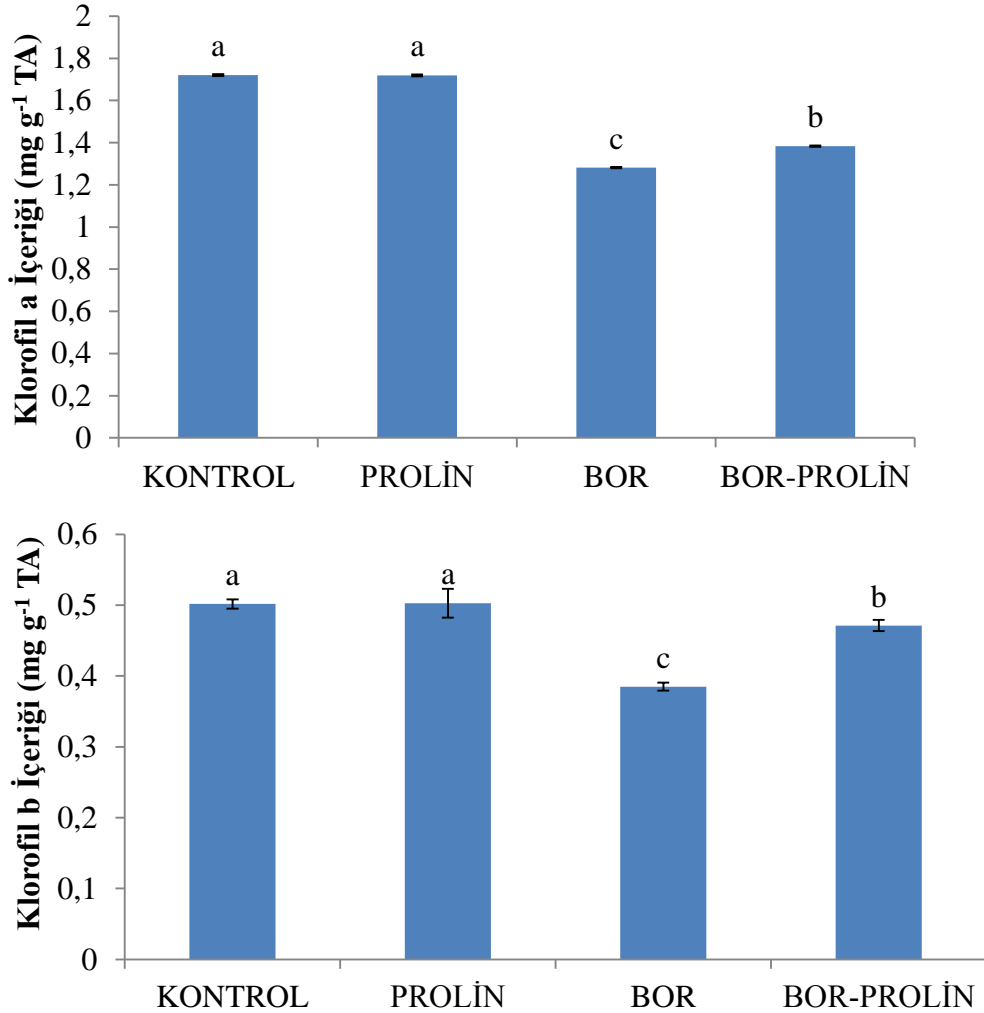
Yapılan analizler sonucu toplam klorofil içeriğinin bor stresi koşullarında kontrol, grubuna göre önemli derecede düştüğü belirlendi. Diğer taraftan bor ile birlikte prolin uygulaması yapılan grupta klorofil içeriğinin bor stresli gruba göre arttığı görüldü. En yüksek klorofil içeriğinin ise kontrol ve prolin gruplarında olduğu ve bu grupların aralarında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi. Karotenoid içeriğinde en yüksek içeriğin prolin grubunda olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise içeriğin proline göre daha az değerinde olduğu görülürken, bor ve bor-prolin gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlendi. Bor-prolin grubunda karotenoid içeriğinin bor grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi. En düşük pigment içeriğinin bor grubunda olduğu gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Toplam klorofil ve toplam karotenoid içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.7. Klorofil a ve Klorofil b İçerikleri

Klorofil a içeriği incelendiğinde, bor stresine maruz kalan grupları klorofil a içeriğinin diğer gruplardan daha olduğu gözlemlendi. Bor-prolin grubunda ise bor grubuna göre daha az bir yıkım gözlemlendi. Bununla birlikte çalışmanın kontrol ve prolin grupları arasında, söz konusu klorofil a içeriği yönünden anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Deney gruplarında klorofil b miktarı ölçüldüğünde, en fazla indirgeme yine bor grubunda olduğu gözlemlendi. Bor-prolin grubunda sadece bor uygulanan gruba göre anlamlı bir yükseliş gözlemlendi. Mevcut çalışmada kontrol ve sadece prolin uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 22).

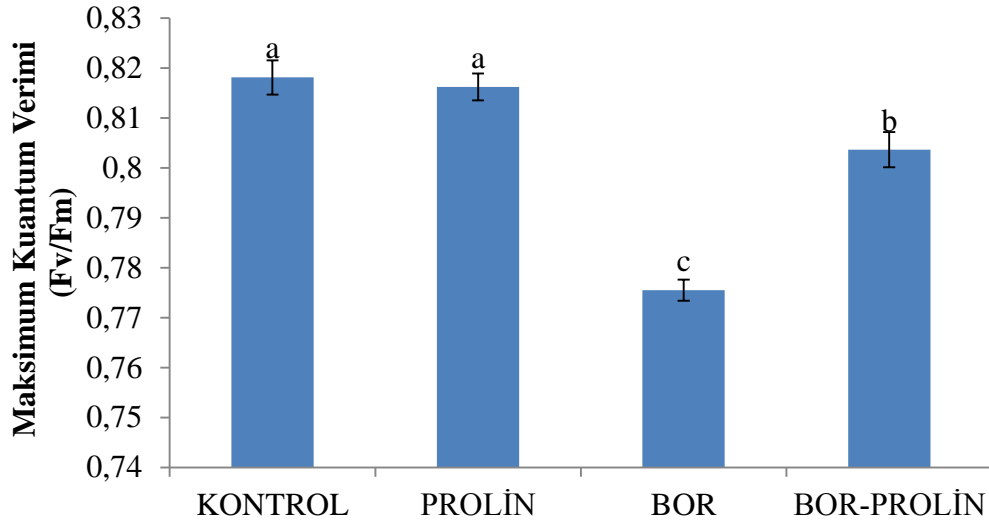


Şekil 22. Klorofil a ve Klorofil b içeriklerindeki değişimler. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.8. Klorofil Floresansı Parametreleri

3.8.1. PS2 Maksimum Kuantum Verimi (F_v/F_m)

Mevcut çalışmada, PS2 maksimum kuantum verimi göz önüne alındığında, bor stresinin F_v/F_m oranını diğer gruplara göre önemli derecede düşürdüğü tespit edildi. Buna karşın prolin ön uygulamasının bor stresi etkilerini yatıştırdığı ve F_v/F_m oranını yükselttiği kaydedildi. Aynı zamanda kontrol ve prolin grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi (Şekil 23).

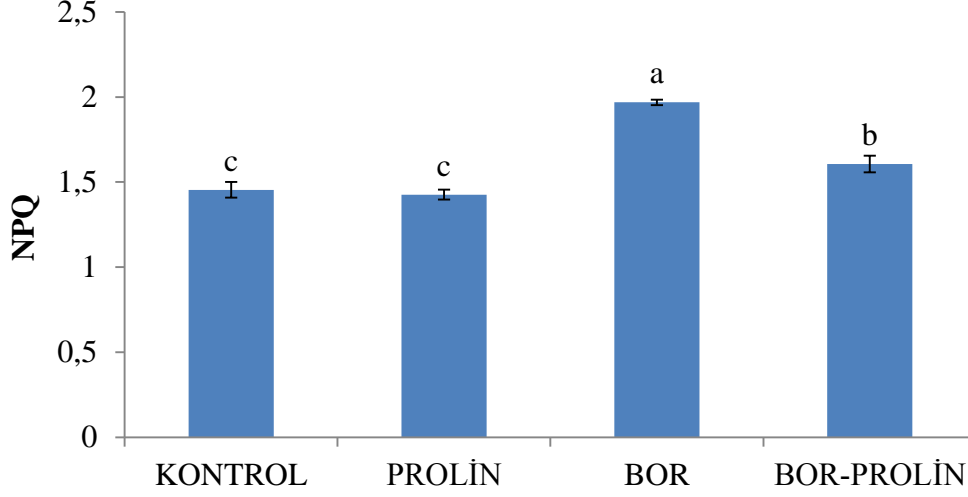


Şekil 23. PS2 maksimum kuantum verimi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.8.2. Fotokimyasal Olmayan Floresans Kullanımı (NPQ)

Mevcut çalışmada fotokimyasal olmayan floresans kullanımı (NPQ) değerlerine bakıldığında, bor stresinin diğer gruplara göre en yüksek değere sahip olduğu belirlendi. Bununla birlikte bor prolin uygulamasının NPQ değerini bor grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Aynı zamanda kontrol ve sadece prolin uygulanan gruplar arasında NPQ değerleri açısından anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 24). Şekil 12-33 arasındaki tüm

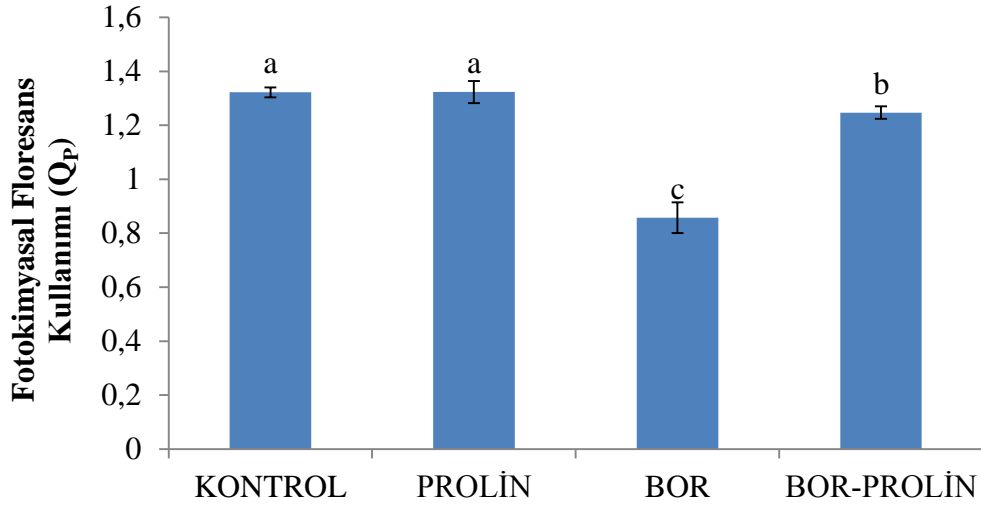
şekillerde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 24. Fotokimyasal olmayan floresans kullanımı değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir.

3.8.3. Fotokimyasal Floresans Kullanımı (Q_P)

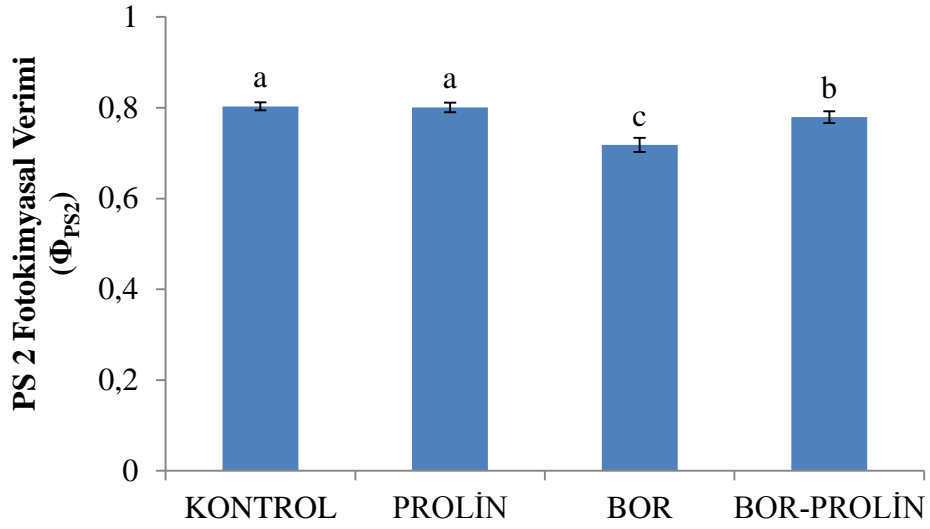
Floresansın fotokimyasal olarak kullanımı (Q_P) değerlerine bakıldığında, bor stresine maruz kalmış grupta en düşük Q_P oranına rastlanıldı. Bununla birlikte prolin ön uygulaması yapılan ve bor stresine maruz kalan gruptaki Q_P değerinin bor grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, kontrol ve prolin grupları arasında Q_P değerleri yönünden anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 25).



Şekil 25. Fotokimyasal floresans kullanımı değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

3.8.4. PS 2 Fotokimyasal Verimi

Fotosistem 2 (PS 2)'nin fotokimyasal verimi (Φ_{PS2}) değerleri incelendiğinde, bor stresine maruz kalmış grupta en düşük Φ_{PS2} oranına rastlanıldı. Bununla birlikte prolin ön uygulaması yapılan ve bor stresine maruz kalan gruptaki Φ_{PS2} değerinin bor grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Ek olarak, kontrol ve prolin grupları arasında Φ_{PS2} değerleri yönünden anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 26).

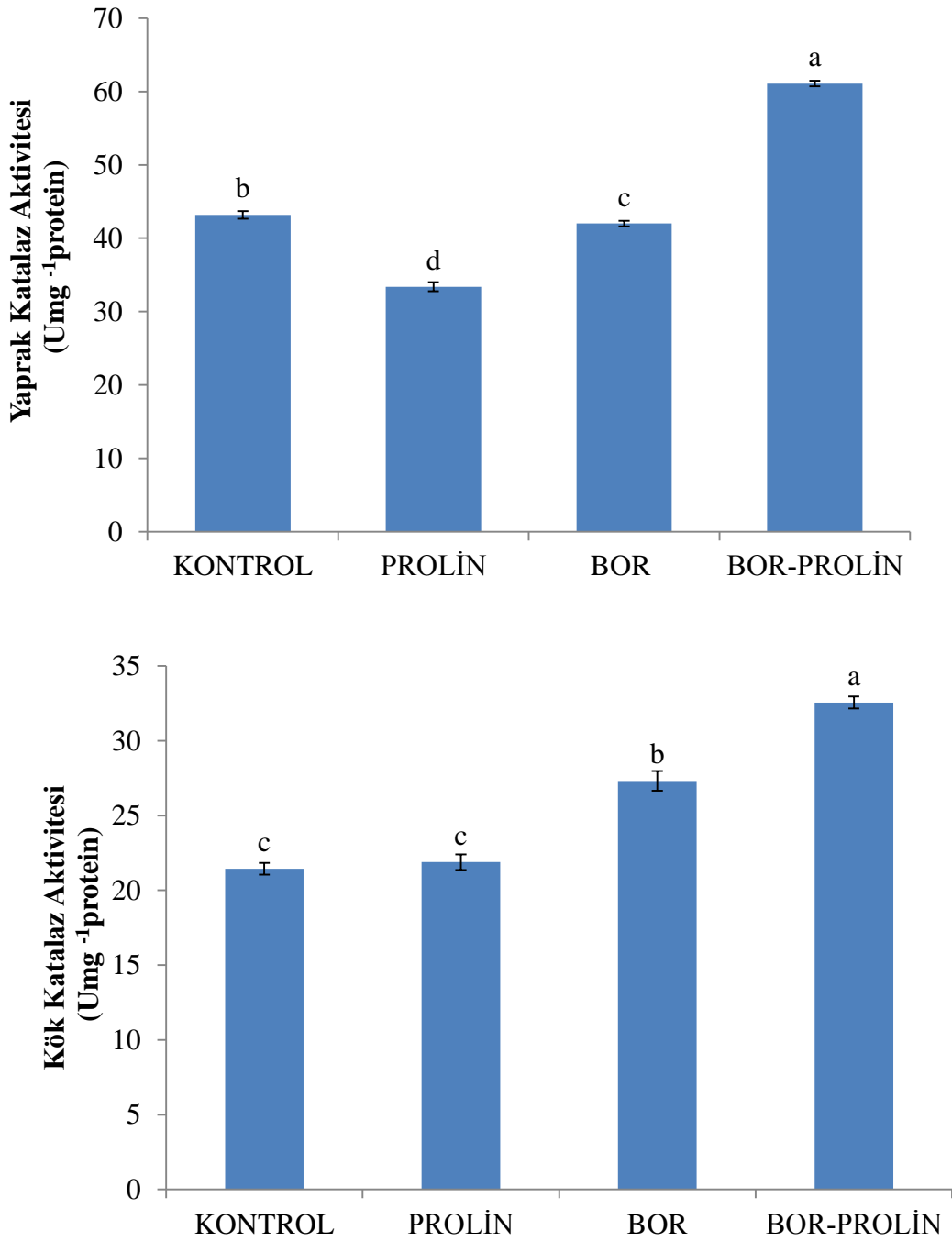


Şekil 26. Deney gruplarında fotokimyasal verim seviyesinin belirlenmesi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

3.9. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

3.9.1. Katalaz Enzim Aktivitesi

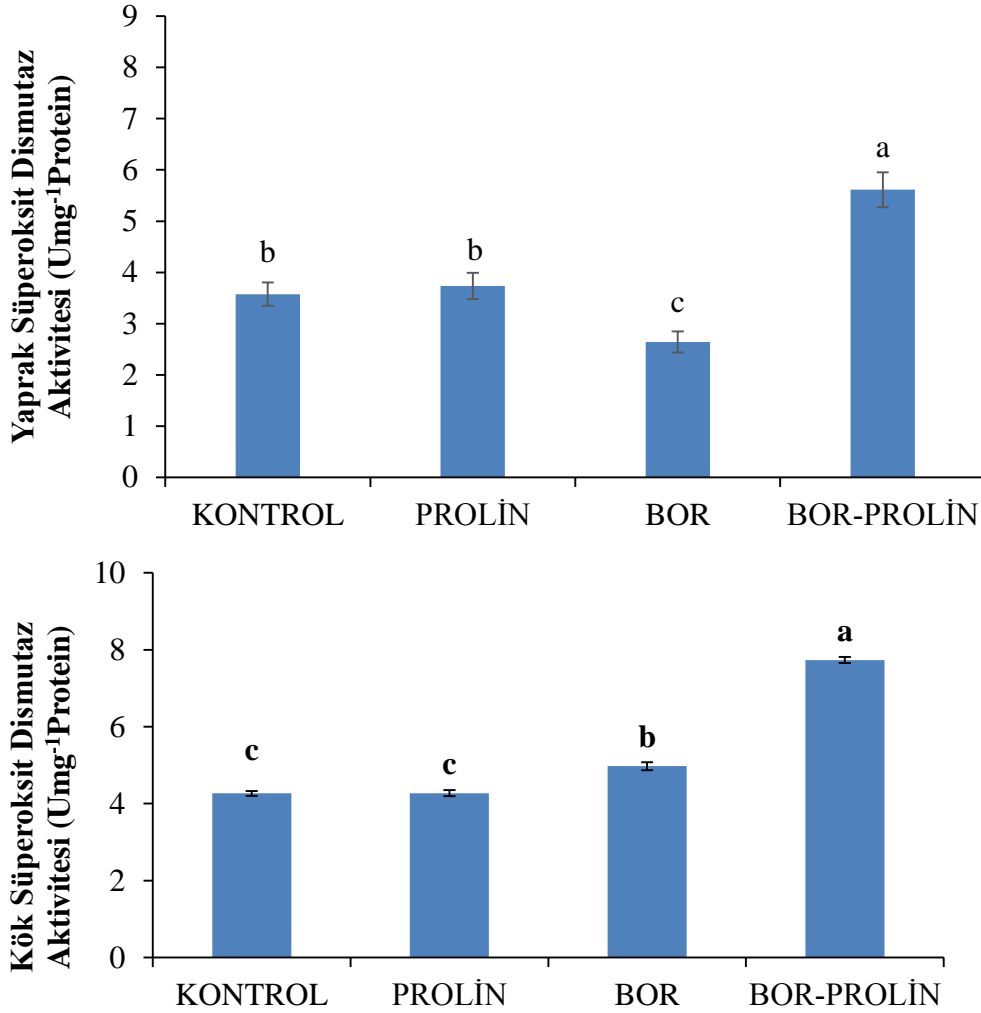
Yapraklardaki katalaz aktivitesi ölçüldüğünde, kontrole göre prolin ve bor uygulama gruplarında daha düşük enzim aktivitesi gözlenirken, en yüksek enzim aktivitesinin bor-prolin uygulama grubunda olduğu gözlemlendi. Sadece prolin uygulamasının yapıldığı grupta ise en düşük enzim aktivitesi belirlendi. Köklerdeki aktivite ele alındığında ise bor uygulamasının yapıldığında gruptaki enzim aktivitesinin prolin ve kontrol gruplarından yüksek, bor-prolin uygulamasından ise daha düşük olduğu görüldü. En yüksek enzim aktivitesi bor-prolin grubunda ölçüldü (Şekil 27).



Şekil 27. Yaprak ve kök katalaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

3.9.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

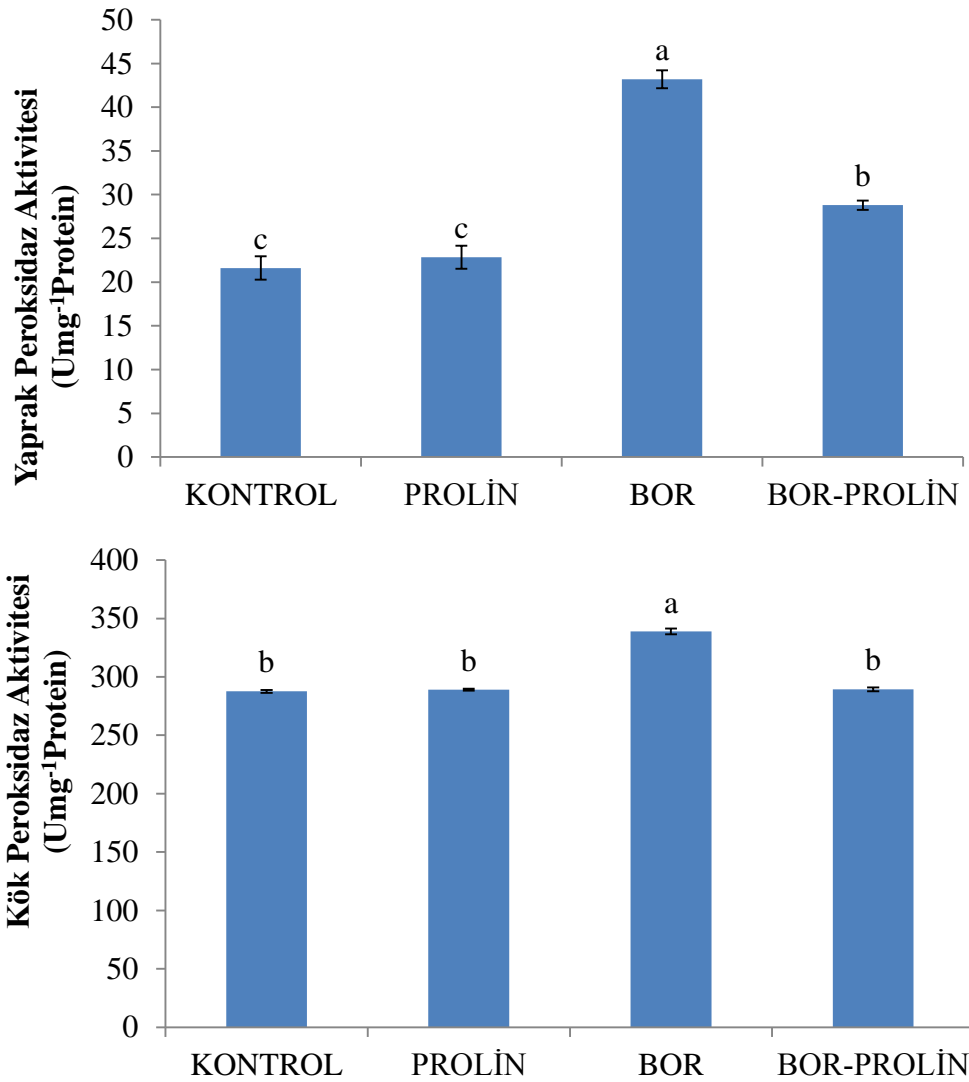
Deney gruplarında yaprak süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ölçüldüğünde, en yüksek aktivitenin bor-prolin grubunda olduğu gözlemlendi. En düşük SOD aktivitesinin bor grubunda olduğu görüldü. Prolin ve kontrol gruplarında SOD aktivitesi açısından önemli bir fark belirlenemedi. Kök süperoksit dismutaz aktivitesini incelediğimizde en yüksek SOD aktivitesinin bor-prolin uygulamasında olduğu belirlendi. Kontrol ve prolin grupları arasında ise önemli bir fark tespit edilemedi. Bor uygulamasında aktivitenin bor-prolin uygulamasına göre düşük, kontrol ve prolin uygulamalarına göre daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 28).



Şekil 28. Yaprak ve kök süperoksit dismutaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık.

3.9.3. Peroksidaz Aktivitesi

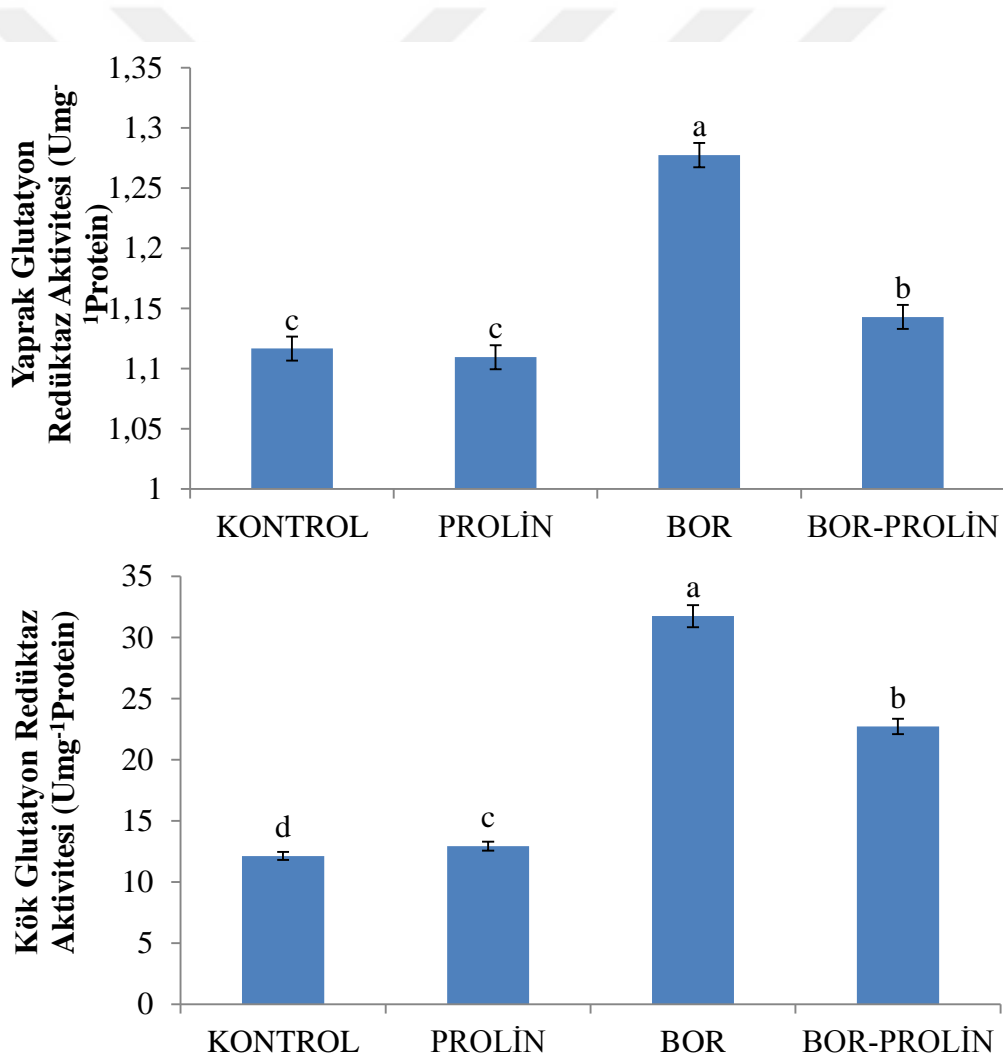
Yapraklarda gruplar arasındaki en yüksek peroksidaz aktivitesinin bor stresi uygulanmış grupta olduğu tespit edildi. Bununla birlikte prolin ön uygulaması yapılan grup ve kontrol grubu peroksidaz aktivitesi açısından karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli bir fark bulunmadı. Kök peroksidaz aktivitesi ele alındığında kontrol, prolin ve bor-prolin uygulamalarında aktivitenin düşük olduğu, bor uygulamasında ise enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 29).



Şekil 29. Yaprak ve kök peroksidaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. TA: Taze ağırlık

3.9.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi

Yaprak glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri Şekil 30' da verildi. Buna göre en yüksek GR aktivitesi sadece bor uygulaması yapılan grupta gözlemlendi. Kontrol ve sadece prolin uygulamaları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, prolin ön uygulaması yapılmış bor grubunda, kontrol ve sadece prolin grubuna göre daha yüksek bir aktivite saptandı. Kök glutasyon redüktaz enzimi aktivitesi ölçüldüğünde ise en yüksek aktivitenin yine bor grubunda olduğu bulundu. En düşük enzim aktivitesi ise kontrol grubunda gözlemlendi. Bor-prolin grubunun GR aktivitesinin ise kontrol ve prolinde yüksek, sadece bor grubundan düşük olduğu belirlendi (Şekil 30).

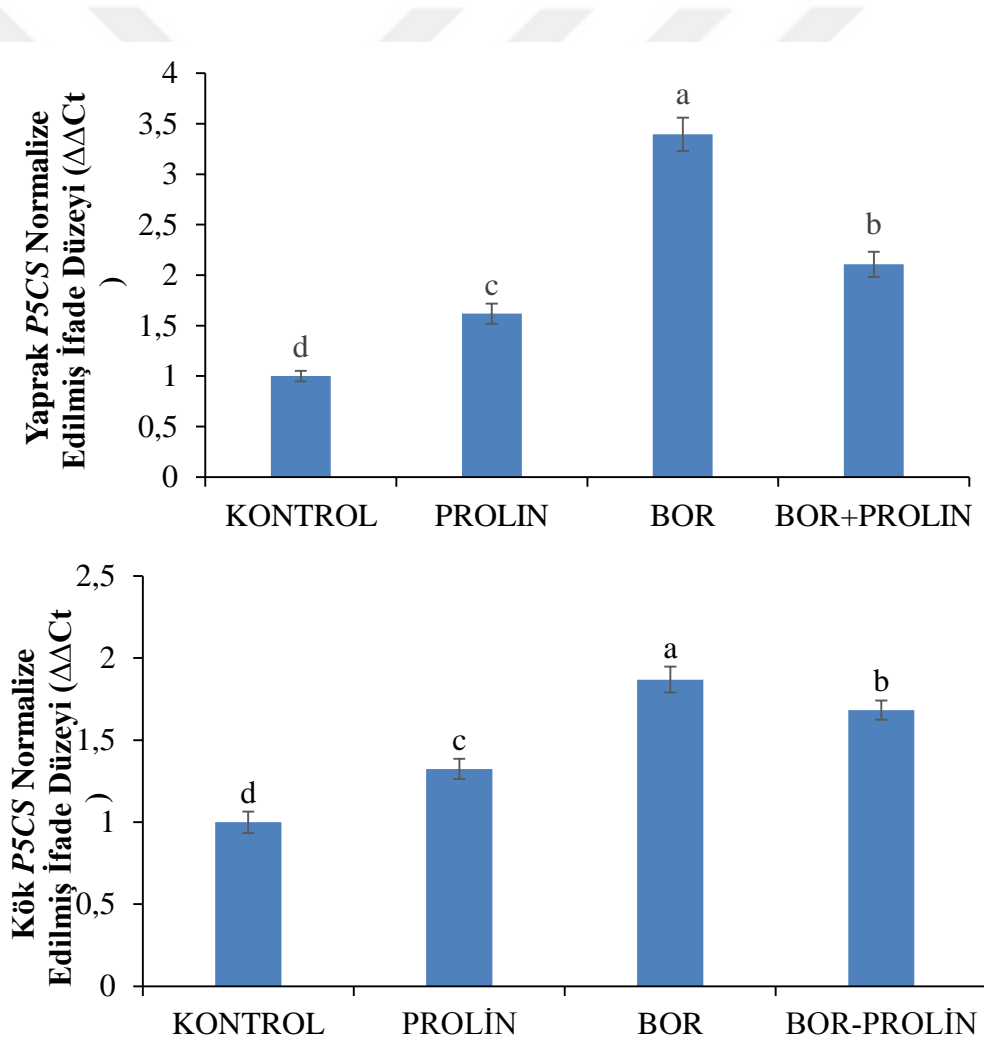


Şekil 30. Yaprak ve kök glutasyon redüktaz aktivitelerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

3.10. Prolin Metabolizmasında Görevli Bazı Genlerin İfade Düzeyleri

3.10.1. Prolin 5- Karboksilat Sentaz (P5CS) Geni İfade Seviyesi

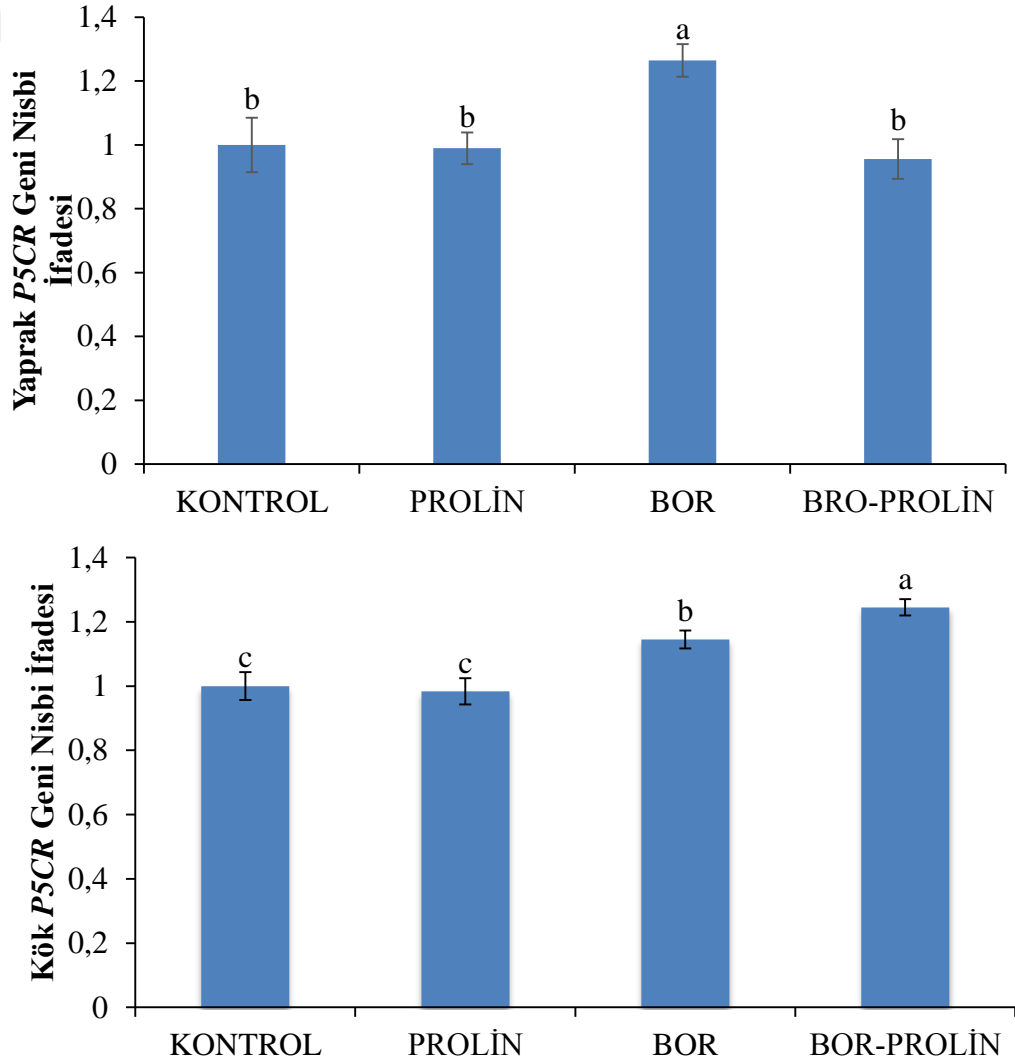
Yaprak *P5CS* ifade düzeyi incelendiğinde, en yüksek ifade düzeyi Bor grubunda gözlemlendi. Bor-prolin uygulaması yapılan gruplarda ise ifade seviyesi Bor grubuna kıyasla daha düşük, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek *P5CS* gen ifade seviyesi gözlemlendi. Köklerdeki en yüksek *P5CS* geni ifade seviyesi, bor stresine maruz kalmış grupta gözlemlendi. Bununla birlikte ikinci en yüksek gen ifade seviyesine, prolin ön uygulaması yapılmış ve bor stresine maruz kalmış grupta saptandı (Şekil 31).



Şekil 31. Yaprak ve kök prolin karboksilat sentaz (*P5CS*) geni ifade seviyesi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P < 0.05$) seviyesinde önemsizdir.

3.10.2. Prolin 5 Karboksilat Redüktaz (P5CR) Geni İfade Seviyesi

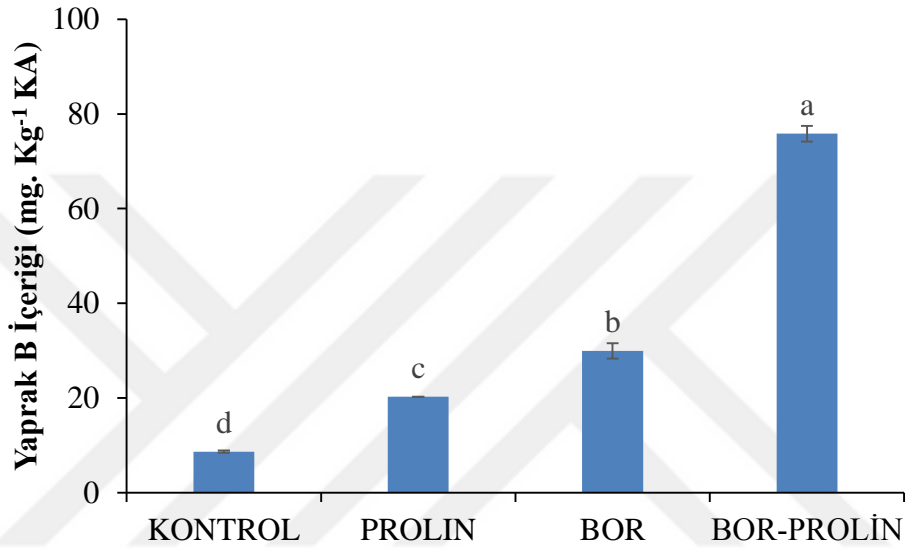
Hücrel prolin seviyesinin enzimatik olarak sentezlenmesinden sorumlu kilit enzimlerden birisi olan *P5CR* geninin ait ifade seviyeleri Şekil 32’de verildi. Buna göre sadece yapraklar için, Bor grubunda en yüksek gen ifade seviyesinin olduğu saptandı. Buna karşın diğer gruplarda söz konusu *P5CR* geni ifade seviyesi bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Köklerdeki *P5CR* gen ifadesi incelendiğinde, yapraklardaki ifade seviyesinin aksine en yüksek ifadenin bor-prolin grubunda olduğu saptandı. Bor grubundaki gen ifade düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (Şekil 32).



Şekil 32. Yaprak ve kök prolin 5 karboksilat redüktaz (*P5CR*) geni ifade seviyesi değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ($P < 0.05$) seviyesinde önemsizdir.

3.11. Bor İçeriği

Yaprak B içeriği incelendiğinde, en yüksek B içeriğinin bor-prolin grubunda olduğu saptandı. Bor grubundaki B içeriğinin, kontrol grubundakinden daha yüksek olduğu belirlendi. Prolin grubunun B içeriğinin de kontrol grubundan daha yüksek olduğu gözlendi (Şekil 33).



Şekil 33. Yaprak Bor içeriklerinin değişimi. Şekilde kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir. KA: Kuru ağırlık

4. TARTIŞMA

Çalışmanın amacı, prolinin ağır metal stresindeki iyileştirici rolünün bilinmesine rağmen bor stresiyle ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanamamıştır. Bu nedenle prolinin bor stresinde iyileştirici etkisinin olabileceği düşünülerek bu etkisinin hangi metabolik olayları etkileyerek gerçekleştirdiği araştırılmıştır. Bu amaçla, deney materyali olarak buğday (*T. aestivum* cv. Altındane) fideleri kullanılmıştır. Bor stresi oluşturmak için bitkilere borik asit uygulanmıştır. Bor stresi koşullarında prolinin etkisini gözlemlemek için dışarıdan prolin ön uygulaması yapılmıştır. Uygulamalar sonucunda prolin ön uygulamasının iyileştirici etkisinin gözlemlenebilmesi için buğday yapraklarında ve köklerinde su durumu, biyokimyasal parametreler (MDA, prolin ve H₂O₂), bazı antioksidan enzimler (CAT, SOD, GR ve POD) ve prolin sentezi ile ilgili genlere ait ifade seviyeleri (*P5CS*, *P5CR*) ölçülmüştür. Ayrıca yapraklarda fotosentetik pigmentler ve bor içerikleri belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada en uygun bor ve prolin konsantrasyonları belirlenmiştir. Bor için yapılan ön çalışmada morfolojik olarak kök ve yapraklar incelendiğinde 5 mM bor konsantrasyon olarak belirlenmiştir. 5 mM bor stresi koşullarında 2 mM, 5 mM ve 10 mM prolin uygulamalarında pigment içeriğinde iyileşmenin ve MDA içeriğinde bir düşüşün olduğu belirlendi. Ancak yaprak pigment analizleri ve MDA seviyesi incelendiğinde iyileşmenin en iyi olduğu konsantrasyon 5mM bor stresi ile birlikte 5 mM prolin uygulaması yapılan grupta olduğu gözlemlendi (Şekil 12-16). Bu nedenle çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında 5 mM bor ve 5 mM prolin konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

Çalışmamızda bor stresine maruz kalmış buğday fidelerinde yaprak ve kök su potansiyeli incelenmiştir. Bor stresi uygulanan gruptaki yaprak ve kök su potansiyelinde diğer gruplara göre anlamlı düşüşler gözlenmiştir (Şekil 17). Benzer şekilde, Hugo vd. (2013) zeytin bitkisiyle yaptıkları çalışmada bor stresi altında su potansiyelinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Bitkilerde borik asit stresi hücre duvarında lignin-süberin yapılarının bozulmasına neden olduğu ve bunun sonucu bitkide su kaybının arttığı rapor edilmiştir (Aquea vd., 2012). Bununla birlikte mevcut çalışmada, prolin ön uygulaması yapılan deney grubunda, sadece bor stresi uygulanan gruba kıyasla hem yaprak hem de kök su potansiyeli değerlerinde iyileşmeler belirlenmiştir (Şekil 17). Çalışmamızı destekler nitelikte başka bir

çalışmada (Ahmed vd., 2010), zeytin bitkisinde dışarıdan prolin uygulamasının tuz stresine karşı su potansiyelini iyileştirici etkileri olduğunu rapor etmişlerdir. Costa ve Morel (1994) *Lectuca sativa* L. bitkisinde Cd stresinde yaptıkları çalışmada bitkide Cd ile birlikte prolin birikiminde artış olduğunu ve bu durumda bitkide su durumunu iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Su potansiyelinde gözlenen bu artış, prolinin ozmotik düzenleyici özelliği ile ilgili olabilir. Kuznetsov ve Shevyakova (1997) stres toleranslı bitkilerde prolin miktarının arttığını bu durumun protein ve enzimlerin denatürasyonunu koruduğunu ve aynı zamanda ozmoregülasyonu sağladığını açıklamışlardır. Ayrıca, yine pekçok çalışmada çevresel stres koşullarında bitkilerde içsel prolin birikimi ile çevresel streslere tolerans arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Kavi Kishor vd., 2005; Hossain vd., 2014; Yaish, 2015).

Bitkilerin stres durumunun diğer bir belirleyicisi lipid peroksidasyonu ürünü olan tiyobarbütirik asit reaktifleri (TBARS)'dir. Çalışmamızda bor stresi koşullarında buğday fidelerinde yaprak ve köklerde lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızı destekler nitelikte, Cervilla vd. (2007) yüksek bor toksititesi koşullarında domates çeşitlerinde lipid peroksidasyonunun arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Molassiotis vd. (2006) elma anaçları ve Güneş vd. (2006) üzüm bitkisinde bor stresi koşullarında TBARS seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada dışarıdan uygulanan prolinin, bor stresi koşullarında lipid peroksidasyonu üzerine iyileştirici etkileri tespit edilmiştir (Şekil 18). Buna benzer olarak mevcut tez çalışmasında, prolin ön uygulaması yapılmış ve bor stresine maruz kalmış fidelerde TBARS içeriğinin sadece bor stresine maruz kalmış fidelere oranla daha düşük seviyelerde seyrettiği belirlenmiştir (Şekil 18). Rasheed vd. (2014) buğday bitkisinde yaptıkları çalışmada Cd stresi koşullarında, Aggarwal vd. (2011) selenyum (Se) stresinde malondialdehid (MDA) seviyesinin arttığını, her iki çalışmada da dışardan prolin uygulamasının MDA seviyesini azalttığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Sorkheh vd., (2012) badem bitkisinde H₂O₂ neden olduğu oksidatif stres durumunda dışardan prolin uygulamasının MDA seviyesini düşürdüğü göstermişlerdir. Benzer şekilde Kumar ve Yadav (2009) çay tomurcuklarında soğuk stresi koşullarında (+4 °C) MDA seviyesinin arttığını ve prolin uygulaması ile MDA seviyesinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Bu nedenle mevcut çalışmada prolin uygulamasının bor stresi altındaki uygulamada membran bütünlüğünü koruduğunu ve bitkide su kaybını azalttığı sonucuna varılmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi bitki içsel su durumunun korunmasında prolin teşvikli membran bütünlüğünün de etkisi olduğu söylenebilir.

Bitkilerin çoğunda biyotik ve abiyotik streslere karşı prolin birikimi yaygın bir fizyolojik bir cevaptır. Yapılan çalışmada ölçümü yapılan parametrelerden bir diğeri içsel prolin seviyesidir. Yaprak prolin içeriğine bakıldığında en düşük seviyenin kontrol grubunda, en yüksek seviyenin ise bor stresi koşullarında olduğu görülmüştür. En yüksek ikinci seviyenin bor-prolin grubunda, en düşük ikinci seviyeninde prolin grubunda olduğu belirlenmiştir. Kök prolin seviyesinde yaprak prolin seviyesine benzer olarak en yüksek seviyenin bor uygulamasında olduğu ölçülmüştür. Bor-prolin uygulamasında ikinci enyüksek seviye tespit edilmiştir. Kontrol ve prolin uygulamalarında ise benzer şekilde en düşük prolin seviyesi gözlenmiştir (Şekil 19). Birçok çalışmada tuz stresi, ağır metal stresi, yüksek ve düşük sıcaklık stresleri, besin kıtlığı stresi, atmosfer kirliliği stresi, UV ışık stresi ve patojen stresi gibi stres koşulları altında prolin birikimi rapor edilmiştir. Prolin birikimi stres koşullarında bitkileri streslere karşı uyarmaktadır. Prolin ozmolit olarak bitkiler için azot ve karbon kaynağıdır (Verbruggen ve Hermans, 2008) ve çeşitli oksidatif stres koşullarında antioksidan sistemi uyarır (Demiral ve Türkan, 2004). Prolinin, bitkilerde Cd stresi dahil birçok ağır metal streslerinde koruyucu mekanizmaları olduğu bilinmektedir (Islam vd., 2009). Bu veriler göstermektedir ki prolin hem bir antioksidan hem de ozmoprotektan olarak bor uygulamasında stresin etkisinin azaltarak içsel prolin seviyesinin düşmesini sağladığı düşünülebilir. Aynı zamanda bir sinyal molekülü olarak antioksidan sistemi uyararak suretiyle bor stresinin etkisini azalttığı söylenebilir.

Çalışmamızda bor stresi koşullarında yapraklardaki H_2O_2 analizi sonucuna göre kontrol grubunda en düşük seviye gözlenirken, en yüksek H_2O_2 seviyesinin sadece bor stresi uygulaması yapılan grupta olduğu belirlenmiştir (Şekil 20). Bununla birlikte prolin ön uygulamasının yapıldığı bor stresi grubunda ise sadece bor stresi uygulanan gruba göre H_2O_2 seviyesinin önemli derecede düştüğü görülmüştür. Benzer şekilde kök H_2O_2 seviyesine bakıldığında yine en yüksek H_2O_2 seviyesinin bor stresi altında olan grupta olduğu saptanmıştır. Kontrol, prolin ve bor-prolin gruplarında ise sadece bor grubuna göre daha düşük H_2O_2 seviyesi tespit edilmiştir. Bor stresi ile birlikte prolin ön uygulamasının, kökte de H_2O_2 seviyesini bor grubuna kıyasla düşürdüğü gözlenmiştir. Başka bir çalışmada benzer olarak, (Aggarwal vd., 2011) selenyum stresinde H_2O_2 seviyesinin arttığını, dışardan prolin uygulaması ile selenyumun toksik etkisini azalttığını ve H_2O_2 seviyesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Kaushal vd. (2011) nohut bitkisinde sıcaklık stresi altında H_2O_2 seviyesinin arttığını 10 μ M prolin uygulaması ile H_2O_2 seviyesinin düştüğünü göstermişlerdir. Bu raporlara ve mevcut çalışma sonuçlarına göre H_2O_2 seviyesini

düşürülmesinde, prolinin ROS temizleyici özelliğinin rol aldığı düşünülebilir. Buna ilaveten prolinin antioksidan sistemi uyararak ve dolayısı ile H₂O₂ içeriğini azaltmış olabileceği de söylenebilir. Çalışmamızda da prolin uygulaması yapılan gruplarda antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Benzer olarak, Islam vd. (2009) tütün hücre kültürleri ile yaptıkları bir çalışmada, dışarıdan uygulanan prolinin Cd stresi koşullarında antioksidan sistemi uyardığını rapor etmişlerdir.

Bitkilerde bor stresinin klorofil içeriğinde azalmaya, yapraklarda kloroza ve nekrozlara neden olduğu literatürde çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Juan, 2008; Reid, 2009). Bu sebeple mevcut çalışmada bor stresinin fotosentetik pigmentler üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla fotosentetik pigment içeriği ölçülmüştür. Bor stresi koşullarında toplam klorofil ve toplam karotenoid seviyelerinin azaldığı, buna karşın prolin ön uygulaması ile toplam klorofil ve toplam karotenoid seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. En yüksek toplam klorofil ve toplam karotenoid seviyelerinin kontrol ve prolin uygulamalarında olduğu görülmüştür (Şekil 21). Benzer şekilde klorofil a ve klorofil b içerikleri ölçülmüş ve bor stresi uygulamasında en düşük içerik olduğu görülmüştür. Bor stresi ile birlikte prolin ön uygulaması yapılan grupta klorofil içeriklerinin arttığı tespit edilmiştir. En yüksek klorofil içeriğinin ise prolin ve kontrol uygulamalarında olduğu belirlenmiştir (Şekil 22). Buğday bitkileri ile yapılan başka bir çalışmada ise benzer olarak Cd stresi uygulanan çeşitlerde pigment içeriğinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdiği ve bununla birlikte dışarıdan yapılan prolin uygulamasının söz konusu stres etkilerini yatıştırdığı bildirilmiştir (Rasheed vd., 2014). Aynı araştırmacılar, Cd etkisiyle gerçekleşen pigment yıkımının prolin uygulaması tarafından engellenmesini, prolinin hücre içi redoks etkileşimini düzenlemesine ve detoksifikasyon mekanizmalarını uyarmasına bağlamışlardır. Mevcut çalışmada da benzer bir şekilde prolin uygulamasının bor stresi koşullarında pigment yıkımını engellediği söylenebilir.

Bitkiler strese maruz kaldıklarında klorofil flouresansı parametreleri olumsuz yönde etkilenir (Ekmekçi vd., 2008). Mevcut çalışmada bor stresi koşullarında klorofil flouresansı parametreleri analiz edilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında PS2 maksimum kuantum veriminin (F_v/F_m) bor stresi koşullarında düştüğü gözlenmiştir. Bununla birlikte prolin ön uygulaması, bor stresi koşullarında sadece bor stresi uygulanan gruba göre F_v/F_m oranını iyileştirmiştir (Şekil 23). Benzer şekilde, bakır ve diğer ağır metal streslerinin F_v/F_m oranını azalttığını bildiren birçok çalışma mevcuttur (Tanyolaç vd., 2007; Ekmekçi vd., 2008). Literatürde bor stresi koşullarında dışarıdan uygulanan

prolinin F_v/F_m oranı üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte prolinin çeşitli stres koşullarında söz konusu fotosentetik verim açısından etkilerini araştıran bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin Kavi Kishor vd. (2005) oksidatif stres koşullarında prolin uygulamasının F_v/F_m değerini iyileştirdiklerini göstermişlerdir. Fotosentetik verimin bitkilerde su kaybı ile oldukça düştüğü bilinmektedir (Sharma vd., 2012). Mevcut tez çalışmasında bor stresi koşullarında bitki su durumunun prolin uygulaması ile korunduğunu görülmektedir. Bu durum prolinin bor stresi koşullarında hem bir antioksidan hem de osmoprotektan olarak görev yapması sonucu tilakoid membranların bütünlüğü koruduğu düşünülebilir. Çünkü bitki de su kaybının azalması doğal olarak fotosentetik aygıtların daha sağlıklı çalışmasına sebep olmaktadır (Özfidan, 2010).

Çalışmamızda analizi gerçekleştirilen diğer bir parametre de fotokimyasal olmayan floresans kullanımı (NPQ)'dir. Çeşitli araştırmalar NPQ oranının birçok stres durumunda arttığını göstermiştir (Kavi Kishor vd., 2005). NPQ oranının yüksek olması fotosentetik aygıtın mevcut ışığı, enerji çevrimine sokmadığı anlamına gelir. Bu sebeple fotosentez yavaşlar. Mevcut çalışmada bor stresine maruz kalmış buğday fidelerinde NPQ değerinin arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, prolin ön uygulaması bor stresinin NPQ oranı üzerindeki olumsuz etkisini azaltmış ve sonuç olarak bu oran sadece bor uygulanan gruba karşı düşmüştür (Şekil 24). Buna ek olarak etkin fotosentez oranını gösteren fotokimyasal floresans kullanımı (Q_p)'dir. Bor stresi ile Q_p oranının düştüğü görülürken, bor stresi ile birlikte prolin ön uygulaması yapılan grupta bor stresi ile karşılaştırıldığında bir iyileşmenin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 25). Bunlara ek olarak PS 2'nin fotokimyasal verimine bakıldığında diğer fotosentetik parametrelere benzer şekilde en yüksek verimin kontrol ve prolin uygulamalarında olduğu, bununla birlikte bor stresinde koşullarında en düşük seviyenin meydana geldiği ve bor ile birlikte prolin ön uygulaması yapılan grupta sadece bor uygulamasına göre fotokimyasal verimde iyileşmenin olduğu belirlenmiştir (Şekil 26). Bizim çalışmamıza benzer olarak Noreen vd. (2018) bakır stresi koşullarında prolin ön muamelesi yaptıkları buğday fidelerinin Q_p değerlerinin bakır uygulanan fidelere göre artış gösterdiğini, prolinin uygulaması yapılan fidelerin bakır stresi altındaki NPQ değerlerinin ise sadece bakır stresi uygulananlara kıyasla azaldığını rapor etmişlerdir. Ancak bu iyileştirici etkinin nasıl sağlandığını açıklamak oldukça zordur. Prolinin başlı başına bir antioksidan ve osmoprotektan olması önemlidir (Chen vd., 2005; Hayat vd., 2012). Bu sayede fotosentetik aygıttaki ROS'ların temizlenmesine yardımcı olur ve hücre membran kararlılığının sağlanmasına katkıda bulunur. Bunun sonucunda hücrede fazla su

ve iyon kaybı meydana gelmez ve nihayi olarak fotosentetik aygıtın ışık enerjisi kullanımını kolaylaştırır. Böylece NPQ seviyelerinde sadece bor stresi uygulanan gruba karşı belirgin bir azalmanın meydana gelmesi mümkün olabilir.

Hücrede ROS üretimi ile temizlenmesi durumu denge halinde iken, hücre içi hemoostasinin korunduğu kabul edilir. Strese dayanıklılık ise hücrenin ROS temizleme kabiliyetine bağlıdır (Pastori ve Trippi, 1993). Hücrede ROS'ların temizlenmesinden ise antioksidan sistem sorumludur (Sharma vd., 2012). Mevcut çalışma da antioksidan sistemin önemli bileşenlerinden olan CAT, SOD, POD ve GR enzim aktiviteleri ile içsel prolin seviyeleri incelenmiştir. Önemli bir ROS kaynağı olan ve hidrojen peroksiti parçalayan CAT enzimi mevcut çalışmada ölçülmüştür. Buna göre dışarıdan uygulanan prolin, bor stresi koşullarında söz konusu enzim aktivitesinin diğer gruplara göre önemli derece arttırmıştır (Şekil 27). Aynı durum hem yaprak hem de kök CAT aktivitesi içinde benzerlik göstermektedir. Benzer sonuçlar Aggarwal vd. (2011) fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde selenyum stresi altında, Singh vd. (2010) nohut çeşitlerinde (*Cicer arietinum* L.) bakır stresi altında yaptıkları çalışmada prolin uygulamasıyla CAT aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Birçok çalışmada da bor stresi altında hidrojen peroksit seviyesi ve antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Keleş vd., 2011; Landi vd., 2012; Masood vd., 2012). Bu durumda bor stresinin önemli derecede hidrojen peroksit üretilmesine neden olduğunu ve temizlenmesi için de CAT aktivitesinin arttığını göstermektedir. Aynı zamanda, prolin ön uygulaması yapılmış bor stresi grubunda ise CAT aktivitesinin diğer gruplara göre daha yüksek ölçülmesi de prolinin antioksidan sistemi uyararak enzim aktivitelerinin arttırılmasına katkıda bulunduğunu gösterir. Nitekim dışarıdan prolin uygulamasının denendiği birçok stres çalışmasında, prolin etkisiyle antioksidan sistemin aktive olduğu bildirilmiştir (Singh vd., 2010; Hayat vd., 2012; Hossain vd., 2014). Mevcut çalışmada içsel hidrojen peroksit seviyeleri incelendiğinde, bor grubundaki hidrojen peroksit miktarının diğer gruplardan daha fazla olduğu görülmektedir. Prolin ön uygulamasının yapıldığı bor grubunda ise söz konusu miktar sadece bor grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur (Şekil 19). CAT aktivitesi ise prolin-bor grubunda yüksek olmasına karşın (Şekil 27), bu grupta içsel hidrojen peroksit daha düşüktür (Şekil 19). Bu sonuçlar prolin ön uygulamasının katalaz enzimini uyardığını göstermektedir.

Bitkilerde stresle birlikte ortaya çıkan ROS'ların temizlenmesinde görev alan bir diğer antioksidan enzim de SOD'dır (Sharma vd., 2012; Siddiqui, 2013; Hossain vd.,

2014). Buna göre bor stresi uygulanan grupta yaprak SOD aktivitesinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın prolin ön uygulaması yapılan bor grubunda ise en yüksek aktivite saptanmıştır (Şekil 28). Kök SOD aktivitesinde ise sadece bor uygulanan gruptaki aktivite kontrol ve sadece prolin ön uygulamasından yüksek olmakla birlikte, prolin ön uygulaması yapılmış bor-prolin grubundan daha düşük bulunmuştur (Şekil 28). Bulgularımıza benzer olarak yapılan birçok çalışmada dışsal prolin muamelesi ile SOD aktivitesinin artırıldığı tespit edilmiştir (Aggarwal vd., 2011; Singh vd., 2010; Hayat vd., 2012; Hossain vd., 2014). SOD enzimin hücrede meydana gelen süperoksiti temizleyerek hidrojen peroksit ürettiği bilinmektedir. Böylece ortaya çıkan fazla hidrojen peroksit ise CAT, prolin ve diğer antioksidan sistem bileşenleri tarafından temizlenmektedir (Sharma vd., 2012). Çalışmamızda dışarıdan uygulanan prolinin bu şekilde bir sinyal gibi davranarak antioksidan sistemin uyarıcı etkisinin sonucunda bitkiyi bor stresine karşı yanıtta desteklemiş olduğu sonucuna varılabilir.

Hücrede antioksidan sistemin bir bileşeni olarak hidrojen peroksidin parçalanmasından sorumlu bir diğer enzim de peroksidaz (POD)'dır (Tanyolaç vd., 2007; Siddiqui, 2013; Thounaojam vd., 2012). Mevcut çalışmada hem yaprak hem de kök POD aktivitesi izlenmiştir. Buna göre sadece bor stresine maruz kalan grupta (hem yaprak hem de kök) POD aktivitesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29). Mevcut bulguları destekler nitelikte, Thounaojam vd. (2012), bakır stresi altındaki çeltik fidelerinde, Tanyolaç vd. (2007) bakır stresi altındaki mısır fidelerinde, Siddiqui, (2013), kurşun stresi altındaki bir çeşit bezelye olan *Vigna radiata*'da POD aktivitesinde önemli bir artışın olduğunu rapor etmişlerdir. Yapraklara ait prolin ön uygulamasının yapıldığı bor gruplarında gözlenen POD aktivitesinin sadece bor stresi uygulanan gruba göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 29). POD aktivitesindeki bu azalmanın prolinin bor stresine karşı iyileştirici etkisinden olduğu düşünülebilir.

Glutasyon reduktaz (GR) bitkilerde bir antioksidan bileşik olan GSH'ın üretilmesinden sorumlu olduğu bilinen bir enzimdir (Hou vd., 2004; Hossain vd., 2014). Enzim okside olmuş glutasyonun (GSSG) glutatyona (GSH) çevrimi işlemini yerine getirir (Hou vd., 2004). GSH hücrede ROS'ların temizlenmesinde ve redoks dengesinin düzenlenmesinde görev aldığı için önemli bir bileşiktir. Bu amaçla mevcut çalışmada (yaprak ve köklerdeki) bor stresi koşullarında GR enzimi incelenmiş ve bor stresi koşullarında prolin ön uygulamasının GR enzimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma bulgularımıza bakıldığında, GR aktivitesi hem yaprakta hem de kökte en yüksek olarak bor

stresi uygulanan grupta gözlenmiştir (Şekil 30). Bu sonuçları destekler nitelikte Keleş vd. (2011) ayçiçeği bitkisinde 20 µg bor konsantrasyonundan 40 µg bor konsantrasyonuna kadar GR aktivitesinin arttığını 40 µg'dan itibaren azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda prolin ön uygulaması yapılan bor grubunda bahsi geçen enzim aktivitesi, sadece bor grubuna göre düşmüştür (Şekil 30). Bu ilginç durum prolin ön uygulaması yapılan bor gruplarında stres hasarının CAT ve SOD tarafından yatıştırılması ile söz konusu enzim aktivitesinin düşmesine neden olduğu şeklinde yorumlanabilir. Literatürde de bu duruma benzerlik gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Birçok stres çeşidinde içsel miktarı artan antioksidan maddelerden birisi de prolindir (Yaish, 2015). Prolin neredeyse tüm canlı sistemlerde var olan, sürekli sentez edilen ve çoğu stres koşullarında içsel seviyesi artarak stres yanıtında önemli rolleri olan bir bileşiktir (Kumar vd., 2008; Hayat vd., 2012).

Hücrede prolin sentezinde kilit rol oynayan sentez enzimlerinden en önemlileri P5SC ve P5CR enzimleridir (Hayat vd., 2012; Liang vd., 2013; Hossain vd., 2014;). Mevcut çalışmada bor stresi koşullarında yaprak ve köklerdeki prolin ölçümleri gerçekleştirilmiş; buna ek olarak prolin biyosentezinde görev alan P5CS ve P5CR enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin ekspresyon seviyesinde analizleri yapılmıştır. Bulgularımıza göre bor stresi prolin içeriğini hem kök hem de yaprakta uyarmıştır. Bu durum hem içsel prolin miktarında hem de ilgili gen ifadelerinde kendini göstermiştir. *P5CS* gen ifadesine bakıldığında hem yaprak hem de kökte dışarıdan prolin uygulaması yapılmış stres grubunda gen ifadesi sadece bor uygulanan gruba göre azalmıştır. Kontrol grubunda en düşük gen ifadesi oluşmuşken, sadece prolin uygulanan grupta kontrole göre dah yüksek bir gen ifadesi meydana gelmiştir (Şekil 31). *P5CR* gen ifadesini incelediğimizde yaprak ve kökte bor-prolin uygulaması hariç benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Yaprakta en düşük gen ifadesi kontrol ve prolin uygulamalarında gözlenmiştir. Bor stresi uygulanan grupta ise en yüksek gen ifade düzeyi belirlenirken, bor stresi ile birlikte prolin uygulaması yapılan grupta gen ifadesinde azalma meydana gelmiştir. Kökte *P5CR* gen ifadesinde ise en yüksek seviye bor-prolin uygulamasında belirlenmiştir. Bor uygulanan grupta bor-prolin grubuna göre daha düşük gen ifadesi ölçülmüştür. Kontrol ve prolin gruplarında ise en düşük gen ifadeleri görülmüştür (Şekil 32). Bu durumu; prolinin strese karşı yanıtta bitkiye iyileştirici etki yaptığı ve stres etkilerinin azalması ile bahsi geçen gen ifadelerinin azaldığı şeklinde açıklanabilir. Bu azalışı şu şekilde açıklamak da mümkündür; hücre içinde prolin havuzunun sabit değeri vardır. Mevcut havuza dışarıdan eklenen prolinin, içsel prolin

seviyesinin belirli bir sabitede devam ettirilmesi için devam eden gen ekspresyonunun (yukarıda anlatılana benzer bir şekilde) negatif bir geri besleme mekanizması ile düşmesine neden olduğu sonucuna varılabilir. Ronde vd., (2000, 2001) transgenik bitkilerle yaptıkları çalışmalarda *p5cr* mutantlarının kuraklık streslerinde duyarlılıklarının arttığını göstermişlerdir. Siripornadulsil vd. (2002) ağır metal stresi altında yüksek prolin biriktiren mikro alglerle yaptıkları çalışmalarda prolin birikiminin abiyotik streslerin oksidatif zararlarını azalttığını belirtmişlerdir.

Yaprak bor içeriği ölçümü incelendiğinde en düşük seviyenin kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Bor stresi koşullarına göre bor-prolin uygulmasında daha yüksek, prolin uygulmasında ise daha düşük bor içeriği tespit edilmiştir (Şekil 33). Burada dikkat çekici durum bor uygulmasına göre bor-prolin uygulmasında yaklaşık üç kat bor içeriği belirlenmiş olması prolinin borun hücre içine taşınmasında ve hücrede birikmesine neden olmuş olacağı fikrini oluşturmuştur. Prolinin bu olayı hücrede bulunan bor taşıyıcı kanalları uyararak borun hücrede birikmesine neden olduğu ya da metal şelatörü olarak boru bağlayarak hücreye taşıdığı ve hücrede birikmesine neden olduğunu düşündürmektedir.

Bitkilerin bor toksisitesine verdikleri cevaplar yapılan pek çok çalışmada genel olarak hassas kültürler ile kıyaslandığında, toleranslı kültürlerin daha düşük konsantrasyonlarda B biriktirdiği ve bunun da daha çok etkili bir boru dışarı atıcı tipteki taşıyıcı (transporter) sistemle ilişkili olduğu, bor bağlayıcı komplekslerin ve borun vakuol gibi organellerde biriktirilmesi yollarının bitkiler tarafından daha az tercih edildiği sonuçlarına varılmıştır (Reid, 2007). Hepsi birlikte ele alındığında, B toksisitesine tolerans için B'un alınımında bir azalma veya hücre içi boru dışarıya atacak aktif bir sistemin varlığına gereksinim vardır (Reid, 2007). Mevcut çalışmada genel olarak bitkide prolin içeriği arttıkça B içeriğinin arttığını göstermektedir. Prolin içeriği en yüksek olan bor uygulanmış bitkilerde, diğer bitkilere kıyasla en yüksek B içeriği belirlenmiştir. Bu da borun hücre dışına pompalanmasından sorumlu taşıyıcı proteinlerin fonksiyon görebileceğini göstermektedir. Buna ilaveten *P5CS*'yi fazlaca ifade eden ve prolin içeriği yüksek olan *Chlamydomonas reinhardtii*'in yabani tipe oranla yüksek oranda kadmiyum biriktirebildiği rapor edilmiştir (Siripornadulsil vd., 2002). Bizim çalışmamızda da *P5CS* gen ifadesinin en yüksek olduğu bor uygulanmış bitkilerde en faz bor seviyesi ölçülmüştür. Bu durum prolinin bor taşıyıcı proteinleri uyarmasının yanısıra prolin metal bağlayıcı bileşiklerin sentezini de uyararak borun hücre dışına atılmasını ya da depo edilmesini sağlayarak onun toksisitesini azaltmasıyla açıklanabilir.

Mevcut çalışmada bor stresi ile dışarıdan uygulanan prolin arasındaki ilişki incelenmiştir. Bulgularımız bize, prolinin bor stresinde de diğer oksidatif stres durumlarında olduğu gibi ROS temizleyici, sinyal molekülü ve osmotik düzenleyici olarak görev yapabileceği fikrini oluşturmuştur. Dışarıdan uygulanan prolin öncelikli olarak membran bütünlüğünü ve osmotik dengenin devamını sağlamış ve bunun sonucunda bitki su durumunun korunmasına yardımcı olmuştur. Bu sayede bitki su durumunun ve membran bütünlüğünün korunması ile fotosentetik aygıt ve pigmentler korunmuş, fotosentez hasarı azaltılarak reaksiyonun devamı sağlanmış ve bitkilerin ürün kaybına uğraması da en aza indirilmiştir. Böylece bitkinin bor stresine karşı yanıtta tolerans kabiliyetini arttırmıştır. Buna ek olarak, prolinin osmoprotektan etkisinin yanında antioksidan etkileri de unutulmamalıdır. Bitkilerin tüm stres koşullarında ikincil olarak oksidatif strese maruz kaldığı bilinmektedir. Bor stresinde de ortaya çıkan ROS'ların temizlenmesi için, prolin başlı başına antioksidan olarak hareket ettiği gibi antioksidan sistemin de uyarılmasına sebep olmuştur. Bu sebebedir ki; çalışmanın bitki materyali olan buğday fideleri bor stresi koşullarında prolin uygulaması ile daha iyi bir tolerans kabiliyeti göstermişlerdir.

Sonuç olarak, bor stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde dışarıdan prolin ön uygulamasının antioksidan sistemi uyararak, antioksidan madde ve osmotik düzenleyici olarak bor stresi etkilerinin yatıştırılmasında etkili bir bileşik olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz verilere göre bu şekildeki bir etki fotosentetik verimin devamlılığını da sağlayacağı söylenebilir. Aynı zamanda borun hücrede birikmesine neden olması nedeniyle metal şelatörü ve özelde bor şelatörü olduğu fikrini oluşturabilir.

5. SONUÇLAR

1. Bor stresi altında buğday fidelerinde yaprak ve köklerde su potansiyelinin azaldığı, dışsal prolin uygulaması ile su potansiyellerinde iyileşmenin olduğu gözlemlendi.
2. Stresle birlikte lipid peroksidasyonu artarken, dışsal prolin uygulaması ile azaldığı görüldü.
3. Bor stresi altında prolin içeriğine baktığımızda stresle birlikte yaprak ve kökte prolin seviyeleri önemli derecede artarken, stres koşullarında dışsal prolin uygulaması ile bu seviyenin düştüğü gözlemlendi.
4. Bor stresi koşullarında H_2O_2 seviyesi yaprak ve kökte artarken, prolin ön uygulaması ile azaldığı tespit edildi.
5. Bor stresi altında buğday fidelerinde toplam klorofil, kartenoid, klorofil a ve klorofil b içeriklerinin azaldığı ancak prolin ön uygulaması ile bu azalmada bir iyileşmenin olduğu belirlendi.
6. Bor stresi koşullarında PS2'nin maksimum fotokimyasal etkinliğinin (F_v/F_m), fotokimyasal verimin (Φ_{PS2}) ve fotokimyasal floresans kullanımının (QP) azaldığı, fotokimyasal olmayan floresans (NPQ) kullanımında ise artışa neden olduğu, bor stresi ile birlikte dışsal prolin uygulamasıyla PS2'nin maksimum fotokimyasal etkinliğinde (F_v/F_m), fotokimyasal veriminde (Φ_{PS2}) ve fotokimyasal floresans kullanımında (QP) iyileşmelerin olduğu, fotokimyasal olmayan floresans (NPQ) kullanımında ise azalma olduğu gözlemlendi.
7. CAT aktivitesine bakıldığında bor stresi koşullarında yaprak ve kökte daha düşük bir aktivite gösterdiği, prolin ön uygulaması ile enzim aktivitesinin arttığı görüldü.
8. SOD aktivitesinde de CAT aktivitesine benzer şekilde stres koşullarında hem yaprak hem de kökte daha düşük aktivite gözlenirken, prolin ön uygulaması ile bu aktivitenin arttığı tespit edildi.
9. GPX ve GR aktivitelerinin CAT ve SOD aktivitelerine zıt bir durum ortaya koyduğu görüldü. Yaprak ve kökte GPX ve GR aktivitelerinin bor stresi koşullarında arttığı ancak stresle birlikte prolin ön uygulaması ile azaldığı belirlendi.

10. Bor stresine maruz kalan buğday fidelerinde *P5CS* gen ifadesinin hem yaprak hem de kökte kontrole göre önemli oranda arttığı, bununla birlikte prolin ön uygulaması ile bu genin ifadesinde azalmaların olduğu görüldü.
11. *P5CR* geninin ifadesine bakıldığında ise durumun biraz daha farklı olduğu gözlemlendi. Yaprakta stres altında *P5CR* ifadesinin artarken, stresle birlikte prolin uygulamasında bu genin ifadesinin düştüğü belirlendi. Kökte bor stresi uygulanan grupta genin ifadesinin daha düşük olduğu, prolin ön uygulaması yapılan grupta ise genin ifadesinin arttığı tespit edildi.
12. Yaprak hücre bor içeriği incelendiğinde en düşük bor içeriğinin kontrol grubunda en yüksek bor içeriğinin bor-prolin uygulamasında olduğu belirlendi. İkinci en yüksek seviyenin bor uygulamasında olduğu görüldü. Sadece prolin uygulamasında ise kontrole göre iki kat bir bor içeriği tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonucunda prolinin, su içeriğinin korunmasında ve osmoregülasyonda fonksiyon görerek B stresine toleransta önemli rol oynadığı kanısına varılmıştır. Ancak prolinin antioksidan sistem üzerindeki etkisini daha kapsamlı olarak aydınlatmak amacıyla; B stresi altında buğday bitkilerinde Asada-Halliwel yolunun enzimleri olan monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz aktivitelerinin ve onları kodlayan genlerinin ifade düzeylerinin, askorbik asit ve glutatyon içeriklerinin, belirlenmesi önerilmektedir. Buna ilaveten, prolinin buğday bitkilerinde metal stresi koşullarında sentezlendiği bilinen metalotiyoneninler ve fitoşelatinler üzerinde prolinin etkisinin belirlenmesi onun şelatlamadaki rolünün tespiti açısından önemli olacaktır. Öte yandan, B'un bitkiye alınımı, taşınımı ve çeşitli hücrel kompartmanlarda tutulması görev yapan taşıyıcı kanal proteinlerini kodlayan genlerin ve prolinin yıkımında görev alan PDH ve P5DCH enzimlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi de prolinin buradaki rollerinin aydınlatılması için faydalı olacaktır.

B'un bitkilerdeki şeker metabolizması üzerinde de etkili olduğu bilindiğinden, prolinin fotosentez üzerindeki etkisinin fotosentetik gaz değişimi parametreleri açısından da çalışılması önemli olacaktır. B bitkilerde meyve üretimini de etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple prolinin çiçeklenme, meyve verimi ve tohum sayısı gibi parametreler üzerindeki etkisi de B stresi koşullarındaki buğday bitkilerinde çalışılmalıdır.

Prolinin B stresi altındaki buğday bitkilerine sağladığı tolerans oldukça karmaşıktır. B stresi koşulları altında prolininin uyardığı sinyal yollarının aydınlatılması stresin olumsuz etkilerinin nasıl azaltıldığının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu bilgiler ışığında bitkiler üzerinde yapılabilecek birtakım değişiklikler ile B stresi yüzünden doğan ürün kayıplarının önüne geçilebilir. Bunu için örneğin mikrodizilim yöntemini kullanarak B stresi altında prolin ile ilişkili olabilecek genler belirlenebilir ve söz konusu genler üzerinden yeni çalışmalar tasarlanabilir. Ya da daha sonraki çalışmalarda prolininin transkripsiyon faktörlerini etkileyerek genlerin ifade düzeylerini değiştirip değiştirmediği belirlemek amacıyla transkriptom profillemesi yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abraham, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L. ve Szabados, L., 2010. Methods for determination of proline in plants. In *Plant Stress Tolerance*, Humana Press, 317–331.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco., P. ve Tiburcio, A. F., 2010. Polyamines: Molecules with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance, Planta, 231, 1237–1249.
- Ashraf, M., 1994 Breeding for Salinity Tolerance in Plants, Critical Reviews in Plant Science 13, 1, 17-42.
- Ashraf, M. ve Foolad, M. R., 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, Environmental and Experimental Botany, 59, 206–216.
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y. ve Tanyolaç, D., 2006. Bitkilerde Ağır Metal Zararları ve Korunma, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 7, 1, 1–16.
- Ardıç, M., Sekmen, A. H., Tokur, S., Ozdemir, F. ve Turkan, I., 2008. Antioxidant Responses of Chickpea Plants Subjected to Boron Toxicity, Plant Biology, 11, 328-38
- Alıcı, Y. ve Öncel, I., 2008. Buğdayda Bor Toksisitesi ile Fosfor Arasındaki Etkileşimin Büyüme ve Çözünür Karbonhidratlar ile ilişkisinin incelenmesi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 29, 1.
- Agarwal, S., Sairama, R. K., Srivastava, G.C., Tyagib, A. ve Meenaa, R.C., 2005. Role of ABA, Salicylic Acid, Calcium and Hydrogen Peroxide on Antioxidant Enzymes Induction in Wheat Seedlings, Plant Science, 169, 559–570.
- Andrade, S. A. L., Gratao, P. L., Azevedo, R. A., Silveira, A. P. D., Schiavinato, M. A. ve Mazzafera, P., 2010. Biochemical and Physiological Changes in Jack Bean under Mycorrhizal Symbiosis Growing in Soil with Increasing Cu concentrations. Environmental and Experimental Botany, 68, 198–207.
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S. ve Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, Plant Physiology, 107, 645–648.
- Aquea, F., Federici, F., Moscoso, C., Vega, A., Jullian, P., Haseloff, J. I. M. ve Arce-Johnson, P., 2012. A Molecular Framework for The Inhibition of *Arabidopsis* root Growth in Response to Boron Toxicity, Plant Cell and Environment, 35, 719–734.
- Arora, A., Sairam, R. K. ve Srivastava, G. C., 2002. Oxidative Stress and Antioxidative System in Plant, Current Science, 82, 1227–1238.

- Başalp, A., Öncel, I. ve Koç, E., 2011. Bor (B) Toksisitesine Toleranslı ve Duyarlı Buğday Fidelerinde Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin Belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 15-3135-14.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition, Germany, 190-302.
- Bolanos, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I. ve Blevins, D., 2004. Why boron?, Plant Physiology and Biochemistry, 42, 907–912.
- Boyer J.S., 1982. Plant productivity and environment, Science, 218, 443–448.
- Bowen J. E., ve Gauch H. G., 1965. Essentiality of Boron for *Dryopteris dentata* and *Selaginella apoda*, American Fern Journal, 55, 67-73.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43, 83–116.
- Brahim, L. ve Mohamed, M., 2011. Effects of Copper Stress on Antioxidative Enzymes, Chlorophyll and Protein Content in *Atriplex halimus*, African Journal of Biotechnology, 50, 10143–10148.
- Brohi, A., Akgün, A., Rüştü, M. ve Sabit, K. E., 1994. Bitki Besleme. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Tokat.
- Büyük, İ., Soydam, A. ve Aras, S., 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 69, 2, 97–110.
- Chamseddine, M., Wided, B. A., Guy, H., Marie-Edith, C. ve Fatma, J., 2009. Cadmium and Copper Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Response in Tomato (*Solanum lycopersicon*) Leaves, Plant Growth Regulation, 57, 89–99.
- Chatterjee, J. ve Chatterjee, C., 2000. Phytotoxicity of Cobalt, Chromium and Copper in Cauliflower, Environmental Pollution, 109, 69–74.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms, Food and Chemical Toxicology, 37, 949–962.
- Chen, C. ve Dickman, M. B., 2005. Proline Suppresses Apoptosis in The Fungal Pathogen *Colletotrichum trifolii*, Proceedings of The National Academy of Science USA, 102, 3459–3464.
- Cicerali, N. I., 2004. Effect of Stress on Antioxidant Defense Systems of Sensitive and Resistant Cultivars of Lentil (*Lens culinaris* M), Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Costa, G. ve Morel, J. L., 1994. Water Relations, Gas Exchange and Amino Acid Content in Cd-Treated Lettuce. Plant Physiology and Biochemistry, 32, 561–70.
- Creighton, T. E., 1999. Encyclopedia of Molecular Biology, Wiley, 1-4, 631–632.
- Creissen, G., Edwards, E. A. ve Mullineaux, P. M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, Foyer, C. H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press, Boca Raton, 343–364.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Welburn, A. R. ve Mullineaux, P. M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, Journal of Biochemistry, 24, 465–472.
- Dannel F., Pfeffer, H. ve Römheld, V., 2001. Update on Boron in Higher Plant-Uptake, Primary Translocation and Compartmentation, Plant Biology, 4, 193–204.
- Davies, K. J. A., 2000. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems, IUBMB Life, 50, 279–289.
- Deivanai, S., Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K. ve Lim, O. F., 2011. Role of Exogenous Proline in Ameliorating Salt Stress at Early Stage in Two Rice Cultivars, Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 7, 157–174.
- Demiral T. ve Türkan İ., 2004. Does Exogenous Glycine Betaine Affect Antioxidative System of Rice Seedlings under NaCl Treatment? Journal of Plant Physiology, 161, 1089–1100.
- Devirian, T. A. ve Volpe, S. L., 2003. The Physiological Effects of Dietary Boron, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43, 219–231.
- Duque, A. S., de Almeida, A. M., da Silva, A. B., Da Silva, J. M., Farinha, A. P. ve Santos, D., 2013. Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive. in: Abiotic Stress-Plant Responses and Applications in Agriculture. InTech., Croatia, 49–101.
- Elveren, M., Osmalı, E. ve Karakoyun, G., 2015. Erzincan’ın Farklı Bölgelerindeki Sarıçamların (*Pinus sylvestris* L. var. *hamata* Steven) Ağaç Bileşenlerinde ve Yetiştikleri Toprakta Mineral Elementlerin Birikimi. CBÜ Fen Bilimleri Dergisi, 11, 119–126.
- Foyer, C. H., Descouvrieres, P. ve Kunert, K. J., 1994. Protection Against Oxygen Radicals: an Important Mechanism Studied in Transgenic Plants, Plant Cell and Environment, 17, 507–523.
- Feierabend, J., Schaan, C. ve Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs under both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II, Plant Physiology, 100, 1554–1561.

- Galston, A. W. ve Sawhney, R. K., 1990. Polyamines in Plant Physiology, Plant Physiology, 94, 406–410.
- Gezgin, S., Gökmen, F., Dursun, N., Babaoğlu, M. ve Hakkı, E. E., I., 2005. I. Ulusal Bor Çalıştayı, Nisan, Ankara, Bildiriler Kitabı: 460.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N., 2010. Polyamines and Abiotic Stress Tolerance in Plants, Plant Signaling and Behavior, 5, 26–33.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S. ve Zhang, C., 2005. Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in pots under drought, Plant Science, 169, 313–321.
- Hamdia, M. A. ve Shaddad, M. A. K, 2010. Salt Tolerance of Crop Plants, Journal of Stress Pysiology and Biochemisrty, 6, 46–90.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. ve Ahmad, A., 2012. Role of Proline under Changing Environments, Plant Signaling and Behavior, 7, 11, 1456–1466.
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolate Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125, 189-198.
- He, L., Gao, Z. ve Li, L., 2009. Pretreatment of Seed with H₂O₂ Enhances Drought Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings, African Journal of Biotechnology, 8, 6151–6157.
- Hou W. C., 2004. Detection of Glutathione Reductase after Electrophoresis on Native or Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels, Electrophoresis, 25, 2926–2931.
- Hossain, M. A., Hoque, A., Burritt, D. ve Fujita, M., 2014. Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms stress. Biologia Plantarum, 42, 249–257.
- Hu H. ve Brown P.H., 1997. Absorption of Boron by Plant Roots. Plant and Soil, 193, 49–58.
- Islam, M., Hoque, M. A, Okuma, E., Banu, M. N. A, Shimoishi, Y., Nakamura, Y. ve Murata, Y., 2009. Exogenous Proline and Glycinebetaine increase Antioxidant Enzyme Activities and Confer Tolerance to Cadmium Stress in Cultured Tobacco Cells, Journal Plant Physiology, 165, 1587–1597
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. ve Paldi, E., 1999. Hydroponic Treatment with Salicylic Acid Decreases The Effects of Chilling Injury in Maize (*Zea mays* L.) plants, Planta, 208, 175–180.
- Juan, J., Camacho-C., Rexach, J. ve Gonz´alez-Fontes, A., 2008. Boron in Plants: Deficiency and Toxicity, Journal of Integrative Plant Biology, 50, 10, 1247–1255.

- Kadioğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi, Beşinci baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Kadioğlu, A. ve Terzi, R., 2007. A Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling, Botanical Review, 73, 290–302.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. ve Timur S., 2007. Metallerin Çevresel Etkileri –I. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 12s.
- Kanber, R., Kırdı, C. ve Tekinel, O., 1992. Sulama Suyu Niteliği ve Sulamada Tuzluluk Sorunları, Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 21, Ders kitapları Yayın No:6, Adana.
- Kato, Y., Miwa, K., Takano, J., Wada, M. ve Fujiwara, T., 2009. Highly Boron Deficiency-Tolerant Plants Generated by Enhanced Expression of NIP5;1, a Boric Acid Channel, Plant and Cell Physiol. 50, 1, 58–66.
- Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P. ve Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of Proline Biosynthesis, Degradation, Uptake and Transport in Higher Plants: Its Implications in Plant Growth and Abiotic Stress Tolerance, Current Science, 88, 3–10.
- Keleş, Y., Ergün, N. ve Öncel, I., 2011. Antioxidant Enzyme Activity Affected by High Boron Concentration in Sunflower and Tomato Seedlings, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 42, 173–183.
- Khan, W., Prithiviraj, B. ve Smith, D. L., 2003. Photosynthetic Responses of Corn and Soybean to Foliar Application of Salicylates, Journal of Plant Physiology, 50, 1–8.
- Kırbağ Zengin, F. ve Munzuroğlu, Ö., 2006. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Fidelerinin Toplam Çözünebilir Protein, Prolin ve Klorofil Miktarları Üzerine Cıva Klorürün (HgCl₂) Etkileri, Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 18, 25–30.
- Kocabek, T., Svoboda, Z., Al-Zwi, A. M., Rolfe, S. A. ve Fellner, M., 2009. Boron-Regulated Hypocotyl Elongation is Affected in *Arabidopsis* Mutants with Defects in Light Signalling Pathways, Environmental and Experimental Botany, 67, 101–111.
- Krasensky, J. ve Jonak, C., 2012. Drought, Salt, and Temperature Stress-induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks, Journal of Experimental Botany, 63, 4, 1493–1608.
- Ku, H. M., Tan, C. W., Su, Y. S., Cy, C., Chen, C. T. ve Jan, F. J., 2012. The Effect of Water Deficit and Excess Copper on Proline Metabolism in *Nicotiana benthamiana*, Biologia Plantarum, 56, 337–343.
- Kuznetsov V. V. ve Shevyakova, N., 1997. Stress Responses of Tobacco Cells to High Temperature and Salinity. Proline Accumulation and Phosphorylation of Polypeptides, Physiologia Plantarum, 88, 307–314.

- Kün, E., 1983. Serin İklim Tahılları, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayını, Yayın No: 875, Ankara.
- Kün, E., 1988. Serin İklim Tahılları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Lamdan, N. L., Attia, Z. I. V., Moran, N. ve Moshelion, M., 2012. The *Arabidopsis*-Related Halophyte *Thellungiella halophila*: Boron Tolerance via Boron Complexation with Metabolites?, Plant, Cell and Environment, 35, 735–746.
- Landi, M., Degl'Innocenti, E., Pardossi, A. ve Guidi, L., 2012. Antioxidant and Photosynthetic Responses in Plant Under Boron Toxicity, American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 7, 3, 255–270.
- Levitt, J., 1972. Responses of Plants to Environmental Stresses. New York, London: Academic Press, 697s.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K. ve Becker, D. F., 2013. Proline Mechanisms of Stress Survival, Antioxidants and Redox Signaling, 19, 9, 998–1011.
- Lichtenhaler, H. K., 1996. Vegetation stress: An introduction to the Stress Concept in Plants. Journal of Plant Physiology, 148, 4–14.
- Lima-Costa, M.E., Ferreira, S., Duarte, A. and Ferreira, A.L. (2010). Alleviation of Salt Stress Using Exogenous Proline on a Citrus Cell Line, Acta Horticulturae, 868, 109-112.
- Man, D., Bao, Y., Zhang, X. ve Han, L., 2011. Drought Tolerance Associated with Proline and Hormone Metabolism in Two Tall Fescue Cultivars, Hort Science, 46, 7, 1027–1032.
- Martin, G. M. ve Baret, J. C., 2002. Reactive Oxygen Species as Double-Edged Swords in Cellular Processes: Low Dose Cell Signalling Versus High-Dose Toxicity, Human and Experimental Toxicology, 21, 71–75.
- Masood, S., Saleh, L., Witzel, K., Plieth, C. ve Mühling, K. H., 2012. Determination of Oxidative Stress in Wheat Leaves as Influenced by Boron Toxicity and Salt Stress, Plant Physiology and Biochemistry, 56, 56–61.
- McKersie, D. B., 2000. Oxidative Stress. – In: McKersie, D. B., Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials, Springer Press, Uttar Pradesh, 4, 299–320.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. ve Foyer, C. H., 1996. Comparison of Ascorbate-Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, FEBS Letters, 378, 203–206.
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism, Science, 220, 472–477.

- Metwally, A., Finkermeier, I., Georgi, M. ve Dietz, K. J., 2003. Salicylic Acid Alleviates The Cadmium Toxicity in Barley Seedlings, Plant Physiology, 132, 272–281.
- Minocha, R., Long, S., Thangavel, P., Minocha, S.C., Eagar, C. ve Driscoll, C. T., 2010. Elevation Dependent Sensitivity of Northern Hardwoods to Ca-addition at HubbardBrook Experimental Forest, NH, USA, Forest Ecology and Managment, 260, 2115–2124.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Filho, J. C. B., Pereira, L. F. P. ve Vieira, L. G. E., 2007. Evaluation of The Stress-Inducible Production of Proline in Transgenic Sugarcane (*Saccharum spp.*): Osmotic Adjustment, Chlorophyll Fluorescence and Oxidative Stress, Physiologia Plantarum, 130, 218–229.
- Nebiler, H., Erdoğan, Y., Olgun, A. ve Yerlikaya, C. 1999. The effect of Bon in Vineyard. 1st. Symposium on Protection of Environmental and Erhami Karaçam, Kütahya.
- Nounjan, N. ve Theerakulpisut, P., 2015. Effects of Exogenous Proline and Trehalose on Physiological Responses in Rice Seedlings During Salt-Stress and After Recovery, Plant Soil and Environment, 58, 7, 309–315.
- Okçu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M. ve Pehlivan, M., 2009. Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri, Alınleri Zirai Bilimler Dergisi, 17, 14–26.
- Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi –II-, S. Ü. Vakfi Yayınları, 308-313.
- Özfidan, C., 2010. Ekzojen ABA uygulamasının Kuraklık Stresi Altındaki Yabani ve ABA- Eksik Arabidopsis Mutantları Üzerindeki Biyokimyasal ve Fizyolojik etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Özkurt, Ş., 2000. Boron Accumulation in Carps Tissues (*Cypriks carpio L.*, 1758) in Dam Lakes Çatören and Kunduzlar (Kırka–Eskişehir), Turkish Journal of Biology, 24, 663–676.
- Öztürk, R., 1999. Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from *Phanerochaete chrysosporium*, Enzyme and Microbial Technology, 25, 392–399.
- Pan, Y., Wang, Z., Yang, L., Wang, Z., Shi, L., Naran, R. ve Xu, F., 2012. Differences in Cell Wall Components and Allocation of Boron to Cell Walls Confer Variations in Sensitivities of *Brassica napus* Cultivars to Boron Deficiency, Plant and Soil 354, 383–394.
- Pang, Y., Li, L., Ren, F., Lu, P., Wei, P., Cai, J. ve Wang, X., 2010. Overexpression of the Tonoplast Aquaporin AtTIP5;1 Conferred Tolerance to Boron Toxicity in *Arabidopsis*, Journal of Genetics and Genomics, 37, 389–397.

- Patykowski, J. ve Urbanek, H., 2003. Activity of Enzymes Related to H₂O₂ Generation and Metabolism in Leaf Apoplastic Fraction of Tomato Leaves Infected With *Botrytis cinerea*, Journal of Phytopathology, 151, 153–161.
- Pitcher, L. H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J. M. ve Zilinskas, B. A., 1991. Overproduction of Petunia Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant Physiology, 97, 452–455.
- Prochazkova, D., 2001. Oxidative Stress and Antioxidant Activity as the Basis of Senescence in Maize Leaves, Plant Science, 161, 765–771.
- Rasheed, R., Arslan, M., Iqbal, A., Muhammad, H., Haider, M. Z., Kanwal, U. ve Iqbal, M., 2014. Exogenous Proline and Glycinebetaine Mitigate Cadmium Stress in Two Genetically Different Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars, Brazilian Journal of Botany, 37, 4, 399–406.
- Rasheed, R., Wahid, A., Farooq, M., Hussain, I. ve Basra, S. A. M., 2011. Role of Proline and Glycinebetaine Pretreatments in Improving Heat Tolerance of Sprouting Sugarcane (*Saccharum* sp.) Buds, Plant Growth Regulation, 65, 35–45.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W. ve Korb, R. E., 1999. The Role of Trace Metals in Photosynthetic Electron Transport in O₂-Evolving Organisms. Photosynthesis Research, 60, 111–150.
- Raven, E. L., 2003. Understanding Functional Diversity and Substrate Specificity Haem Peroxidases, Natural Product Reports, 20, 367–381.
- Reid, R., 2007. Identification of Boron Transporter Genes Likely to Be Responsible for Tolerance to Boron Toxicity in Wheat and Barley, Plant and Cell Physiology, 48, 1673–1678.
- Reid, R., 2009. Can we Really Increase Yields by Making Crop Plants Tolerant to Bor Toxicity?, Plant Science, 178, 9–11.
- Rerkasem, B. ve Jamjod, S., 1997. Boron Deficiency Induced Male Sterility in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Implication for Plant Breeding, Euphytica, 96, 257–262.
- Rizwan, M., Meunier, J. D., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N. ve Keller, C., 2016. Silicon Alleviates Cd Stress of Wheat Seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) Grown in Hydroponics, Environmental Science and Pollution Research International, 23, 1414–1427.
- Sairam, R. K., Deshmuk, P. S. ve Shukla, D. S., 1997. Tolerance of Drought and Temperature Stress in Relation to Increased Antioxidant Enzyme Activity in Wheat, Journal of Agronomy and Crop Science, 178, 171–178.
- Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kavi Kishorekumar, A., Somasundaram, R. ve Panneerselvam, R., 2007. Drought-Induce Biochemical Modifications and Proline Metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Acta Botanica Croatica. 66, 43–56.

- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. ve Dixon, K., 2000. Acetyl Salicylic Acid (aspirin) and Salicylic Acid Induce Multiple Stress Tolerance in Bean and Tomato Plants, Plant Growth Regulation, 30, 157–161.
- Serpi, Y., Topal, A., Sade, B., Soylu, S., Boyraz, N., Bilgiçli, N. ve Direk, M. 2011. Ulusal Hububat Konseyi Buğday Raporu.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinovam, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. ve Fatkhutdinova, D. R., 2003. Changes in Hormonal Status of Wheat Seedlings Induced by Salicylic Acid and Salinity, Plant Science, 164, 317–322.
- Sharma, P., Bhushan Jha, A., Dubey, R. S., ve Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, Journal of Botany, 1–26.
- Sharp, K. H. ve Raven, E., 2003. Enzyme-substrate interactions in ascorbate peroxidase, University of Leicester, Cambridge, UK, NPR.
- Siddiqui Z. S., 2013. Effects of Double Stress on Antioxidant Enzyme Activity in *Vigna radiata* (L.) Wilczek, Acta Botanica Croatica, 72, 1, 145–156.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, V. P. ve Prasad, S. M., 2014. Proline and Salinity Tolerance in Plants, Biochemistry and Pharmacology, 3, 100–170.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D. P. S. ve Sayre, R. T., 2002. Molecular Mechanism of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae, Plant Cell, 14, 11, 2837–2847.
- Soy, M., 2002. Fosforun domates (*Lycopersicon esculentum* L.) Bitkisinde Bor Toksisitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Stiles, A., Bautista, D., Atalay, E., Babaoğlu, M. ve Terry, N., 2010. Mechanisms of Boron Tolerance and Accumulation in Plants: A Physiological Comparison of the Extremely Boron-Tolerant Plant Species, *Puccinellia distans*, with the Moderately Boron-Tolerant *Gypsophila arrostil*, Environmental Science and Technology, 44, 7089–7095.
- Streb, P., Michael-Knauf, A. ve Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions, Physiologia Plantarum, 88, 590–598.
- Szafarska, K., Cvikrova, M., Kowalska, U., Gorecka, K., Gorecki, R., Martincova, O. ve Janas, K. M., 2011. Influence of Copper Ions on Growth, Lipid Peroxidation and Proline and Polyamines Content in Carrot Rosettes Obtained from Anther Culture, Acta Physiologiae Plantarum, 33, 851–859.

- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid, Trends in Plant Science, 15, 89–97.
- Tanaka, M. ve Fujiwara, T., 2008. Physiological roles and transport mechanisms of bor: perspectives from plants, Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 456, 671–677.
- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y. ve Ünalın, Ş., 2007. Changes in Photochemical and Antioxidant Enzyme Activities in Maize (*Zea mays* L.) Leaves Exposed to Excess Copper, Chemosphere, 67, 89–98.
- Terzi, H. ve Yıldız, M., 2013. Bitkilerde Ağır Metal Toksikitesi: Proteomik Yaklaşım, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 13, 2, 1-21.
- Tisdale, S. L. ve Nelson, W. L., 1983. Toprak Verimliliği ve Gübreleme (Çeviri: N. Güzel), 3. Baskı, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Adana, 900s.
- Toprak, R., 2001. Bakla (*Vicia faba* L.) Kökü Meristem Hücrelerinde Mitotik Aktivite Üzerine Borun Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Türkan, I. ve Demiral, T., 2009. Recent Developments in Understanding Salinity Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 67, 2–9.
- Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. ve Koca, H., 2005. Differential Responses of Lipid Peroxidation and Antioxidants in the Leaves of Drought-Tolerant *P. acutifolius* Gray and Drought-Sensitive *P. vulgaris* L. Subjected to Polyethylene Glycol Mediated Water Stress, Plant Science, 168, 1, 223–231.
- URL-1, Prolin Yapısı, http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Aminoasitler.html, 15 Ocak 2019
- URL-2, Primer3Plus, <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>, 20 Kasım 2018.
- Uygan, D., Çetin, Ö., 2004. Bor'un Tarımsal ve Çevresel Etkileri: Seydisuyu Su Toplama Havzası II. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eylül, Eskişehir, Türkiye, Bildiriler Kitabı: 527.
- Velthuizen, H., Huddleston, B., Fischer, G., Salvatore, M., Ataman, E. ve Nachtergaele, F. O., 2007. Mapping Biophysical Factors that Influence Agricultural Production and Rural Vulnerability, Environment and Natural Resources, 11, Rome: FAO, 9950.
- Verbruggen N., ve Hermans C., 2008. Proline Accumulation in Plants. Amino Acids 35:753–759 DOI 10.1007/s00726-008-0061-6
- Wei, Y. H. ve Pang, C. Y., 2005. The Role of Mitochondria in Human Aging Process, Biotech International, 17, 8–13.

- Wilcox, L. V., 1958. Determining the Quality of Irrigation Water. Agriculture Information Bulletin, 197.
- Yaish, M. W., 2015. Proline Accumulation is a General Response to Abiotic Stress in the Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.), Genetics and Molecular Research, 14, 3, 9943–9950.
- Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J. ve Shi, R., 2011. Comparative Antioxidative Responses and Proline Metabolism in two Wheat Cultivars Under Short Term Lead Stres, Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 733–740.
- Yılmaz, E., Tuna, A. L. ve Bürün B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri tolerans Stratejileri, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7, 1, 47–66.
- Zhao, H., Liu, J., Shi, L., Xu, F. ve Wang, Y., 2010. Development of Boron-Efficient Near Isogenic Lines of *Brassica napus* and Their Response to Low Boron Stress at Seedling Stage, Russian Journal of Genetics, 46, 1, 57–63.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y. ve Duo, L., 2010. Responses of Root Growth and Protective Enzymes to Copper Stress in Turfgrass. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52, 7–11.

ÖZGEÇMİŞ

Tez çalışmasını hazırlayan ve sunan Ahmet Gencer YEDİYILDIZ, 1977 yılında Ordu ili Aybastı ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini doğduğu şehirde tamamladıktan sonra 1996 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği programını kazandı. Bu bölümden 2000 yılında bölüm üçüncüsü olarak mezun oldu. 2002 yılında Milli Eğitim Bakanlığı'na öğretmen olarak atandı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisansa başladı. 2008 yılında yüksek lisans programını tamamladı. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim dalında doktora programına başladı. 2011-2012 yıllarında Avusturya'da Universität für Bodenkultur Wien Üniversitesin'de bir yıl süreyle Erasmus programı yaptı. Evli ve iki çocuk babasıdır.