



**BOR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN
MISIRDA (*Zea mays* L.) KİTOSANIN
İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN FİZYOLOJİK
VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**
Sakineh MOHAMMADI KOHNEH SHAHRI

Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Yavuz DEMİR
2017
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BOR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN MISIRDA (*Zea mays* L.)
KİTOSANIN İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN FİZYOLOJİK VE
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Sakineh MOHAMMADI KOHNEH SHAHRI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**BOR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN MISIRDA (*Zea mays* L.) KİTOSANIN
İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Yavuz DEMİR'in danışmanlığında Sakineh MOHAMMADI KOHNEH SHAHRI tarafından hazırlanan bu çalışma 23/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği (././.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ertan YILDIRIM

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.09.2017 tarih ve 37 / 84 nolu kararı ile
onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BOR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN MISIRDA (*Zea mays* L.) KİTOSANIN İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Sakineh MOHAMMADI KOHNEH SHAHRI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz DEMİR

Bor elementi (B); bitkiler tarafından eser miktarda ihtiyaç duyulan, eksikliği ve toksisite sınırı birbirine çok yakın bir mikro besi elementtir. Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tuzluluk, alkalilik ve bor toksisitesi kurak ve yarı kurak bölgelerde çölleşmenin temel nedenleridir. Mısır (*Zea mays* L., cv. Hido) ekonomik değere sahip doğal yetiştirme ortamı ülkemiz Karadeniz Bölgesi’dir. Fakat sıcaklığın yeterli olduğu yerlerde sulama yapılarakta yetiştirilebilir. Mısır bitkileri kontrol, bor stresi (B) ve bor+kitosan (B+Kit) ortamlarında yetiştirilerek, büyüme parametreleri (kök ve gövde uzunluğu), kuru madde ağırlığı, bağıl su içeriği, toplam çözünebilir protein, karbohidrat ve fenolik madde miktarları, prolin, klorofil, MDA, reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarı (hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-)) ve enzimatik antioksidan (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon reduktaz (GR)) aktivite ve izoenzimleri ayrıca enzimatik olmayan antioksidant (askorbat (ASA), dehidro askorbat (DHA) ve glutatyon (GSH)) miktarları bakımından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Mısır bitkileri ½ Hoagland besi çözeltisi içeren hidroponik ortamda 9 gün yetiştirildi. Dokuzuncu gün kitosan çözeltisi (%0.01) yapraklara püskürtülerek uygulandı (Kitosan A uygulaması) ve 6 saat sonra Bor (8 mM $B(OH)_3$), kökten hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilere verilerek bor stresine maruz bırakıldı. Diğer taraftan kitosan (%0.01’lik) çözeltisinde şişirilmiş tohumlar %0.01’lik kitosan çözeltisi ve ½ Hoagland besi çözeltisi içeren hidroponik ortamda 9 gün büyütüldü (Kitosan B uygulaması). Dokuzuncu gün bor (8 mM $B(OH)_3$) kökten hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilere verilerek bor stresine maruz bırakıldı. Tüm uygulamalar 72 saat sonra hasat edilerek söz konusu parametrelere bakıldı. Bor stresin de mısırın kök ve gövde uzunlukları, kuru ağırlık ve nispi su oranı, total çözünebilir protein, karbohidrat, klorofil, AsA, DHA ve CAT aktivitesi önemli derecede azalmış, buna karşı prolin, MDA, oksidantlar (O_2^- , H_2O_2), SOD, POD, APX aktiviteleri, total fenolik madde ve GSH miktarları artmıştır. Kitosan (B+K) uygulamaları ise bor stresinin verdiği hasarda söz konusu tüm parametreler bakımından iyileştirmelere neden olduğundan, Kitosanın mısırdaki bor stresinin yenilmesinde güvenilir bir kimyasal olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

2017, 113 sayfa

Anahtar kelimeler: Antioksidant enzimler, Bor toksisitesi, Mısır (*Zea mays* L., cv. Hido), klorofil, MDA, toplam karbohidrat- protein-fenolik madde.

ABSTRACT

PH.D Thesis

INVESTIGATION OF IMPROVING ROLE OF CHITOSAN ON PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR LEVELS IN MAYS (*Zea mays* L.) UNDER BORON STRESS

Sakineh MOHAMMADI KOHNMEH SHAHRI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of Botany

Supervisor: Prof. Dr. Yavuz DEMİR

Boron element (B); is a micro-nutrient element that is very close to the limit of lack and toxicity needed by plants. As in the world, salinity, alkalinity and boron toxicity in Turkey are the main causes of desertification in arid and semi-arid regions. Maize (*Zea mays* L., cv. Hido) with economic value is our Black Sea Region of natural growth medium. However, it can be grown by irrigation at places where the temperature is sufficient. Growth parameters (root and stem lengths), dry matter content, relative water content, total soluble protein, carbohydrate and phenolic content, proline, chlorophyll, MDA, the amount of reactive oxygen species (ROT) (hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\cdot -}$)) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) activity and its isoenzymes, non-enzymatic antioxidants (ascorbate (AsA), dehydro ascorbate (DHA) and glutathione (GSH)) quantities have also been studied comparatively in mays plants growing in control, boron stress (B) and boron + chitosan (B+K) conditions. Mays plants were grown for 9 days in hydroponic medium containing $\frac{1}{2}$ Hoagland solution. On day 9, the chitosan solution (0.01%) was applied to the leaves by spraying (Kitosan application A) and after 6 hours, boron (8 mM $B(OH)_3$) was exposed to boron stress by feeding in the root of plants grown in hydroponic environment. The 0.01% chitosan swelling seeds were grown for 9 days in hydroponic medium containing 0.01% chitosan solution and $\frac{1}{2}$ Hoagland solution (Chitosan application B). On day 9, boron (8 mM $B(OH)_3$) was exposed to the boron stress by being fed in the root of plants grown hydroponic environment. All applications were harvested 72 hours later and the parameters were examined. Boron stress significantly reduced root and stem lengths, dry weight and relative water content, total soluble protein, carbohydrate, chlorophyll, AsA, DHA and CAT activity. Proline, MDA, oxidants ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2), SOD, POD, APX activities, total phenolic substance and GSH levels were increased. It has been suggested that chitosan can be used as a reliable chemical in maize boron stress, since the applications of chitosan (B + Kit) causes improvements in terms of all parameters in the damage caused by boron stress.

2017, 113 pages

Keywords: Antioxidant enzymes, Bor toxicity, Maize (*Zea mays* L., cv. Hido), chlorophyll, MDA, total carbohydrate-protein-phenolic substance.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırlanan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam süresince engin bilgilerinden yararlandığım, bana her konuda sabırla destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince görüş ve tavsiyelerinden yararlandığım, bana her konuda destek veren hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya ve Sayın Arş. Gör. Ferhunde AYSİN'e çok teşekkür ederim.

Her türlü yardım ve desteğini gördüğüm çalışmalarımın en zor aşamalarında, sıkıntıya düştüğüm anlarda ve karşılaştığım tüm zorluklarda bana desteğini hiç eksik etmeyen Özlem GÜLMEZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma süresi boyunca laboratuvarıda beraber çalıştığım arkadaşlarım Ebru GENC ve Aykut KARAMAN'a ve sevgili arkadaşlarım Dr. Deniz TİRYAKİ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan AYDIN'a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca benim için hayatlarından emek veren ve her an yanımda olan babam ve anneme ve her zaman destekçilerim canım kardeşlerim Sidan, Mehdi ve Safa'ya canı gönülden teşekkür ederim.

Sakineh MOHAMMADI KOHNEH SHAHRI

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bor Bilgileri.....	4
1.2. Kitosan Bilgileri	11
1.3. Çalışmanın Amacı	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
2.1. Bitkilerde Bor Toksisitesi Çalışmaları	23
2.2. Kitosanla İlgili Çalışmalar.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	29
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	29
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	29
3.2.1. Kitosan çözeltisi	29
3.2.2. Toplam çözünebilir protein tayini çözeltileri	30
3.2.3. Pigment içeriği çözeltileri	30
3.2.4. Toplam karbohidrat içeriği çözeltileri	30
3.2.5. Prolin içeriği çözeltileri	30
3.2.6. Fenolik madde tayini çözeltileri	30
3.2.7. Lipid peroksidasyonu çözeltileri	31
3.2.8. H ₂ O ₂ içeriği çözeltileri.....	31
3.2.9. Süperoksit anyonu tayini çözeltileri	31
3.2.10. Antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu	31
3.2.11. Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler	32
3.2.12. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	32
3.2.13. Peroksidaz (POD) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler	32

3.2.14. APX aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	33
3.2.15. GR aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler	33
3.2.16. GSH içeriği belirleme çözeltileri.....	33
3.2.17. SDS PAGE çözeltileri	34
3.2.18. İzoenzimlerin çözeltileri.....	34
3.3. Yöntemler	35
3.3.1. Bitkilerin Büyütülmesi	35
3.3.2. Bitkilerin kök ve gövde uzunluklarının ölçülmesi	36
3.3.3. Kuru ağırlık tayini	36
3.3.4. Bağlı su içeriği.....	36
3.3.5. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi.....	37
3.3.6. Toplam klorofil içeriğinin belirlenmesi	38
3.3.7. Toplam karbohidrat içeriğinin belirlenmesi	39
3.3.8. Prolin miktarının belirlenmesi.....	40
3.3.9. Fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	41
3.3.10. Lipid peroksidasyon (MDA) seviyesinin belirlenmesi	42
3.3.11. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	43
3.3.12. Süperoksit anyonu (O ₂ ^{•-}) miktarının belirlenmesi.....	43
3.3.13. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	44
3.3.13.a. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	44
3.3.13.b. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	45
3.3.13.c. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi	45
3.3.13.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	46
3.3.13.e. Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi	46
3.3.14. Askorbat ve glutasyon tayini	47
3.3.14.a. Askorbat tayini	47
3.3.14.b. Glutasyon tayini	48
3.3.15. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	49
3.3.16. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile antioksidan izoenzim profillerinin belirlenmesi	50
3.3.17. İstatistik analiz.....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	52

4.1. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kök ve Gövde Uzunluğu Üzerine Etkileri.....	52
4.2. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kuru Madde ve Bağlı Su İçeriği Üzerine Etkileri	53
4.3. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kök ve Yaprakta Çözünebilir Protein İçeriği Üzerine Etkileri.....	55
4.4. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Toplam Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkileri.....	58
4.5. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Toplam Karbohidrat İçeriğine Etkileri.....	60
4.6. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Topalm Fenolik Madde ve Prolin Miktarlarına Etkileri	61
4.7. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Reaktif Oksijen Türlerinin Miktarlarına Etkileri	63
4.8. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Lipid Peroksidasyon (MDA) Seviyesine Etkileri	65
4.9. Antioksidan Enzimler	67
4.9.1. Bor ve kitosan uygulamalarının Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri.....	67
4.9.2. Bor ve kitosan uygulamalarının Katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri	69
4.9.3. Bor ve kitosan uygulamalarının Peroksidaz (POD) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri	71
4.9.4. Bor ve kitosan uygulamalarının Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri.....	74
4.9.5. Bor ve kitosan uygulamalarının Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri.....	76
4.10. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Askorbat ve Glutasyon İçeriğine Etkileri.....	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	82
5.1. Sonuç	95
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	114

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
DHA	: Dehidroaskorbik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
gr	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	: Nano mol
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksid dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TTH	: Tavuk tüyü hidrolizatı
U	: Enzim ünitesi
xg	: Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkilerde stres çeşitleri	1
Şekil 1.2. Borun fizyolojik ve moleküler hedefleri.....	8
Şekil 1.3. Kitin, kitosan ve selüloz'un yapısı	12
Şekil 3.1. Hidroponik ortamda yetiştirilen ve uygulama yapılan bitkiler.....	36
Şekil 3.2. Protein tayini için kullanılan standart grafik	38
Şekil 3.3. Toplam karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	40
Şekil 3.4. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	41
Şekil 3.5. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	42
Şekil 3.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	43
Şekil 3.7. Süperoksit anyon (O ₂ ⁻) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	44
Şekil 3.8. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	47
Şekil 3.9. Glutatyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	48
Şekil 4.1. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	53
Şekil 4.2. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kuru madde (gr) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	54
Şekil 4.3. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Bağlı su içeriği %'si üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	55
Şekil 4.4. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam çözünebilir protein içeriği (mg/g doku) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	56
Şekil 4.5. Bor toksisitesine kitosan uygulamalarının mısır bitkisinin yapraklarında protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi	57
Şekil 4.6. Bor toksisitesine kitosan uygulamalarının mısır bitkisinin köklerinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi	57
Şekil 4.7. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Toplam klorofil ve karotenoid miktarlarına (mg.g ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi.	59
Şekil 4.8. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Klorofil a ve b içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	59

Şekil 4.9. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam karbohidrat içeriğine (mg.gr ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi.....	61
Şekil 4.10. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam fenolik madde miktarı (µg.g ⁻¹) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	62
Şekil 4.11. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin prolin miktarı (µg.g ⁻¹) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	63
Şekil 4.12. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	64
Şekil 4.13. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin süperoksit anyonun (O ₂ ⁻) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	65
Şekil 4.14. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Malondialdehid (MDA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi	66
Şekil 4.15. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	68
Şekil 4.16. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	68
Şekil 4.17. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	69
Şekil 4.18. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	70
Şekil 4.19. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	71
Şekil 4.20. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Peroksidaz (POD) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	72
Şekil 4.21. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Peroksidaz (POD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	73
Şekil 4.22. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Peroksidaz (POD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	73
Şekil 4.23. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	75
Şekil 4.24. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	75

Şekil 4.25. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	77
Şekil 4.26. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Glutasyon Reduktaz (GR) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	77
Şekil 4.27. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Glutasyon Reduktaz (GR) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	78
Şekil 4.28. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin total askorbat (AsA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi	80
Şekil 4.29. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin dehidroaskorbat (DHA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi	80
Şekil 4.30. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin glutasyon (GSH) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

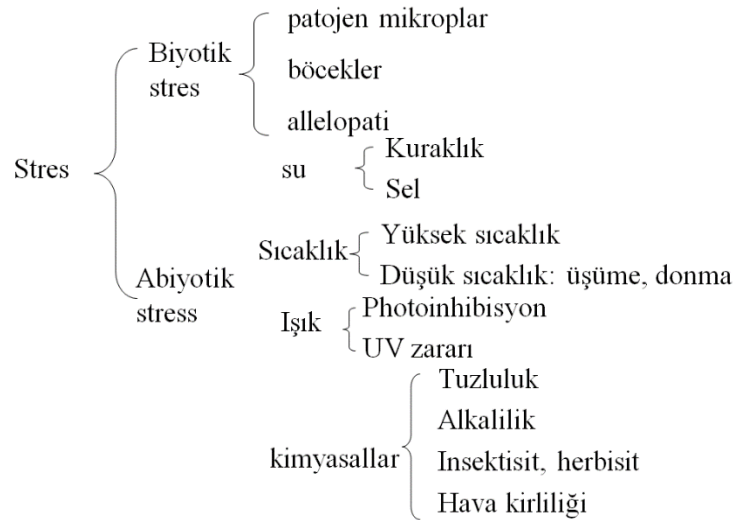
Çizelge 1.1. Çalışmada kullanılan Bor bileşiğinin özellikleri	4
Çizelge 1.2. Bazı tarla ve bahçe bitkilerinin nispi bor toleransı	10
Çizelge 1.3. Kitosanın bazı fiziksel özellikleri	13
Çizelge 1.4. Kitosanın kullanıldığı endüstriyel alanlar ve bu alanlardaki bazı uygulamaları	14
Çizelge 4.1. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	52
Çizelge 4.2. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kuru madde (gr) ve bağıl su içeriği (%) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.	54
Çizelge 4.3. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam çözünebilir protein içeriği (mg/g doku) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	56
Çizelge 4.4. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Fotosentetik Pigment miktarlarına (mg.g ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi	58
Çizelge 4.5. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam karbohidrat içeriğine (mg.gr ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi	60
Çizelge 4.6. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam fenolik madde ve prolin miktarı (µg.g ⁻¹) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.....	62
Çizelge 4.7. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) ve süperoksit anyonu (O ₂ ⁻) miktarlarına (µg.g ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi.....	64
Çizelge 4.8. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Malondialdehid (MDA) miktarına (nmol.gr ⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi.....	66
Çizelge 4.9. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	67
Çizelge 4.10. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	70
Çizelge 4.11. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Peroksidaz (POD) aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.	72

Çizelge 4.12. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	74
Çizelge 4.13. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi	76



1. GİRİŞ

Stres, bitkilerde büyüme, gelişme, verim, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar ile buna bağlı büyüme oranlarını ve ürün miktarlarını olumsuz yönde etkileyen biyotik ve abiyotik faktörlerin bitkide hasar oluşturması olarak tanımlanabilir (Levitt 1980; Jones *et al.* 1984; Bray *et al.* 2000) (Şekil 1.1). Bitkilerin stresten etkilenmesi: türe, stresin süresine ve şiddetine, gelişim safhasına, doku çeşidine, genetik adaptasyon kabiliyetine ve stres cevaplarına göre değişebilmektedir (Dubey 1994; Edreva 1998; Koca 2002; Kadioğlu 2004; Taiz and Zeiger 2005; Madhova 2005). Çevresel stres faktörleri (biyotik ve abiyotik) bitki verimini %70 oranında etkileyebilmektedir (Boyer 1982; Velthuizen *et al.* 2008).



Şekil 1.1. Bitkilerde stres çeşitleri

Stres şartlarında meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerin azaltılması veya onarılması bitkinin stresten korunma gücüne bağlıdır. Stres toleransı doku, organel ve moleküler seviyede, kimyasal ya da biyokimyasal yollarla, hormonal veya gelişim cevapları ile kalıtsal değişikliklere (genlerle bağlantılı) kadar oldukça karışık birçok olaylardan meydana gelen fizyolojik cevap mekanizmalarını içerir (Edreva 1988).

Stres, biyokimyasal reaksiyonların (anabolik ve katabolik) yavaşlamasına ve hatta durmasına neden olabilen, büyümeyi engelleyen faktörlerdir (Babaoğlu vd 2002). Bitkiler de bu strese karşı tolerans veya kaçınma (avoidans) mekanizmalarıyla stresin etkisini azaltarak yaşamlarını devam ettirmektedirler (Edreva 1998; Acar 1999).

Hücrelerde hücre döngüsü, bölünme, içzar sistemi ve vakuolleşme ile çeper yapısındaki değişiklikler strese toleransını arttırmak için temel hücresel cevaplardır. Biyokimyasal seviyede, prolin ve glisin-betain gibi ozmoregülatörlerin üretimi gibi değişiklikler bitkinin çevresel streslerden korunmasını sağlar. Stres uyarısının algılanmasıyla başlayan moleküler cevaplar bitkinin stres toleransını sağlayan genomik tepkilerdir (Taiz and Zeiger 2008).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO 2007) dünyadaki karasal alanın yalnızca %3,5'nin hiç bir çevresel stres faktöründen etkilenmediğini bildirmektedir. Ancak geriye kalan alanlarda biyotik ve abiyotik stres (tuzluluk, patojen varlığı, kuraklık, sıcaklık ve element eksikliği veya fazlalığı) gelişimi ve büyümeyi olumsuz yönde etkilemekle beraber ürün kayıplarına ve verimin azalmasına neden olmaktadır. Bitkilerde strese neden olan abiyotik faktörlerden birisi de mineral beslemedeki dengesizliktir. Bitki besin elementlerine bağlı düzensizlikler, iki farklı şekilde ortaya çıkmaktadır (Ashraf and Foolad 2007). Temel bitki besin elementi bitkinin ihtiyaç duyduğu miktarda değilse, bitkide eksiklik belirtileri besin elementi bitkinin ihtiyaç duyduğu miktarın üzerinde olduğunda ise toksisite (fazlalık) belirtileri ortaya çıkmaktadır. Dünya topraklarının %25'inin mineral maddelerin stresine maruz kaldığı belirlenmiştir. Bitkilerin büyüme ve gelişmesinde gerekli olan mineral besleyicilerin her biri için optimum değer ve aralık, her bitki türü ve kültür çeşidi için farklıdır. Bitkiler farklı mineral besin elementlerine karşı duyarlı, ya da dayanıklı olabilirler. Bu özellikler onların yaşam aralığı için her türlü şifreyi barındıran genetik yapılarında mevcuttur. Bitkilerde strese neden olan elementler daha çok topraktan alınanlardır. Bunların strese neden olmaları çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörler: Minerallerin; topraktaki miktarı ve formu, bitkilere faydalı olabilmesi için geçirecekleri kimyasal değişiklikler, absorpsiyonu ve taşınması, toprak çözeltisinin su miktarı ve pH'sı olarak bilinmektedir

(Kadioğlu 1999; Kocaçalışkan 2001).

Bitkiler, 16 farklı besin elementine ihtiyaç duymaktadırlar ve bunların her biri bitki dokularında farklı miktarlarda bulunmaktadır. Mutlak gerekli mineral elementler, bitki dokusundaki nispi konsantrasyonlarına göre makro besin maddeleri veya mikro besin maddeleri olarak sınıflandırılırlar (Sağlam vd 1993). “Makro Elementler” olarak 9 tanesi (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S), diğer 7 tanesi (Fe, Mn, B, Zn, Cu, Mo, Cl) ise “Mikro elementler” olarak kabul edilirler. Makro elementlerden olan azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), kükürt (S) ve magnezyuma (Mg), mikro elementlere göre daha fazla ihtiyaç duyulmaktadırlar (Stevens *et al.* 2002). Elementlerin tümü bitki gelişmesi için mutlak gerekli olduğunda, elementlerden bazılarının daha çok önemli olduğu şeklinde yorumlanmamalıdır. Besin elementlerinin hepsi bitki tarafından yeterince alınamadığı takdirde ürünün miktar ve kalitesi olumsuz yönde etkilenir. N, P ve K genellikle gübreler yoluyla sağlandığından, bu elementlere gübre elementleri denir. Benzer şekilde Ca ve Mg kireç ile toprağa karıştığından bu elementlere kireç elementleri adı verilir (Sağlam vd 1993).

Bitkilerde stres faktörlerinin en önemlilerinden biri olan mikro element eksikliği veya toksisitesi; metabolizmanın işlevini engellemekte ve bitkide hasarlara neden olmaktadır. Bitkiler tarafından eser miktarda gereksinim duyulan, eksikliği ve toksisite sınırı birbirine en yakın element bor’dur (Brown *et al.* 2002). Bitkiler diğer stresler de olduğu gibi fazla bor (B) ile baş edebilmek için biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarla savunmaya geçerler. Bitkilerde B stresine karşı biyokimyasal stratejiler olarak seçici iyon birikimi veya dışlanması, köklerle alınan iyonların kontrolü ve yapraklara taşınımı, tüm hücre düzeyinde veya hücresel boyutta iyonların dağılımı, uyumlu bileşiklerin sentezi, fotosentetik yolunun değişmesi, membran yapısındaki değişimler, antioksidan enzimlerin ve bitki hormonlarının uyarılması sayılabilir (Seçkin 2005).

Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tuzluluk, alkalilik ve bor toksisitesi kurak ve yarı kurak bölgelerde çölleşmenin temel nedenleridir. Çölleşme; çevresel ve insan kaynaklı olmak üzere farklı şekillerde oluşabilmektedir. Yanlış arazi kullanımı, aşırı otlatma,

orman yangınları, kentleşme, sanayileşme, erozyon, kontrol edilemeyen yabancı bitki türlerinin seçimi, tuzlulaşma (Çetin *et al.* 2006) ve bor toksisitesi (Cartwright *et al.* 1986) gibi faktörler sonucunda çölleşme meydana gelmektedir. Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, bu faktörler bireysel olarak veya birkaçı bir araya gelerek bitkisel üretimi ciddi şekilde sınırlandırmakta veya imkânsız hale getirmektedir.

1.1. Bor Bilgileri

Bor, periyodik cetvelde III-A grubunun metal olmayan tek bitki besleyici elementi olup, kimyasal sembolü B, atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81 dir (Boşgelmez vd 2001; Tariq and Mott 2007). Bor eser miktarda ihtiyaç duyulan, eksikliği ve toksisite sınırı birbirine çok yakın bir elementtir (Brown *et al.* 2002). İlk kez 1808 yılında saf element olarak elde edilmiş ancak sağlıklı bitki büyüme ve gelişmesi için gerekliliği ilk olarak 1923 yılında Warington tarafından belirlenmiştir (Emebiri *et al.* 2009).

Çizelge 1.1. Çalışmada kullanılan Bor bileşiğinin özellikleri

Kimyasal adı	Borik asit
Moleküler formülü	H ₃ BO ₃
Molar kütle	61.83 g mol ⁻¹
Erime noktası	2076°C
Kaynama noktası	3927°C
Suda çözünürlük	2.52 g/100 ml
Görünüm	Beyaz kristal katı

Yerkabuğunun yaklaşık %0.001’lik (10 ppm) bir kısmını oluşturan bor, element halde iken amorf veya kristal yapıda, suda çözünmeyen, kahverengimsi-siyah renginde ve toz şeklinde olup normal sıcaklıklarda oldukça karardır. Ekonomik öneme sahip bor kalsiyum, sodyum ve magnezyum elementleri ile hidrat bileşikleri halinde bulunur. Bor bileşikleri; tinkal (sodyum kökenli olanları, Na₂B₄O₇.10H₂O), kolemanit (kalsiyum kökenli olanları Ca₂B₆O₁₁.5H₂O), uleksit (sodyum-kalsiyum kökenli olanları

NaCaB₅O₉.8H₂O), probertit, borasit (borik asit H₃BO₃), pandemit, szyabelit, hidroborasit ve kernit'tir (Na₂B₄O₇.4H₂O) (Adriano 1986) (BOREN 2017).

Yüksek konsantrasyonda ve ekonomik düzeydeki bor kaynakları, 803 milyon ton rezervlerin yaklaşık %72'si, dünya üretiminin %32 si ve dünyanın 450-500 yıllık ihtiyacını karşılayabilecek rezervler Türkiye (Eskişehir, Balıkesir ve Kütahya'da (esas olarak Bigadiç, Sultançayırı, Kestelek, Kırka ve Emet) bulunur (Helvacı 2004; Kar *et al.* 2006), ABD, Arjantin, Rusya, Kazakistan, Çin, Bolivya, Peru ve Sili'nin kurak, volkanik ve hidrotermal aktivitesi yüksek olan bazı bölgelerinde de bulunmaktadır (Ediz ve Özday 2001). Türkiye'nin bor rezervlerinin en önemli özelliği gank maddelerinden kolayca ve basit yöntemlerle temizlenmesi ve kristal yapısında %1'den daha az yabancı maddeye sahip olmasıdır.

Toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör, B'un bitkiler tarafından alınabilirliğini etkilemektedir (Goldberg 1997). Genelde toprak pH'sı 6.3-6.5 olduğunda, bitkiler tarafından en yüksek düzeyde B alımı gerçekleşmekte, daha yüksek pH'larda ise alım keskin bir şekilde düşüş göstermektedir (Nable *et al.* 1997).

Bor ksilem vasıtası ile köklerden yapraklara taşınır ve yaprak ile gövdelerin gelişen kısımlarında depolanır. Taşınma esnasında borun bir kısmı şekerlerle ve cis-hidroksil gruplar ihtiva eden diğer bileşiklerle kolaylıkla kompleksler oluşturur. Bor fazlalığında yani daha fazla borun köklerden yapraklara taşınmasıyla toksisite oluşur. Kolaylıkla bitki hücre duvarlarında birikir, sitoplazmaya geçebilir ve toksisitesi sonucu sitoplazmik aktiviteler etkilenir. Borun difüzyonu kompleks oluşturmasından dolayı hücrede ve apoplastik bölgede etkilenir (Matoh 1997). Bitkilerde transpirasyonla su kaybı devam ettikçe, bor üst kısımlara doğru ksilemle taşınır ve bitkinin yaprak ucu, meyve gibi organlarında birikmektedir. Diğer taraftan B diğer mikro elementlerden farklı olarak, bitkide taşınımı türden türe farklılık gösteren tek elementtir (Shelp and Brown 1997).

Köklerden borun pasif alınması ve ksilem iletim borularında bitkinin tepe noktalarına

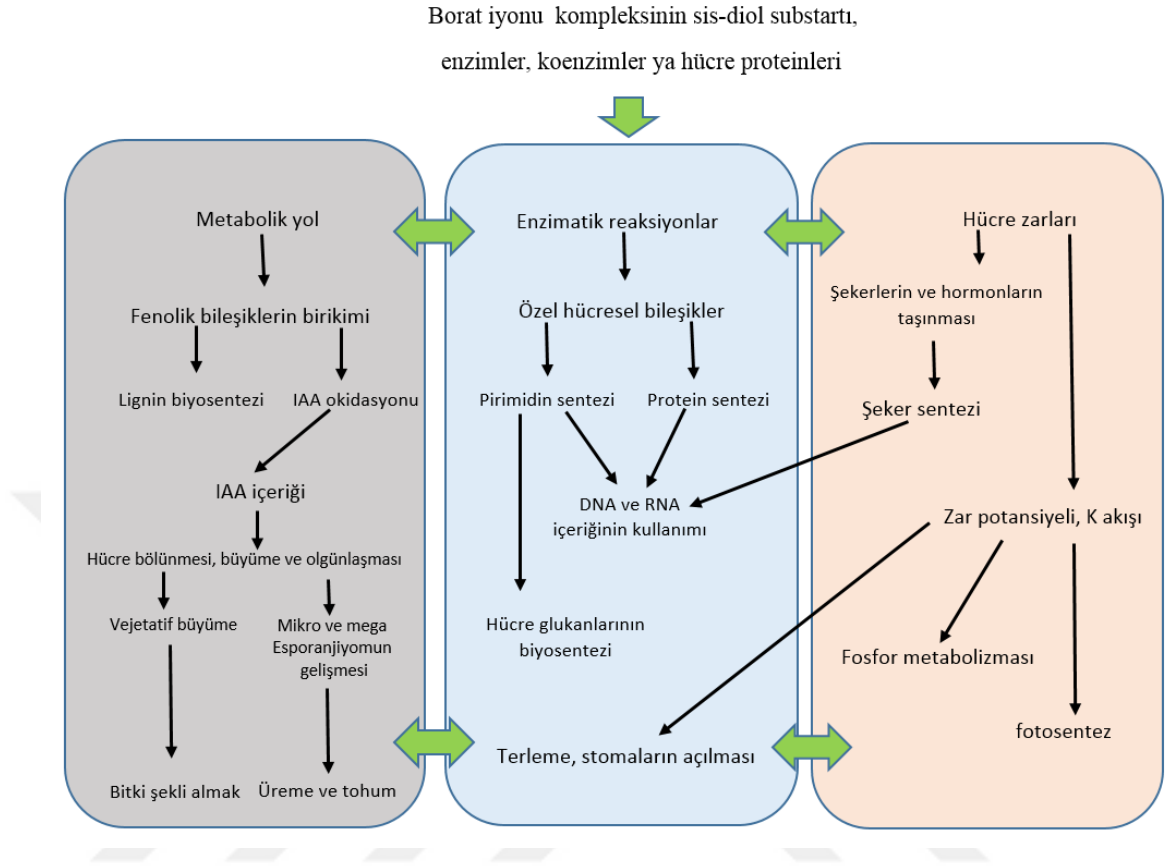
doğru taşınması, transpirasyona bağlı su alınımları ile yakından ilişkilidir (Hu and Brown 1997). Transpirasyon sırasında borun kökten gövdeye geçişinde diğer maddelerle yapacağı bileşik çeşitliliği ve membranı oluşturan sterollerin fazlalığı membrandaki B akışını azaltabildiğinden önemlidir (Brown *et al.* 2002). Bor yeterli ve fazla miktarda ortamda bulunduğu hücre membranından difüzyonla birlikte; aquaporinler ve diğer temel membran proteinleri (MIP) tarafından da alınmaktadır (Dordas *et al.* 2000). Bor'un az bulunduğu ortamlarda ise enerji harcanarak aktif B alınımları yapılmaktadır (Dannel *et al.* 1997).

Bor sadece bitkiler, algler, siyanobakteriler ve diatomeler için değil aynı zamanda gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), zebra balığı (*Danio rerio*) (Rowe and Eckhert 1999) ve kurbağa (*Xenopus laevis*) (Fort *et al.* 1998) gibi hayvanların da gelişmelerinde yeterli konsantrasyonda olmalıdır (Loomis and Durst 1992; Marschner 1995; Park *et al.* 2004).

İnsanlar için gerekli olduğu kanıtlanmasa da; faydalı olduğu bildirilmiştir. Hayvanlarda bor yoksunluğu, kalsiyum atılımında artışa neden olarak anormal kemik gelişmesi ile büyümeyi olumsuz şekilde etkiler (Devirian and Volpe 2003). Aşırı bor alımının neden olduğu akut nörolojik etkiler fare, sıçan ve köpeklerde ishal, kilo kaybı ve testiküler atrofi olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hamile dişi hayvanlarda fetal vücut ağırlığında azalmaya, kardiyovasküler bozuklukların ve iskelet malformasyonlarında artışa neden olmaktadır (Yazbeck *et al.* 2005).

Eksikliği ve toksik seviyesi arasında ince bir sınır bulunan borun bitkilerde; şekerlerin taşınmasında, protein sentezi, hücre duvarı sentezinde (Bor hücre duvar yapısında kalsiyum (Ca)'la birlikte bulunur. Hayvanlarda normal Ca beslenmesinde ve bitkiye Ca girişinde görev yapar. Hayvanlardaki kemik gelişimi ve bitkilerdeki hücre duvar gelişimi benzerdir. Bor eksikliği Ca taşınımı ve normal hücre duvarı gelişmesi ve bölünmesi, meyve ve kök ve tohum gelişmesi, ligninleşmede, çiçeklenme, polen tüplerinin büyümesi ve gelişmesi, meristematik dokuların gelişmesi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. İletken dokuların korunması, tohum uyku halinin ve bitki-su

ilişkilerinin düzenlenmesi, azot düzenlenmesi ve karbohidrat, RNA ve askorbat metabolizmasında (Parr and Loughman 1983), solunumda, hormon hareket ve etkinliğinde, nükleik asit, pektin ve ATP sentezlerinde, fenol metabolizmasında, biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli işlevlere sahiptir (Parr and Laughman 1983; Lukaszewski and Blevins 1996; Demirtaş 2004). Ayrıca hücre bölünmesi, uzaması ve nükleik asit metabolizmasında, oksin hormon (IAA) metabolizmasında, fotosentez ve birkaç enzimatik aktivitelerde (Moore 2004; Rehman *et al.* 2006; Reid 2010) gametlerin oluşumu, çiçek sterilitesinin azaltılmasında, döllemenin artırılması ve diğer elementler üzerinde düzenleyici etkilerinin olması gibi pek çok yapısal, fizyolojik ve metabolik fonksiyonlarda rol aldığı da bilinmektedir (Marchner 1995; Blevins and Lukaszewski 1998; Anonim 2008). Çoğunlukla borun hücre duvar yapısını koruyucu etkisi olabileceği (yeterli düzeyde bor içermeyen bitkilerin hücre duvarlarında belirgin şekil bozuklukları görülür), zar fonksiyonundaki etkisi ve yukarıda sözü edilen bazı metabolik aktiviteleri destekleyici rolü üzerinde durulmaktadır (Şekil 2.1) (Dordas and Brown 2000; Brown *et al.* 2002; Dannel *et al.* 2002; Läuchli 2002; Bolaños *et al.* 2004; Luis *et al.* 2004). Bor vejetatif gelişmeye göre generatif gelişmede daha büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte bor eksikliğinde kök uzaması hücre duvarı sentezi ve hücre bölünmesi ile ilişkili doğrudan kök uzaması gerilir ya da yavaşlar.



Şekil 1.2. Borun fizyolojik ve moleküler hedefleri

Bor atmosferik kaynaklardan ve tabii olaylardan (volkanik aktivite) çevreye yayılır. Deniz kökenli tortul kayalarda, deniz balçıklarında, göl veya sel alanlarındaki birikintilerde, sıcak su kaynaklarında ve volkanik arazilerden çıkan sularda daha fazla oranda bor bulunmaktadır (Ermiş 2002). Kurak ve yarı kurak bölgelerde yüksek miktarda B içeren suların, sulama suyu olarak kullanılması topraktaki B fazlalığının diğer bir nedenidir. Gübrelemenin normalden fazla uygulandığı tarım alanlarındaki topraklarda da B artabilmektedir. Kirlenmiş sular, B maden işletmelerinden çıkan atıklar ve uçucu küller topraktaki B fazlalığına neden olan diğer kaynaklardır (Nable *et al.* 1997). Suda bulunan borun en büyük etkisi tarım üzerinde görülmektedir. Borun içme ve kullanma suyunda, su ürünleri üzerinde ve hayvan sulamasında da çeşitli zararları saptanmıştır (Niemi 1991). Bor, fazla bulunduğu zaman bitkilerin gelişmesi için gerekli olmasına rağmen son derece zararlıdır.

Toprakların elverişli bor miktarının toprak özelliklerine bağlı olarak değiştiği ve özellikle toprak tuzluluğu, sodyum ve organik madde miktarı arttıkça elverişli bor miktarının da çok önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir (Gezgin *et al.* 2002). Topraktaki çözünabilir borun çoğunluğunu borik asit (H_3BO_3) oluşturmaktadır. Borik asit, toprakların çoğunda görülen pH sınırları içinde dissosiyasyon olmadığı için, toprak kolloidlerine bağlanamaz ve hızla yıkanarak toprağın alt horizonlarına doğru inmektedir. Kurak bölge topraklarında ise, bor üst toprak horizonlarında birikir ve toksik konsantrasyon değerlerine kadar çıkar (Boşgelmez *et al.* 2001). Çözünabilir bor konsantrasyonu dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde bor toksisitesinin oluşmasında önemli bir rol oynar (Loomis and Durst 1992). Bor toksisitesi genellikle düşük yağış alan bölgelerde kurak yıllarda meydana gelir. Bor topraklarda çözünabilir, hareketliliğinden dolayı bitki kökleriyle kolayca alınabilir. Ortamda bor konsantrasyonu yüksek olduğunda hücreye borun girişi kolaydır (Wimmer *et al.* 2003). Borun pH ya bağımlılığı ve ilişkili bileşiklerden dolayı, bor sitoplazmada ligantlarla kompleks yapan boratlara dönüşür. Piridin nükleotid koenzimleri (NAD^+), ATP, RNA ve birkaç şeker bor bağlayan moleküllerdir ve fonksiyonları değişir veya hücrede enzim aktivitesini değiştirir (Ralston and Hunt 2000).

Bor genç yapraklara taşınmaz ve toksisite septomları daha çok orta ve yaşlı yapraklarda görülür. Bor toksisitesi septomları genelde yaprak yanması, yaprak uçlarında nekrosiz (ölü doku) ve yaprak ayası boyunca nekrotik veya klorotik lekeler, yanma, yarılmalar, olgunlaşmamış yapraklarda ise dökülme ve büyümenin yavaşlaması ile verimin azalmasına neden olur. Nekrotik ve klorotik zarar borun konsantrasyonu ile değişebilir. Ayrıca, bor toksisitesinin zararları ilk olarak kökte meydana gelebilir. Toprakta bor konsantrasyonu yüksek olduğunda fazla bor yapraklarda daha fazla biriktiğinden toksik etki bitki köklerinde görülmez (Nable *et al.* 1997).

Bora tolerans ve toksisitesinin mekanizması net açıklanamamıştır. Ancak bitkilerde fazla borun salgılanması ve tolerans bor toksisitesine toleransın fizyolojisi olarak açıklanmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonu metabolizmada önemli değişikliklere sebep olur (Shkolnik 1974). Bitkilerde köklerden fazla borun salgılanması, gövdelerde

translokasyonun azaltılması ve yüzeysel kök sisteminden ziyade köklerin daha derine gönderilmesi bor toleransına karşı bitkilerde mevcut direnç mekanizmalarıdır (Nable 1988; Paull *et al.* 1992). Ayrıca, bitki genotiplerinde membran yapılarının farklılığı borun pasif taşınmasını da etkilemektedir. Bora tolerant türler fazla boru salgılayarak, içsel B konsantrasyonunu azaltır ve ksilemlerinden daha düşük bor bulundurdıklarından gövdede bor birikimini azaltırlar (Nable 1988).

Bitkilerin bora ihtiyaçları türlere ve genotiplere göre farklılık gösterir, bir tür için toksik olan değer diğer bir çeşit için gerekli olabilir (Blevins *et al.* 1998). Çizelge 1.2. bazı tarla ve bahçe bitkilerinin nispi bor toleransını göstermektedir (Keren and Bingham 1985).

Çizelge 1.2. Bazı tarla ve bahçe bitkilerinin nispi bor toleransı

Toleranslı (2-4 mg B/L)	Kısmen Toleranslı (Yarı-Toleranslı) (1-2 mg B/L)	Kısmen Duyarlı	Duyarlı (0.3 mg B/L kadar)
Havuç	Arpa	Brokoli	Fasulye
Şekerpancarı	Mısır	Havuç	Elma
Yonca	Patates	Salatalık	Avokado
Pamuk	Lahana	Bezelye	Üzüm
Süpürge darısı	Kereviz	Biber	Greyfurt
Yulaf	Kabak	Patates	Limon
Pancar	Sarı yonca	Kırmızı turp	Portakal
Domates	Şalgam		Buğday

Bor toksisite belirtileri; büyüme ve gelişmenin indirgenmesi, CO₂ fiksasyonunun azalması ve yaprak alanı kaybından dolayı fotosentezin engellenmesi, nekrozis ve klorozisten dolayı azalan yeşil yaprak alanı sonucu fotosentez oranının düşmesidir. Bitkilerde büyüme gerileri, yaprak sayısı azalır ve fenolik maddelerin oluşmasından dolayı kökler kontrolüne göre daha fazla kahverengileşir. Bor stresinden korunmak için

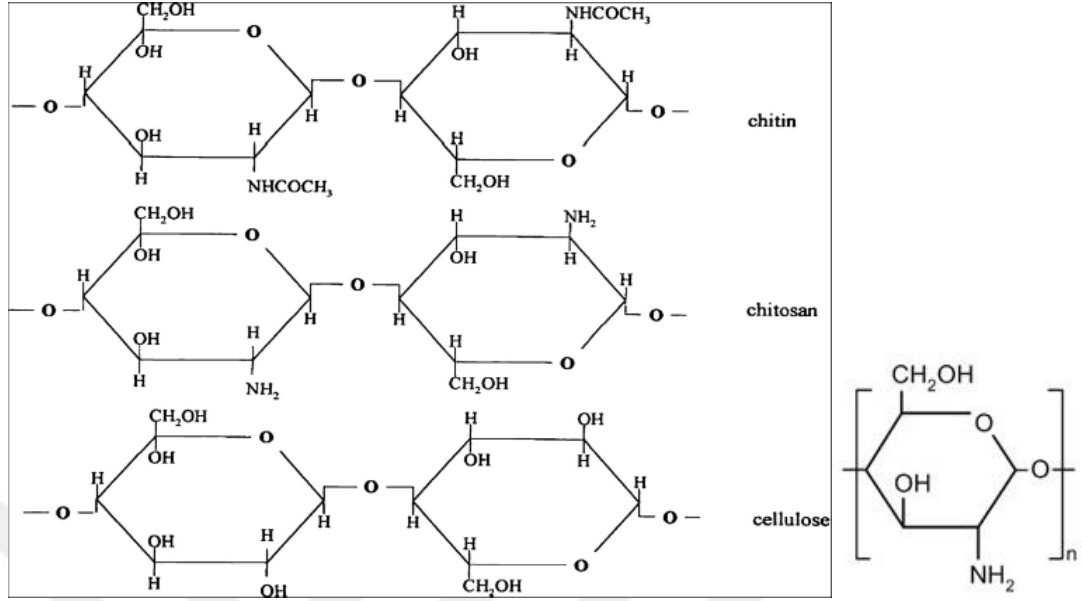
bitkilerde bazı gen ekspresyonları ve protein yapısı değişmektedir. Tolerans mekanizmasına sahip bitkilerde strese dayanıklılık sağlayan yeni proteinler (Örneğin vakuoler proton pompası ATPaz alt birimi E proteini) sentezlenir.

B'un bitkilerde toksisite oluşturmalarıyla ilgili kabul edilen mekanizmalar: hücre duvarı gelişiminin engellenmesi, ATP, NADH veya NADPH gibi ribozlu yapılara bağlanarak önemli metabolik aktivitelerin engellenmesi ve serbest şekerlerdeki veya RNA'daki ribozlara bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişiminin engellenmesidir (Ralston and Hunt 2000). Ayrıca, yapraklarda aşırı miktarda biriken B'un transpirasyon akım yönündeki ozmatik dengesizliklerin oluşması da kabul edilen diğer bir sebeptir (Stagoulis and Reid 2002; Reid *et al.* 2004).

1.2. Kitosan Bilgileri

Dünya genelinde, büyük miktarlardaki deniz ürünleri (yengeç ve karides kabuğu) biyolojik atık olarak çevreye salınmaktadır. Özellikle çevresel duyarlılığın artmasıyla atıkların yeniden değerlendirilmesi sonucu, atıklar çürümeye bırakılmak yerine, çeşitli kimyasal veya biyolojik metotlarla değerlendirilmekte ve yeni ürünlere dönüştürülmektedir. Bunların başını kitin (Kitin üretimi yaklaşık 150×10^3 ton (Guang 2002) ve türevi kitosan çekmektedir. Kitosanı ilk kez 1811 de Henri Bracannot keşfetmiştir (Beaulieu 2005).

Kitosan (poli- $[\beta-(1,4)-2\text{-amino-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$) (50-2000 kDa) tabiatta selülozdan sonra en çok bulunan doğal bir biyopolimer olan kitinin (poli- $[\beta-(1,4)-2\text{-asetamid-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$) deasetillenmesinden elde edilebileceği gibi, kabuklu canlıların kabuklarının ekstrakte edilmesi ile de elde edilebilir. Günümüzde, kitosan sahip olduğu birçok önemli özellikten dolayı; ilaç salımı, yara iyileştirme, kozmetik, kâğıt endüstrisi, tarım, gıda, implantasyon, atık su arıtımı, ve gen terapi uygulamaları gibi farklı endüstrilerde etkin olarak kullanılmaktadır (Enescu 2008). Bitkiler glokozamin ve kitin polimerlerini sindirmek için β -glukonaz ve kitinaz enzimlerine sahiptirler (Mauch *et al.* 1988).



Şekil 1.3. Kitin, kitosan ve selüloz'un yapısı

Sellüloz, kitin ve kitosan, glukozun β -1-4 polimerleri olup, doğada en çok bulunan polimerlerdir (Yin *et al.* 2010). Kitosan ve selüloz arasındaki yegane fark C-2 hidroksil grubu ($-\text{OH}$) yerine amin grubunun ($-\text{NH}_2$) bağlanmasıdır. Kitin ile selüloz arasındaki yegane fark ise; C-2 hidroksil grubu yerine asetamido (NHCH_3CO) grubunun bağlanmasıdır (Çizelge 1.3). Oldukça küçük kitosan parçacıkları hazırlanarak belirlenen Kitosanın özellikleri; suda çözünmeyen, inorganik asitler içerisinde çözünürlüğü oldukça düşük ve asidik ortamlarda ($\text{pH} < 6.5$) (asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler en çok kullanılan çözgen asetik asittir) oldukça iyi çözünür (Demir ve Seventekin 2009). Protein, lipit ve birçok biyolojik olarak aktif maddeyle bağlanabilir, katyonik bir polimer olduğundan negatif yüklü polimerlerle (alginat gibi) ağ veya matris oluşturabilir. Aynı zamanda su ve yağ bağlama kapasitesi oldukça yüksek, toksik olmayan, biyoyumlu (hyalüronik asit, mukopolisakkaritler gibi vücuttaki önemli fonksiyonel karbohidratlarla), biyobozunur, asit giderici, yenilenebilir, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal gibi biyolojik etkilere sahiptir. Çözmek için zararlı organik çözücüler kullanılmaması ve etkisini arttırmak için kitosan mikro ve nano`parçacıklarının hazırlanması da oldukça kolaydır. Ayrıca metal iyonları ile şelatlaşarak bunların atık sulardan veya kirli akıntılardan yok edilmesini de sağlar (Akın 2009). Kitosan parçacık boyutunun azalmasıyla özellikle

antimikrobiyal, antifungal, antitümör ve antibakteriyel olarak daha da iyi etki ettiği belirlenmiştir (Qi *et al.* 2004a).

Çizelge 1.3. Kitosanın bazı fiziksel özellikleri

Özellik	Deger
Molekül ağırlığı	50-2000 kDa
DD (Deasetilasyon derecesine)	%40-100
Viskozite	< 2000 mPaS
Su bağlama kapasitesi	%450-1150
Yağ bağlama kapasitesi	%314-535
Yığın yoğunluğu	0.06-0.39 g/cm ³
Renk	Donuk sarı-beyaz
Çözünürlük (Asidik ortamda suda)	pH<6.5

Kitosanın endüstriyel kullanım alanları ve bazı uygulama şekilleri Çizelge 1.4’de verilmiştir (Gökçe 2008; Akın 2009).

Çizelge 1.4. Kitosanın kullanıldığı endüstriyel alanlar ve bu alanlardaki bazı uygulamaları (Demir ve Seventekin 2009)

Endüstriyel Alan	Uygulama
Atık su temizlenmesi	Metal iyonlarının uzaklaştırılması, Protein, Boya, Aminoasit, Organik bileşikler tutulması
Su arıtma işlemi	Gıda prosesleri, Meşrubat / İçme suyu
Çevrede	Radyoaktif atıkların uzaklaştırılması
Tarımsal alanda	Tohum kaplama, Suni gübre, Toprağa kimyasal salınımın kontrolü Böcek öldürücüler, Parazit öldürücüler
Kağıt sanayinde	Yüzey iyileştirme, Fotografik kâğıt, Kaplama ve fiber
Gıda endüstrisinde	Besleyici ilaçlar, Boyar maddenin uzaklaştırılması, İçeceklerin temizlenmesi, Besin koruması, Renk dengesi, Koku ve tat dengesi, Besin dengesi, Yiyecek katkısı, Besin zar dokusu yapısı,
Biyoteknolojik alanda	Protein ayrılması, Enzim sabitlemesi, Hücre geri kazanımı, Kromatografi, Hücre sabitlemesi
Kozmetik alanda	Nemlendirici, Saç bakımı, Cilt bakımı, Ağız bakımı, Banyo losyonu
Zar sistemlerinde	Geçirgenlik kontrolü, Ters osmoz
Ürün ayrıştırması ve geri kazanımı	Membran ayırımı, Koagülasyon, Kromatografik kolonlar, Kapsülleme adsorbentleri
Biyomedikal	Yara iyileştirici olarak, Kanser tedavisinde, Kemik iyileştirici olarak, Cerrahi estetik dikişlerde, Diş tedavisinde, Kontrollü ilaç salınımında, Göz tedavisinde (kontakt lens), Kan pıhtılaştırma ilacı olarak, Eczacılıkta

Deasetilasyon derecesi (%5-8- azot içeriğini), molekül ağırlığı, çözünürlüğü, viskozitesi ve rengi kitosanın özelliklerini etkiler. Kitosanın kitine göre avantajları; kitini dimetilasetamid ve lityum klorür gibi toksik çözgenlerle çözünmesine karşı kitosan zararsız seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesi ve aktif serbest amin

gruplarına sahip olmasıdır. Selüloza göre azot içeriği yüksek olan kitin ve kitosan özellikle atık sularda metal bağlayıcı (şelatlama maddesi) olarak kullanılmaktadır (Akin 2009).

Arıtma işlemlerinde ve besin işleme proseslerinde (salınan atık sularda bulunan asılı haldeki boyar madde, aminoasit, protein, organik madde vs. gibi maddeler geri kazanılması) kitosanın şelatlaşma özelliği zaman tasarrufu ve yüksek geri kazanım sağlar. Metal iyonlarıyla şelatlanarak bunların atık sulardan veya kirli akıntılardan uzaklaşmasını sağlar. Kitosanın yapısındaki amino ve karboksilik grupları uranyumun atık nükleer sulardan adsorplanmasında da kullanılmaktadır (Palanisamy 2004).

Kitosan uygulanan bitkilerde, DNA hasarı, kromatin değişikliği (Hartney *et al.* 2007; Hadwiger 2008), sitosolik Ca^{+2} 'de artış (Zuppini *et al.* 2003), MAP-kinazların aktivasyonu (Yin *et al.* 2010), oksidatif patlama (Paulert *et al.* 2010), kallos apozisyonu (Kohle *et al.* 1985), patojen ile ilgili olan (PR) mRNA gen ve PR protein sentezi (Loschke *et al.* 1983), fitoaleksinlerin birikimi, hypersensitive cevaplar (HR) (Iriti and Faoro 2009) ve bazı sistemlerde jasmonik asit (JA) ve absisik asit (ABA) sentezi ve H_2O_2 birikimi rapor edilmiştir (Lin *et al.* 2005; Iriti and Faoro 2009).

Kitosanın tohuma ince selofan tabakası şeklinde kaplandığında tarıma faydalı olabileceği belirlenmiştir (Hadwiger 1989; Hadwiger 1999). Eğer kitosanın pH'sı 7.0'ın altında kalırsa, tohumu çevreleyen toprak nemi kitosanın çözünebilirliğini korur. Kitosan ilk antifungal ve antimikriyal etkisini tohum yüzeyinde gösterir. Sonradan kitosan tohumun kabuğundan içine girer ve bitki metabolizmasını etkiler (Hadwiger 1984).

İlk olarak 1979 da, kitosanın fungal patojenlere karşı antimikrobiyal inhibisyon aktivitesi, rapor edilmiştir (Allan *et al.* 1979). Hücre duvarlarında kitosanı bulunduran *Mucor rouxii* gibi funguslar da vardır (Kafetzopoulos 1993). Kitosanın *F. solani*'de hem RNA hem de DNA sentezini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Hadwiger *et al.* 1986).

Kitosan uygulaması serbest oksijen türleri üzerinde de etkiye sahiptir. ROT ürünlerinin çeşitli bitki-patojen etkileşimleri arasındaki ilişkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Bolwell and Daudi 2009). Kitosanın etkisi, stomal boşlukların kapanması ile ROT artışını azaltarak ortaya çıkar (Lee *et al.* 1999). Kitosan fasulye hücrelerinin süspansiyon-kültüründe direkt 1.3 β -D-glucan enzimi sentezini aktive ederek, kallus oluşumunu uyarmıştır. Bu enzimin Ca^{+2} ye bağlı olduğu belirlenmiştir (Kohle *et al.* 1985).

Kitosan terlemeye karşı bir madde olarak da birçok tarımsal üründe (Khan *et al.* 2002; Karimi *et al.* 2012) ve bitkiyi oksidatif strese karşı korumada da kullanılmaktadır (Farouk *et al.* 2008). Kitosanın biber, turp ve salatalıkta büyümeyi arttırdığı ve meyve kalitesini yükselttiği belirlenmiştir (Farouk *et al.* 2008; Ghoname *et al.* 2010).

Kitosan ile uyarılmış *Mimosa pudica* bitkisinin kısa sürede verdiği cevaplar plasma membran zarı düzeyinde araştırılmıştır. Bu amaçla trans-membranın bioelektriksel değişim potansiyeli *Mimosa pudica* bitkisinin motor hücrelerinde izlenmiştir. Çoğu durumda, bir uyarıcı uygulandığında Ca^{+2} ve H^{+} 'nın girişi ve Cl^{-} ve K^{+} 'ın çıkışı, iyon kanallarının aktivasyonu ile membranda hızlı bir depolarizasyonun tetiklendiği belirtilmiştir. Pulvinar dokusunda bathing medium ortamında, pH değişikliği ve membran vezikülleri üzerinde olan etkisi ölçülerek, kitosanın ilk etki alanının, plasma zarındaki H^{+} -ATP az üzerinde olduğu belirlenmiştir (Amborabe *et al.* 2008).

1.3. Çalışmanın Amacı

Poaceae familyasının önemli bir tahılı olan mısır (*Zea mays* L.) , Türkiye’de Karadeniz Bölgesinde doğal olarak yetiştirilir ve aynı zamanda sıcaklığın yeterli olduğu bölgelerde de sulama yapılarakta yetiştirilebilmektedir. Ekonomik değerinden dolayı (yağ sanayisinde) ve geniş adaptasyon kabiliyeti ve yüksek verim potansiyelinden dolayı sulama imkanı sağlanarak Akdeniz, Karadeniz, Marmara ve Ege bölgesinde de oldukça fazla yetiştirilmektedir (Süzer 2004). Besi değerinden (nişasta, glukoz ve mısır özü yağı) dolayı mısır hem insan (%35) hem de hayvan yiyeceği (%50’si) bakımından

oldukça önemlidir (Gençtan *et al.* 1995). Hayvan yemi, çerez ve kâğıt hamuru gibi ürünlerin üretiminde kullanılır. Mısır orta derecede bor stresine dayanıklı olmasına rağmen Türkiye'deki toprakların (özellikle Eskişehir, Kütahya ve Balıkesir) aşırı bor ihtiva etmesi mısır tarımını sınırlandırmaktadır. Bir C4 bitkisi olan mısır, entansif tarım alanlarının geliştirilmesinde oldukça önemli ve birim alanda yüksek tane ürünü ve kuru madde üretir.

Çalışmada B stresinde yetişen mısırın büyüme (kök-gövde uzunluğu ve kuru ağırlığı), MDA, prolin, protein, total klorofil ve karetenoid, total fenolik madde, total karbohidrat, O_2^- (superoksit) ve H_2O_2 (hidrojen peroksit) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi, önemli antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POX, APX ve GR) ve izoenzimleri ve enzimatik olmayan antioksidanların (askorbat ve glutatyon gibi redoks bileşenlerinin miktarları (askorbat (ASC) / dehidroaskorbat (DHA) ve glutatyon (GSH) / glutatyondisülfid (GSSG) okidasyon miktarı) miktarlarındaki değişimler B stresinin derecesi olarak belirlendi ve kitosanın B stresini yenmedeki etkisi söz konusu parametreler üzerinden karşılaştırmalı olarak tespit edildi.

Bu amaç için kitosanın toksik olmaması, biyoyumluluğu (hyalüronik asit, mukopolisakkaritler gibi vücutta önemli fonksiyonel karbohidratlarla) ve biyobozunurluğu, antimikrobiyal, antioksidan, antibakteriyel ve antifungal biyoetkilerinin varlığından dolayı şu ana kadar strese karşı uygulanan zararlı kimyasallar yerine kullanılması uygun bulunmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerde strese karşı verilen tepki; stresin süresine, şiddetine, stresten etkilenmiş olan bitkilerin gelişim aşamasına, doku tipine ve streslerin etkileşimlerine bağlıdır (Koca 2002). Bitkilerde stresten korunma mekanizmaları, bitki dokularında stres faktörlerinin azaltılmasıyla ve ya önlenmesi ile yön bulmaktadır. Strese tepki olarak bitkilerde; yaprak ayasının ve kutikulanın kalınlığı, stomaların büyüklüğü ve sıklığı değişebilir (Acar 1999). Bitkilerde strese tolerans mekanizması; doku ile organel düzeyinde moleküler seviyede ortaya çıkar ve oluşan stres etkisinin azaltılmasını veya tolere edilmesi ile gerçekleşir (Edreva 1998).

Bitkilerde stres faktörlerinin en önemlilerinden birisi besi elementlerinin eksikliği veya toksisitesidir. Bu stres şartlarında metabolizmanın işlevleri engellenir ve bitkide çeşitli zararlar meydana gelebilmektedir. Bor bitkiler tarafından eser miktarda ihtiyaç duyulan, eksikliği ve toksisite sınırı birbirine çok yakın olan bir elementtir (Brown *et al.* 2002).

Bitkiler yüksek ışık yoğunluğu, aşırı sıcaklık, kuraklık, yüksek tuzluluk herbisit uygulaması ve mineral elementlerin eksikliği ya da fazlalığı gibi çevresel stres şartlarına maruz kaldığında, ROT üretimi ve antioksidanların yatıştırıcı aktiviteleri arasındaki dengenin bozulması genelde oksidatif zararlar sonucudur (Wise and Naylor 1987; Mittler 2002). Mevcut veya teşvik edilen antioksidantların yüksek seviyelerine sahip bitkilerin oksidatif zarara daha fazla direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (Dhindsa and Matowe 1981; Wise and Naylor 1987; Foyer and Shigeoka 2011). Bor stresi de çoğu diğer iyon streslerinde olduğu gibi, süperoksitler, hidroksil ve peroksiradikaller gibi ROT oluşumuna neden olduğundan oksidatif strese neden olur. Hiperozmotik ve iyonik streslerin ürünleri olan ROT'lar membran zararlarına ve hücre ölümüne neden olurlar (Bohnert and Jensen 1996). Bitkilerde genellikle askorbat peroksidaz (APX), Glutasyon redüktaz (GR), Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) gibi Halliwell-Asada çemberinde bulunan enzimleri ve Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Guaiakol peroksidaz (POD) gibi teşvik edilen antioksidan enzimler ROT'lara karşı savunmaya geçer (Melgar *et al.* 2009).

Antioksidant enzimlerin sinergistik fonksiyon yapması bitkilerin stres şartlarında hayatta kalabilmeleri için hayati öneme sahiptir. Yüksek Bor stresi altında antioksidant enzimlerin aktivitelerinin arttığına dair bir çok bilgi mevcuttur (Gunes *et al.* 2006; Cervilla *et al.* 2007; Eraslan *et al.* 2007; Ardic *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011). Bitki dokularında (sitoplazma, endoplazmik retikulum, vakuol ve mitokondri) bol bulunan glutatyon (GSH); glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly)'den oluşan, düşük moleküler ağırlığına sahip bir tiol tripeptid olup, γ -Glu-Cys-Gly formülü ile gösterilir. Bitki dokularında milimolar konsantasyonlarda bulunan GSH, ya serbet bir tiyol grubuna sahip idirgenmiş formda (GSH) ya da benzer iki molekül arasında bir disülfid bağıyla oksitlenmiş formda (GSSG) bulunur. Cys'nin bulunması, kimyasal aktivitesi ve GSH'nin tiyol gruplarının (-SH) suda yüksek çözünürlüğü GSH'nin biyolojik özelliklerini oluşturur ve bu özelliklerinden dolayı, değişen çevresel streslere karşı büyüme, gelişme ve bitki cevaplarının ayarlanmasını içeren çok birçok fonksiyonların yerine getirilmesinde kritik bir metabolittir (Anjum *et al.* 2010; Noctor *et al.* 2011; Noctor *et al.* 2012). Bitkilerde mevcut askorbat-glutatyon (AsA-GSH) yolu ROT'un etkili bir şekilde uzaklaştırılmasında/metabize edilmesinde esastır ve böylece stres altında bitkilerdeki hücresel hemeostazinin muhafazasında önemlidir. AsA-GSH yolu ROT'un çoğunu etkili bir şekilde elemine eden redoks özelliğine sahip metabolitleri ve önemli enzimleri içeren reaksiyonlar ağının anahtar bir parçasıdır. Böylece bitkilerde ROT ile oluşturulan oksidatif zararı önler (Noctor and Foyer 1998; Aravind and Prasad 2005; Anjum *et al.* 2010). Enzimatik olmayan antioksidantlar arasında, glutatyon tripeptidi (GSH, glutamat-sistein-glisin) ROT ve/veya ROT'un bitkilerde oksidatif zararı teşvik eden reaksiyon ürünlerine karşı en önemli hücre içi savunma olarak kabul edilir (Anjum *et al.* 2010, 2011a,b; Gill and Tuteja 2010). Prolin yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunur ve çevresel streslere cevapta büyük oranda biriktirilir (Hsu *et al.* 2003; Kavi Kishore *et al.* 2005). Stres şartlarında, ozmotik düzenleme için bir osmolit olarak görev yapmasının yanında, prolin hücre bileşenlerinin yapısını stabilize etmek (örneğin; membranlar ve proteinler), serbest radikallerin zararsızlaştırılması ve hücresel redoks potansiyelinin tamponlanmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda protein uyumlu hidrotop olarak (Srinivas and Balasubramanian 1995), sitoplazmik asiditenin giderilmesinde ve metabolizma ile uyumlu uygun NADP+/NADPH oranlarının korunmasında görev yapar (Hare and Cress 1997). Stresin rahatlaması üzerine prolinin

hızlı yıkılması, stres teşvikli zararın giderilmesi ve stresten iyileşmesi için ATP oluşması ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu destekleyen yeterli indirgeyici ajanlar da sağlayabilir (Hare and Cress 1997; Hare *et al.* 1998). Sınırlı tarımsal alanlarda, strese neden olan olumsuz çevre şartlarına karşı bitkisel üretimde verimliliği arttırmak önemlidir. Bu da stres şartlarına dayanıklı bitkilerin seçilmesi veya ıslah edilmesidir. Bu nedenle bitkilerin strese tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. Stres şartlarında bitkilerde oksidatif zararlanmalar meydana gelmekte ve stres şartlarına dayanmak (tolerant) veya stresten kaçmak (avoidance) için bitki türlerinde mevcut mekanizmalar birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Bazı bitkiler abiyotik stres şartlarından daha şiddetli etkilenirken bazıları ise direnç göstermektedir. Savunma mekanizmaları arasında görülen bu farklılıklar bitki türleri arasında hatta aynı bitkinin farklı çeşitleri arasında da görülebilmektedir (Güneş *at el.* 2002).

Bitkilerde bor toksisitesinde meydana gelen ROT ürünleri bitkinin fizyolojik aktivitelerinde değişimlere sebep olmaktadır. Bitkilerde temel bileşenlerden biri olan oksijen; moleküler oksijenin (O_2) suya (H_2O) indirgenmesi ile bitkiler için enerji kaynağı oluşturmaktadır. Oksijenin indirgenmediği durumlarda ise biyolojik molekülleri okside edebilme gücüne sahip reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilir (Seçkin 2005). Bu ROT'lardan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-) radikalleri, hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) ve tek değerlikli oksijen (O_2) türleri bitkilerde kloroplastlarda, mitokondrilerde ve peroksizom'larda meydana gelen oksidatif reaksiyonlarla üretilmektedirler. Moleküler oksijen (O_2) oldukça kararlı bir yapıya sahip olmasına rağmen, hayati reaksiyonların rastlanabilir bir sonucu olarak veya streslerin teşvikiyle oluşan bir madde olarak, koruyucu mekanizmaların işlev görmediği durumlarda, sadece bitkilerin değil, herhangi bir aerobik organizmanın hücre yapı ve işlevlerine bile zarar verebilmektedir (Demiral 2003).

Bitkiler ROT ürünlerini zararlı etkilerinden korunmak için son derece gelişmiş ve karmaşık bir antioksidant sistemine sahiptirler. Bu sistem sayesinde bitkilerde antioksidant enzimler ve düşük moleküler ağırlıktaki antioksidantlar meydana

gelebilmektedir (Allen 1995). Antioksidant savunma sistemi; aerobik canlılarda ROT ürünlerini enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları ile zararsız hale getirerek, hücreleri oksidatif hasarlara karşı koruyabilmektedir. Enzimatik olmayan antioksidantlar olarak; prolin, sistein, glutatyon, C ve E vitaminleri, flavanoidler, bazı alkaloidler, karotinoidler ve ksantofiller gibi maddelerdir. Enzimatik antioksidantlar ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir (Halliwell and Gutteridge 1989; Bowler *et al.* 1992).

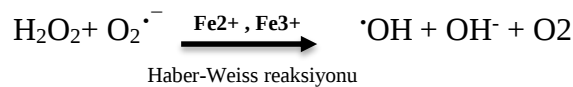
Süperoksit dismutaz; süperoksitin oksijen ve H₂O₂'ye dönüşümünü gerçekleştirir. Süperoksit radikali kimyasal olarak çok kararsız bir moleküldür. Bu radikal hücrede olan Fe³⁺ ve Cu²⁺ metal iyonlarını indirgeyerek kararlı hale geçebilir.



Tilakoid zarlarında bulunan ve metalloenzim yapıya sahip süperoksit dismutaz, serbest oksijen radikallerinin, H₂O₂ ve O₂'ne dönüşümünü kataliz eden antioksidant savunma sisteminin en önemli enzimidir. Bu aşamada süperoksit radikali etkisiz hale getirilmezse hidroksil radikali ([•]OH) oluşur (Bowler *et al.* 1992).



Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının az miktarlarda bulunduğu ortamında, Haber-Weiss reaksiyon yoluyla süperoksit ve hidrojen peroksitin tepkimeye girmesiyle, hidroksil radikalleri oluşabilmektedir (Bowler *et al.* 1992).



Bu aşamadan sonra oluşan H₂O₂ katalaz, peroksidazlar, askorbatglutatyon döngüsü

enzimleri aracılığıyla uzaklaştırılmaktadır (Foyer *et al.* 1994; Fridowich 1998).

Bitkilerde genellikle peroksizomlarda ve glioksizomlarda bulunan ve savunma mekanizmasında görev alan bir diğer enzim ise CAT'dır; Fotorespirasyon ya da glioksizomlarda yağ asitlerinin β oksidasyonu sırasında oluşan H_2O_2 'i su ve oksijene katalizleyerek zararı düşük seviyeye indirmekle görevlidir (Lazarow and Fujuki 1985).

Peroksidazlar, biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde etkili oldukları gibi çevresel streslere cevapla da ilişkilidirler (Matamoros *et al.* 2003). Kloroplastlarda bulunan peroksidaz grubundan askorbat peroksidaz; askorbat-glutasyon döngüsünde, askorbik asiti elektron vericisi olarak kullanır ve H_2O_2 'i suya indirger (Bowler *et al.* 1992). Oluşan reaksiyon sırasında askorbat, askorbat peroksidaz enzimi tarafından monodehidroaskorbata (MDHA) okside olur. MDHA, NAD(P)H bağımlı monodehidroaskorbat redüktaz enzimi tarafından askorbata dönüştürülerek ortamdaki askorbat miktarı sabit düzeyde tutulur (Asada 1992; Foyer *et al.* 1994). MDHA'nın yeniden askorbata dönüşmesi, indirgenmiş ferrodoksin aracılığıyla PS-I tarafından gerçekleşebilir. Enzimatik olmayan bir başka yolda ise iki molekül monodehidroaskorbat, askorbat (AsA) ve dehidroaskorbata (DHA) dönüşebilmektedir.

Dehidroaskorbat (DHA); dehidroaskorbat redüktaz enziminin katalizlediği glutasyonun yükseltgenmesiyle askorbata dönüştürülür. Bu yolla, indirgenmiş glutasyon (GSH), dehidroaskorbat redüktaz aktivitesi ile okside glutatyona (GSSG), bu da glutasyon redüktaz enzimi (GR) tarafından tekrar indirgenmiş forma, GSH'ye, dönüştürülmektedir (Asada 1992). Glutasyon metabolik düzenleyici ve antioksidant olarak birçok role sahip olması ile glutasyon disülfite'e (GSSG) okside olmaktadır (Noctor and Foyer 1998). Glutasyonun antioksidant özelliği GSH'deki, tripeptidin SH grubunun SSG'deki disülfite oksidasyonuna bağlıdır (Smith *et al.* 1988). Okside olmuş glutasyonun (GSSG), GSH'a indirgenmesi GR enzimi tarafından NADPH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir (Foyer and Halliwell 1976). Reaksiyonlar sonucunda, hidroksil radikalının varlığı ortamda azalır ya da oluşumu engellenir (Madhava and Sresty 2000).



2.1. Bitkilerde Bor Toksisitesi Çalışmaları

Sardunyada B toksisitesinde bitkiler bodurlaşmış, yapraklar küçülmüş ve yaprak kenarlarında nekrozis gözlenmiştir (Lee *et al.* 1996).

Domateste (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Lale) bor toksisitesi (10 ve 20 mg kg⁻¹) yaş ve kuru ağırlığı önemli derecede azaltmıştır (Güneş *et al.* 2000).

Arpanın toleranslı ve hassas çeşitlerinde borik asit (10 mM) uygulamasının kök ve gövde de bazı protein miktarlarını azalttığı, bazılarını ise artırdığı belirlenmiş ve toleranslı çeşitte yeni bir proteinin varlığı tespit edilmiştir. Toleransta bazı proteinlerin etkin olabileceği belirtilmiştir (Mahboobi *et al.* 2000).

Mısırın (*Zea mays* L.) dayanıklı türlerinde az miktarda hassas türlerde ise daha fazla bor biriktiği belirlenmiştir (Güneş *et al.* 2000).

Avrupa orjinli arpa genotipleri bor toksisitesine hassas, Suriye ve Ortadoğu kaynaklı arpaların orta derecede, İran ve Afganistan kaynaklı arpaların ise dayanıklı oldukları belirlenmiştir (Yau 2002).

Kivi bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada B konsantrasyonunun 20 µM'dan 50 µM'a çıkarılması ile fotosentetik oran ve interselüler CO₂ konsantrasyonu maksimum seviyeye çıkmıştır. B konsantrasyonları 100 µM, 200 µM, 500 µM'a çıkarılan deneme gruplarında ise fotosentez oranında ve interselüler CO₂ konsantrasyon miktarında değişiklik olmamıştır. Çalışmada denenen farklı B konsantrasyonlarının stomal iletkenlik üzerinde önemli bir etkisi gözlenememiştir (Sotiropoulos *et al.* 2002).

Bor toksisitesinin portakal ve mandalina yapraklarında sünger parankiması kalınlığında

azalmaya ve bazı arpa çeşitlerinde ise çimlenmeye toksik etki ettiği belirlenmiştir (Ermiş 2002; Papadakis *et al.* 2004 a,b.).

B toksisitesi altındaki dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinde prolin miktarının hem kök hem de yaprak dokularında %30-%60 oranında arttığı, dayanıklı ve duyarlı arpa çeşitlerinde ise kontrole göre azaldığı saptanmıştır (Karabal *et al.* 2003).

Hassas arpa çeşitlerinde toleransın yüksek olduğu çeşitlere göre daha fazla (kökte %50, ksilemde %64, yaprakta %73) bor biriktiği rapor edilmiştir (Hayes and Reid 2004).

24 gün süreyle kontrollü çevre şartlarında yetiştirilen Ayçiçeği (*Helianthus annuus* cv. Sanbro) bitkilerine farklı gelişim evrelerinde 10, 25, 100 ve 500 μ M B içeren besin çözeltileri uygulanmış ve vejetatif büyümenin, B eksikliği veya toksikliğinden etkilenmediği görülmüştür (Ortaca 2005).

Bor stresine karşı dayanıklılık dereceleri bilinmeyen; iki nohut (*Cicer arietinum* L.) kültür formuna (kuraklığa toleranslı Gökçe ve kuraklığa duyarlı Küsmen 99) 100 mM ve 400 mM B toksisite uygulaması sonucunda; Gökçe ve Küsmen 99 nohut çeşitlerinde SOD, APX ve prolin miktarlarında artış; POX miktarlarında ise azalma belirlenmiştir. Gökçe nohut çeşitinde CAT ve GR miktarında artış; Küsmen 99 nohut çeşitinde CAT ve GR miktarında azalma belirlenmiştir (Ardıç 2006)

Gunes *et al.* (2006) asma bitkisinde (*Vitis vinifera* L.), bor toksisitesinin (0, 10, 20 ve 30 mg kg⁻¹) antioksidanlara ve stomalara verdiği tepkileri araştırmışlardır. Toksik düzeylerde bor uygulamalarının bitki yaprak ve köklerinde bor konsantrasyonunu önemli derecede azalttığı; anacın yaprak, gövde, kabuk ve köklerinde uygulanan bor konsantrasyonlarına bağlı olarak artış gözlenildiği; borun asma yapraklarında akümüle olduğu belirtilmiştir. Aşırı bor alınımında özellikle de 20 ve 30 mg kg⁻¹ B uygulamalarında, yaprakların stoma direncinde artış gözlendiğini, bor toksikliği sonucunda membran permeabilitesi, MDA ve H₂O₂ konsantrasyonlarında artış, prolin ve lipoksigenaz aktivitesinde azalış gözlenmiştir.

Cervilla *et al.* (2007), iki farklı domates çeşidine 0.05, 0.5 ve 2 mM bor uygulayarak; yapraklarda bor toksisitesi sonucunda, MDA ve H₂O₂ içeriğinin ve askorbat konsantrasyonunu her iki çeşitte de artış gösterdiği belirtilmiştir. Askorbatın ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin de bu artışa neden olduğu belirtilmiştir. Yüksek bor konsantrasyonuna sahip domates yapraklarında orta derecede oksidatif zararlanmaların olduğu gözlenirken, antioksidan enzim aktivitelerinde genel olarak bir artış olduğu belirlenmiştir. Özellikle, bor toksisitesinin bazı enzim aktivitelerini ve düşük seviyede askorbatı artırmakta olduğu belirtilmiştir.

Bor toksisitesi uygulanan arpa bitkisinde silikonun iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Uygulanan silikonun MDA, H₂O₂, prolin, SOD ve CAT gibi parametreler üzerindeki değişimlere bakılarak oksidatif hasarı azalttığı ve bor stresine karşı bitki toleransını artırdığı belirlenmiştir (İnal *et al.* 2009).

Bor kirliliğinin *Zea mays* L. (mısır) bitkisi üzerine morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkileri incelenmiştir. Bor toksisitesinin etkileri: yaprakta morfolojik bozukluklar, yaş ve kuru ağırlıklarda azalma, kök ve gövde uzunluğunun azalması, total protein miktarında artış, yaprak nispi nem içeriğinde artış ve antioksidan enzimlerden SOD ve APX enzimlerinde önce artış daha sonra azalma, CAT enziminde azalma şeklinde gözlenmiştir (Özel 2011).

Bor stresi altındaki mung fasulyesine oksidatif hasar ve antioksidantlar üzerindeki etkileri araştırılmış ve bor stresi kökenli olan bu hasarlar silikon ve salsilik asit uygulanarak azaltılmaya çalışılmıştır (Muhammad and Shaheed 2012).

Patates bitkisinin 6 çeşidinde bor toksisitesine karşı antioksidan enzimler (SOD, GR, APX, CAT), MDA, askorbat ve glutatyon miktarındaki değişimler belirlenmiştir. Bu araştırma da bor stresinin AsA, DHA ve MDA miktarını artırdığı ve SOD, GR, APX, CAT aktivitelerini azalttığı tespit edilmiştir (Ayvaz *et al.* 2015).

2.2. Kitosanla İlgili Çalışmalar

Hidroponikte yetiştirilen salatalık bitkilerinde patojenlere karşı kitosan uygulaması yapılmıştır. Glukonaz enziminin aktivitesi PAGE ile araştırılmıştır ve kitosanın bitki savunma sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Kitosanın *Pythium aphanidermatum*'ye karşı bitki savunma sistemini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (El Ghaouth *et al.* 1994).

Kitosan Vanadyum (V) toksitesine karşı fasulye, pirinç, buğday ve arpa bitkilerinde uygulanmıştır. Buğday ve arpa bitkisi Vanadyum toksitesine karşı pirinç ve fasulyeden daha hassas olduklarına rağmen, tüm fideler 2.5 µg/ml V (VCl₃) konsantrasyonunda hasar gördükleri belirlenmiştir. Bu hasar radyasonu indirgeyen kitosan (radiation-degraded chitosan) uygulanarak azalmıştır (Xuan *et al.* 2001).

Boonlertirun *et al.* 2008 yılında pirinç bitkisine kitosan uygulayarak, büyüme üzerinde tetiklici etkisinden dolayı verimi arttığını tespit etmişler.

Domates bitkisinde kitosan uygulamasının etkileri araştırılmış. Yaş ve kuru ağırlık, pigment içeriği gibi parametreler ve verime olan etkileri incelenmiştir. Kitosanın bu parametreleri arttırarak, bitki büyümesini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Tantawy 2009).

Guan *et al.* 2009'da kitosan çözeltisinin %0.25, %0.50 ve %0.75 (w/v) konsantrasyonları 15°C sıcaklık şartları altında soğuğa duyarlı ve soğuğa dayanıklı iki çeşit mısır bitkisi üzerinde uygulayarak tohum çimlenmesi, büyümesi ve fizyolojik değişiklikleri araştırılmıştır. Çimlenme süresince kitosan uygulandığında çimlenme yüzdesi üzerinde önemli bir etki göstermiştir ve çimlenme indeksini artırmıştır. Ortalama çimlenme suresi azaltılmış ve sürgün yüksekliği artmıştır. Her iki mısır çeşidinde de kök uzunluğu ve sürgün ve kök kuru ağırlıkları artmıştır. Her iki çeşit mısır fidelerinde kitosan uygulandığında plazma membranın geçirgenliği ile ilişkili olan MDA miktarında azalma ve çözünebilir şeker ve prolin miktarının artış, POD ve CAT

aktivitesinde de artış saptanmıştır.

Bittelli *et al.* (2011) kitosan püskürtmesinin biber bitkilerinde transpirasyonu azalttığını ve biyomas üretimini ve verimi muhafaza etmek için kullanılan su miktarının azaldığını rapor etmişlerdir.

Kitosan uygulamasının etkisi fasülye bitkisinde araştırılmıştır. Büyüme ve klorofil içeriğindeki etkileri incelenerek, kitosanın kök ve göve uzunluğunda ve yaşve kuru madde üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu açıklanmıştır (Sheikha 2011).

Kuraklık stresi altındaki Hint yağı bitkisinde kitosan püskürtmesinin etkileri araştırılmış. Stres altındaki bitkilerin kitosan uygulamasıyla toplam protein ve karbohidrat miktarı ve prolin miktarlarındaki değişimler incelenmiştir. Bu incelenmenin sonucu olarak kuraklık stresinde prolin ve karbohidrat miktarındaki artış kitosan uygulamasıyla azalmıştır. (Karimi *et al.* 2012)

Mondal *et al.* (2012) kitosan püskürtmesinin bamya bitkisinin büyüme ve verimine olan etkisini araştırmışlar. Kitosanın büyüme parametrelerini arttırdığını ve verimi arttıran konsantrasyonlarını belirlemişler.

Boonreung ve Boonlertnirun (2013) tarafından yapılan bir çalışmada çeltik bitkilerinde hastalık kontrolünde kitosanın iyileştirici etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Mahdavi ve Rahimi 2013 yılında Kitosanla muamele edilmiş Ajowan (*Carum copticum*) tohumlarının tuz stresi altında verdikleri tepkiler araştırılmıştır. Sonuçlar, %0.2'lik kitosan konsantrasyonunun diğer uygulamalardan daha etkili olmasıyla birlikte, kontrole oranla bütün kitosan konsantrasyonlarının çimlenme yüzdesi, çimlenme oranı, tohum canlılık indeksi, hipokotil ve radikula uzunluğu ve kuru ağırlığını artırdığını gösterdi. Tuzluluk; çimlenme yüzdesi, fide uzunluğu, kök uzunluğu, fide ve kök kuru ağırlık ve nispi su içeriğinde önemli bir azalmaya sebep olurken, kitosan tuz toksisitesini iyileştirmiştir.

Kitosanın etkisi süsen bitkisinin çiçeklenme, büyüme ve soğanı üzerine etkisi araştırılmış. Bu çalışma farklı ağırlıklarda kitosan kullanılarak yapılmıştır (Salachna and Zawadzińska 2014).

Zerdeçal bitkisine kitosan çözeltisi püskürterek gövde uzunluğu, yaş ağırlık ve curcumin etken meddesinde artışa neden olduğunu saptamışlardır (Sathiyarayanan and Sathiyabama 2016).



3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: NUAIRE
Elektroforez	: BIORAD
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependrof, Axigen
pH metre	: Seven Compact
Kuru blok inkübatör	: Allsheng
Sıcak su banyosu	: WiseBath Fuzzy Control System
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Görüntüleme cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Sigma-Aldrich şirketlerinden temin edilmiştir. Çalışmada Yengeç kabuğu (Crab shells) kökenli kitosan kullanıldı.

3.2.1. Kitosan çözeltisi

Stok çözelti olarak %0.5'lik kitosan %0.5'lik glasiyal asetik asit içersinde hazırlandı ve

pH sı KOH ile 5.6 ya ayrlandı, %0.01 olarak seyreltildi.

3.2.2. Toplam çözünebilir protein tayini çözeltileri

- 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75): 3.4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.75'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- BCA reaktifi: 15 ml Bicionchonic asit 0.3 ml CuSO_4 ile karıştırılır.

3.2.3. Pigment içeriği çözeltileri

- Homojenizasyon çözeltisi için 20 ml saf suya 80 ml aseton ilave edilerek %80'lik aseton hazırlanır.

3.2.4. Toplam karbohidrat içeriği çözeltileri

- 2.5 N HCl 35 ml için 7.25 ml HCl alınır üzeri 35 ml'ye tamamlanır.
- Antron çözeltisi için: 200 mg antron 100 ml soğuk %95'lik sülfirik asit içerisinde çözünür.

3.2.5. Prolin içeriği çözeltileri

- %3'lük sülfosalisilik asit 0.3 gr sülfosalisilik asit 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- Asit ninhidrin hazırlanışı 1.25 gr ninhidrin 30 ml glasiyal asetik asit ve 20 ml fosforik asit içerisinde çözünür.

3.2.6. Fenolik madde tayini çözeltileri

- 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75): 3.4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.75'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

- %20 lik Na_2CO_3 çözeltisi için 20 gr sodyum karbonat tartılıp 100 ml suya tamamlanır.

3.2.7. Lipid peroksidasyonu çözeltileri

- %0.1 lik TCA-trikloroasetik asit: 100 ml saf su içerisine 0.1 gr TCA ilave edilerek homojenizasyon çözeltisi hazırlanır.
- %0.5'lik TBA-tiobarbutirik asit: 100 ml saf su içine 20 gr TCA çözünür ve daha sonra içerisine %0.5 TBA ilave edilerek reaksiyon çözeltisi olarak hazırlanır.

3.2.8. H_2O_2 içeriği çözeltileri

- %0.1 lik TCA-trikloroasetik asit: 100 ml saf su içerisine 0.1 gr TCA ilave edilerek homojenizasyon çözeltisi hazırlanır.
- 10 mM KH_2PO_4 için 0.136 gr potasyum fosfat tartılarak 100 ml suya ilave edilip, pH sı 7 ye ayarlandı.
- 1 M KI çözeltisi için 8.3 gr KI tartılıp 50 ml suda çözünür.

3.2.9. Süperoksit anyonu tayini çözeltileri

- 60 mM KH_2PO_4 0.081 gr KH_2PO_4 bir miktar suda homojenizasyon çözeltisi olarak çözünür. pH 7.8'e ayarlanır ve son hacim 10 ml'ye tamamlanır.
- 10 mM hidroksilamin 0.0069 gr hidroksilamin 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- 17 mM sülfamid 0.029 gr sülfamid 10 ml saf suda çözünür.
- 7 mM naftilamin 0.01 gr naftilamin 10 ml saf su içerisinde çözünür.

3.2.10. Antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu

- 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75), %1 PVP, 1 mM EDTA: 3.4 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH: 6.75'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250

ml'ye tamamlanmış ve üzerine 2.5 gr PVP ve 0.073 gr EDTA ilave edilmiştir.

3.2.11. Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8): 1.7 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözünmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanır ve tampon çözelti olarak kullanılır.
- 13 mM metionin çözeltisi: 0.586 gr metionin alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözünür.
- 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür: 0.0128 gr NBT alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözünür.
- 1 mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit): 0.073 gr EDTA alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözünür.
- 13 μM riboflavin: 0.019 gr riboflavin, 500 ml saf suda çözünmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınmıştır.

3.2.12. Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 103.5 mM KH_2PO_4 (pH: 7.5), 1.41 gr KH_2PO_4 , 70 ml saf suda çözünerek, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 40 mM H_2O_2 : 346 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak substrat çözeltisi olarak hazırlanmıştır.
- 5 mM H_2O_2 çözeltisi: 43 μl %35'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik için hazırlanmıştır.

3.2.13. Peroksidaz (POD) aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: (5.5): 3.55 gr Na_2HPO_4 alınarak 200 ml saf suda çözünmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 5 mM guaikol + 5 mM H_2O_2 : 54 μl guaikol ve 15 μl H_2O_2 'dan (d: 1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözünerek Peroksidaz

aktivitesi ölçümünde substrat çözeltisi olarak hazırlanmıştır.

3.2.14. APX aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 50 mM KH_2PO_4 için 0.17gr potasyum fosfat tartılır ve pH sı 6.75 ayarlandıktan sonra 250 ml ye tamamlanır. 20 μM askorbik asit için 0.0225 gr ve 5mM hidrojen peroksit için 100 μl ve 0.2 mM EDTA olarak 0.0147 gr katılarak çözeşti tamamlanır.

3.2.15. GR aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 0.25 mM NADPH çözeltisi hazırlamak için: 0.0022 gr NADPH 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) 0.0061 gr GSSG, 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- 0.5 mM EDTA 0.0014 gr EDTA 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- 50 mM Tris-HCl 0.06 gr Tris bir miktar saf su içerisinde çözünür, sonra pH:7.8'e ayarlanır ve son hacim 10ml'ye tamamlanır.

3.2.16. GSH içeriği belirleme çözeltileri

- %5'lik TCA 1 gr TCA 10 ml saf su içerisinde homojenizasyon için çözünür.
- 200 mM Na_2HPO_4 0.238 gr Na_2HPO_4 bir miktar saf su içerisinde çözünür ve pH:7.5'e ayarlanır. Son hacim 10 ml ye tamamlanır.
- 50 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.186 gr $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 10ml saf su içerisinde çözünür.
- 2 mM $\beta\text{-NADPH}$ 0.016 gr 10 ml saf su içerisinde çözünür.
- 6 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) 0.023 gr saf su içerisinde çözünür.

3.2.17. SDS PAGE çözeltileri

- Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 akrilamid, %2.7 bis): 29.2 gr akrilamid 75 ml saf suda çözünür, çözeltiye 0.8 gr bis katılıp çözünür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, pH: 8.8): 18.15 gr tris 50 ml saf suda çözünür. HCl ile pH: 8.8'e ayarlanır. Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris, pH: 6.8): 3 gr tris 40 ml saf suda çözünür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.
- %10 SDS: 1 gr SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözünür.
- %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı): 0.05 gr amonyum persülfat son hacim 500 µl olacak şekilde saf suda çözünür.
- Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0.2 bromfenol mavisi pH: 6.8): 2.5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır, pH: 6.8'e ayarlanır. Karışıma 0.02 gr bromfenol mavisi katılarak karıştırılır. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C'de saklanır.
- Tank tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH: 6.8) : 3 gr Tris, 14.4 gr glisin, 1 gr SDS alınır. 900 ml saf suda çözünerek pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- Boyama substrat çözeltisi (SOD izoenzimleri için) (0.24 mM NBT, 33.2 µM riboflavin, %0.2 TEMED, 1 mM EDTA, 0.05 M KH₂PO₄ pH 7.8): 0.0098 gr NBT, 100 µl TEMED, 0.147 gr EDTA, 0.345 gr KH₂PO₄ 40 ml saf suda çözünüp pH: 7.8'e ayarlanır. 1 ml saf su içerisinde 0.0062 gr riboflavin çözünür ve 100 µl'si boyama substrat çözeltisine katılır. Çözeltinin son hacmi 50 ml'ye saf su ile katılır.

3.2.18. İzoenzimlerin çözeltileri

- 1 mM EDTA, 0.05 M KH₂PO₄ pH 7.8 (SOD izoenzimleri için): 0.147 gr EDTA, 0.345 gr KH₂PO₄ 40 ml saf suda çözünüp pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

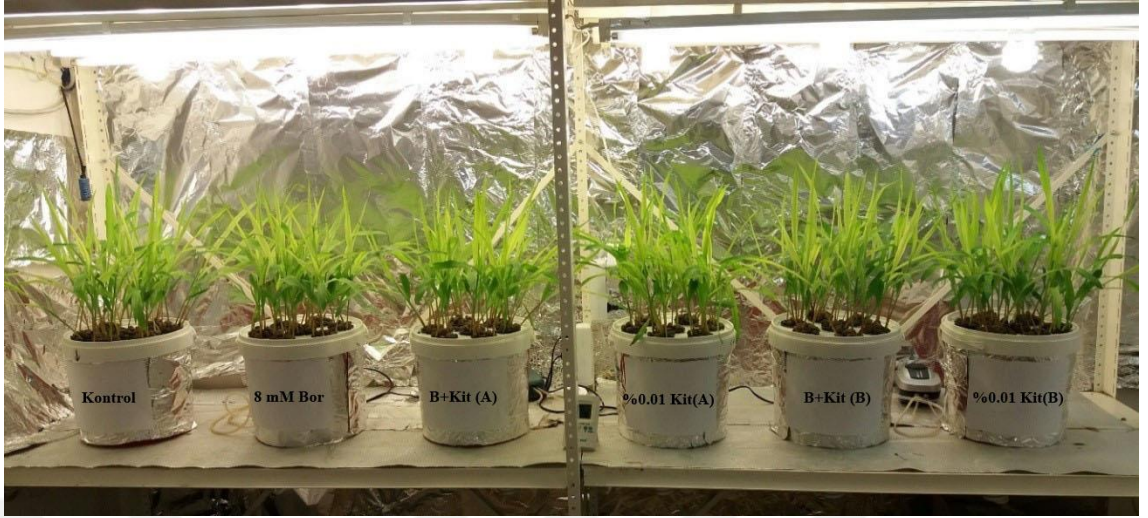
- 2 mM askorbik asit, 50 mM Na₂HPO₄ (APX izoenzimleri için): 0.0352 gr askorbik asit, 1.34 gr Na₂HPO₄ 80 ml saf suda çözünür ve pH 7'ye ayarlanır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.
- 4 mM askorbik asit, 2 mM H₂O₂, 50 mM Na₂HPO₄ (APX izoenzimleri için): 2mM askorbid asit çözeltisinden 50 ml alınır üzerine 0.0176 gr askorbik asit ve 10 µl %35 H₂O₂ katılıp iyice karıştırılır.
- 28 mM TEMED, 2.4 mM NBT, içeren 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.8) tamponu (APX izoenzimleri için): 105 µl TEMED, 0.0491 gr NBT, 0.335 gr Na₂HPO₄ 20 ml saf suda çözünerek pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 25 ml'ye saf su ile tamamlanır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Mısır bitkileri (*Zea mays* L. cv. Hido) 1/2 Hoagland besi çözeltisi içeren hidroponik ortamda 9 gün yetiştirildi (Şekil 3.1). Dokuzuncu gün kitosan çözeltisi (%0.01) yapraklara püskürtülerek uygulandı (Kitosan A uygulaması) ve 6 saat sonra Bor (8 mM B(OH)₃), kökten hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilere verilerek bor stresine maruz bırakıldı. Bitkiler 72 saat (3 gün) sonra hasat edilerek kök-gövde uzunlukları ölçüldükten sonra yapraklar ve kökler gerekli biyokimyasal analizler için – 80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

%0.01'lik kitosan çözeltisinde şişirilmiş tohumlar %0.01'lik kitosan çözeltisi ve 1/2 Hoagland besi çözeltisi içeren hidroponik ortamda 9 gün büyütüldü (Kitosan B uygulaması). Dokuzuncu gün 8 mM bor kökten hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilere verilerek bor stresine maruz bırakıldı. Bitkiler 72 saat (3 gün) sonra hasat edilerek kök-gövde uzunlukları ölçüldükten sonra yapraklar ve kökler gerekli biyokimyasal analizler için – 80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Hidroponik ortamda yetiştirilen ve uygulama yapılan bitkiler

3.3.2. Bitkilerin kök ve gövde uzunluklarının ölçülmesi

Bitkilerin kök ve gövdeleri, birleşme yerlerinden büstürü yardımı ile kesilerek uzunlukları milimetrik cetvel yardımı ile ölçüldü. Kökler ölçülürken ana kökün uzunluğu esas alındı (Bozcuk 1978). Uygulamalara ait kök ve gövdelerin uzunlukları ayrı ayrı toplanıp, bitki sayısına bölünerek ortalama kök ve gövde uzunluğu cm/bitki olarak hesaplandı.

3.3.3. Kuru ağırlık tayini

Kök-gövde uzunlukları ölçülen, her gruptan toplam 3 bitki alındı ve aliminyum-foil parçalarının üzerlerine konarak pastör fırınında 60°C’de 72 saat boyunca kurutulup sonra tekrar tartılarak her bir uygulamaya ait organların kuru ağırlıkları hesaplandı.

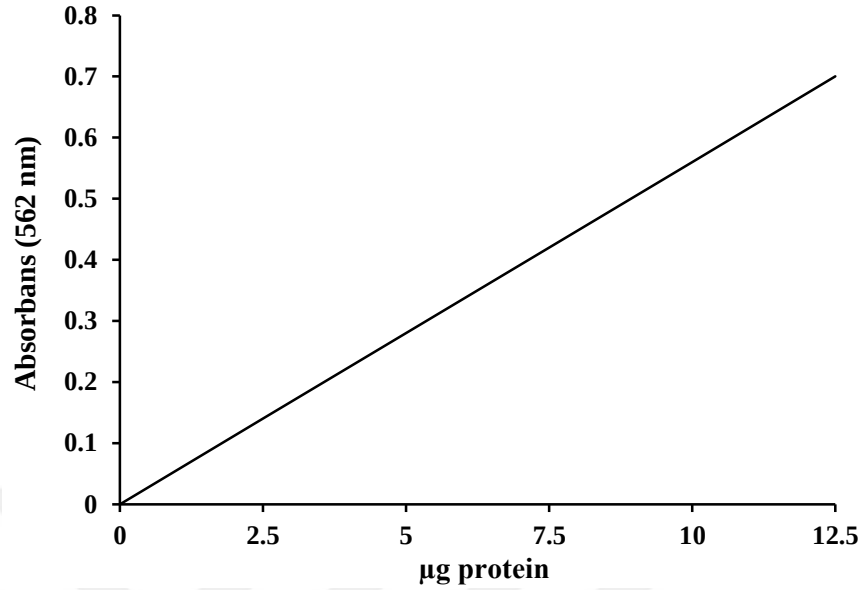
3.3.4. Bağlı su içeriği

Hasat edilen mısır bitkilerinin her gruptan 2.5 gr yaş ağırlık tartılıp 60°C’ye ayarlı olan etüve yerleştirilerek 72 saat bekletilerek ağırlıklarının sabitlenmesi beklenildi.

Ağırlıkları sabitlenen örnekler tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenip her gruptaki bitkilerin yapraklarındaki nispi su içeriği Barrs and Weatherly (1962) göre hesaplandı.

3.3.5. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi

Mısır bitkisinin yaprak ve köklerinden alınan 0.2 gr'lık taze örnekler kullanılarak Smith *et al.* (1985) metoduna göre protein tayini yapıldı. Sonuçlar mg protein/g taze doku cinsinden hesaplandı. Bitkilerin, sıvı azot yardımı ile öğütülmüş kök ve yapraklarından 0.2 gr alınarak 2 ml 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 6,75) havanda ezilerek homojenize edilip 15.000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edildi. Bitki organlarından elde edilen özütlerden 5 µl alınıp, 0.2 ml BCA reaktifiyle karıştırılıp, 65°C'de 15 dk. bekletilip, 562 nm'de absorbansları ölçüldükten sonra standart grafikten yararlanarak, 5 µl özütteki protein miktarları belirlendi. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 µg protein içeren hacimler plate'de ki kuyucuklara aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 12 µl'ye tamamlandı. Bu tüplere 0,2'şer ml de BCA (bicionchonic asit + FeCl₃) reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 0.2 ml BCA reaktifi kullandı. Plate 65°C'de 15 dk. bekletildi. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edildi. Sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları µg protein/g doku olarak tayin edildi. (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.3.6. Toplam klorofil içeriğinin belirlenmesi

Mısır bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham *et al.* (1971) tarafından verilen prosedür uygulandı. Mısır bitkisinden alınan yaprak örneklerinden 0.2 gr olacak şekilde tartılıp, %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim 10 ml tamamlanarak homojenize edildikten sonra homojenat filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yaprak dokusunun 1 gr'da bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları mg/doku olarak hesaplandı.

$$\text{mg/klorofil a/g doku} = ((12.7 \cdot (D_{663}) - 2.69 \cdot (D_{645})) \cdot (V/1000 \cdot W))$$

$$\text{mg klorofil b/g doku} = ((22.9 \cdot (D_{645}) - 4.68 \cdot (D_{663})) \cdot (V/1000 \cdot W))$$

$$\text{mg toplam klorofil/g doku} = ((20.2 \cdot (D_{645}) + 8.02 \cdot (D_{663})) \cdot (V/1000 \cdot W))$$

$$\text{mg toplam karotenoid / g doku} = (4.07 \cdot D_{450}) - (0.0435 \cdot \text{kl a miktarı} + 0.367 \cdot \text{kl b miktarı})$$

Eşitliklerde;

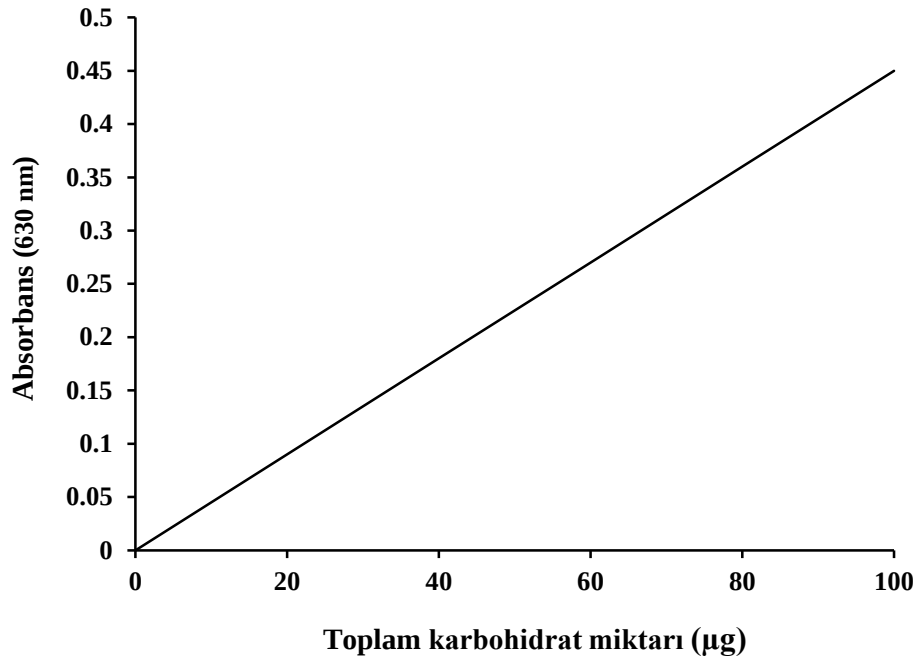
D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini,

V: %80'lik asetonun son hacmini,

W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

3.3.7. Toplam karbohidrat içeriğinin belirlenmesi

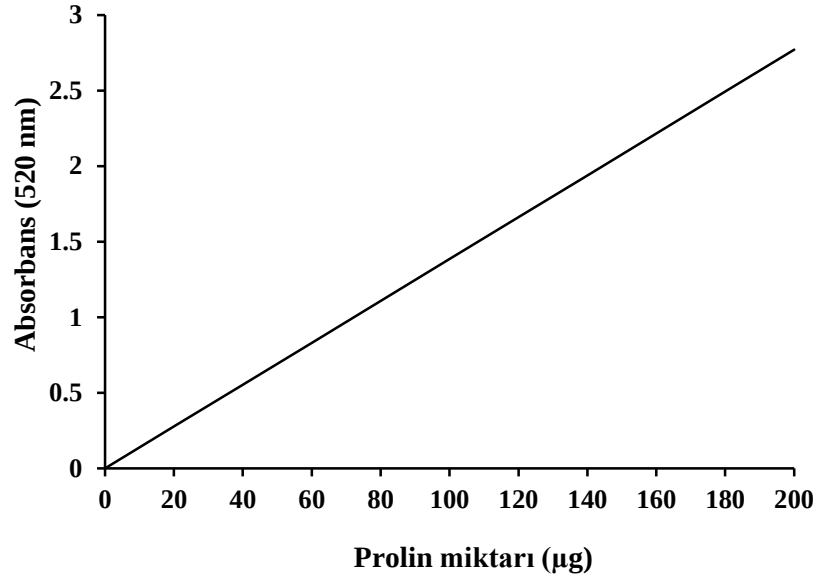
Total karbohidrat içeriği Dische (1962) tarafından belirlenen metotda küçük modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Mısır bitkisinin yapraklarından alınan 0.1 gr doku örnekleri 5 ml soğuk 2.5 N HCl içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 saat 100°C sıcak suda bekletildikten sonra soğuk su banyosunda soğutuldu. Üzerlerine reaksiyon duruncaya kadar katı Na₂CO₃ ilave edildi. Reaksiyon durunca üzerleri 45 ml saf su ile 50 ml'ye tamamlanarak ve 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 50 ml içerisinde 1 ml süpernatant alınarak üzerine Antron çözeltisi ilave edilip tekrar soğuk suya konularak soğutulduktan sonra 630 nm'deki absorbans değişimleri kaydedildi. Total karbonhidrat içeriği standart grafikten gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Toplam karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.8. Prolin miktarının belirlenmesi

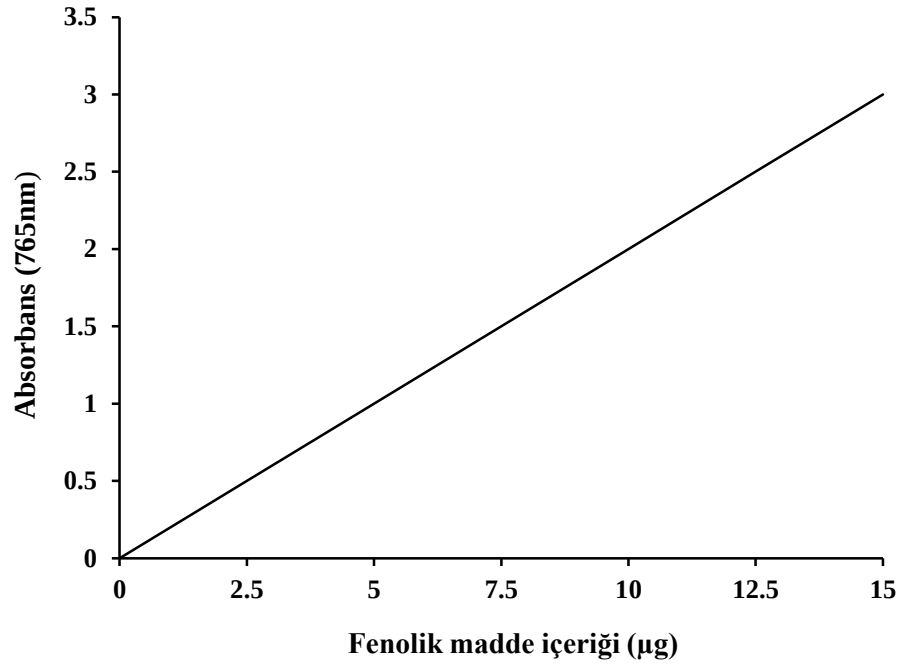
Prolin miktarının belirlenmesi için Bates *et al.* (1973) tarafından verilen prosedür uygulandı. Mısır bitkisinin yapraklarından ve köklerinden alınan 0.5 gr doku örnekleri 7.5 ml %3'lük sülfosalisilik asit içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 6000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip Daha sonra süpernatanttan 2 ml alınarak üzerine 1ml glasiyal asetik asit ve 1 ml asit ninhidrin ilave edilerek karışımı ihtiva eden tüpler 100°C'de 1 saat bekletilecek. İnkübasyon sonunda tüpler soğuk su banyosuna alınarak reaksiyon durduruldu. Tüplerin üzerine 4 ml tolüen eklenerek vorteksle karıştırıldı ve bir müddet beklendikten sonra üst faz alınarak 520 nm de absorbans değerleri okundu. Tolüen kör numune olarak kabul edildi. Prolin miktarı standart grafikten gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.4. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.9. Fenolik madde miktarının belirlenmesi

Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için Dewanto *et al.* (2002) tarafından belirlenen prosedür uygulandı. Mısır bitkisini yapraklarından ve köklerinden alınan 0.5 g örnekler 5 ml 0.1 M'lık fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra 15.000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant 25 µl alınarak üzerine 125 µl folin coicalteu reagent ilave edildi. Son olarak üzerine 250 µl %20'lik Na₂CO₃ ilave edilerek vortekslendi. Karışımlar 25°C'da 30 dk. bekletildikten sonra 765 nm de absorbansı okundu. Fenolik madde içeriği standart grafikten yararlanılarak gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı.



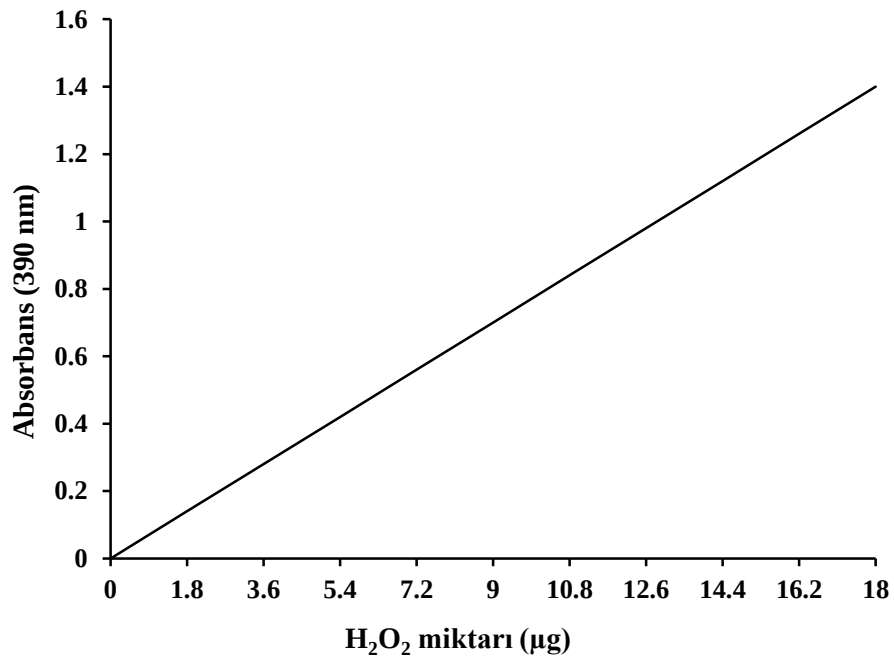
Şekil 3.5. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.10. Lipid peroksidasyon (MDA) seviyesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu Velikova *et al.* (2002) metoduna göre yapıldı. LPO için 0.4 g yaprak ve kök alınarak 4 ml %0.1'lik TCA (trikloro asetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 12.800 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 1 ml %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilip, reaksiyon karışımı kaynar su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durduruldu. Örnekler 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınıp 532 nm absorbans değeri ve 600 nm'deki non-spesifik absorbsiyon için absorbans değeri okundu. Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılacaktır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/µl): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplandı. Sonuçlar MDA (nmol. g-1 doku) şeklinde verilmiştir (Heath and Packer 1968; Jaleel *et al.* 2007).

3.3.11. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

Bitki dokusu 0.4 gr alınarak 4 ml soğuk %0.1 TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat $12.800 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantın 0.5 ml'sine 0.5 ml 10mM KH_2PO_4 (pH: 7.0) tamponundan ve 1 ml KI çözeltisi eklendi. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülüp kaydedip, sonuçlar standart grafikte oranlanarak g doku başına düşen H_2O_2 miktarı ($\mu g \cdot g^{-1}$ doku) olarak hesaplandı (Velikova *et al.* 2000).

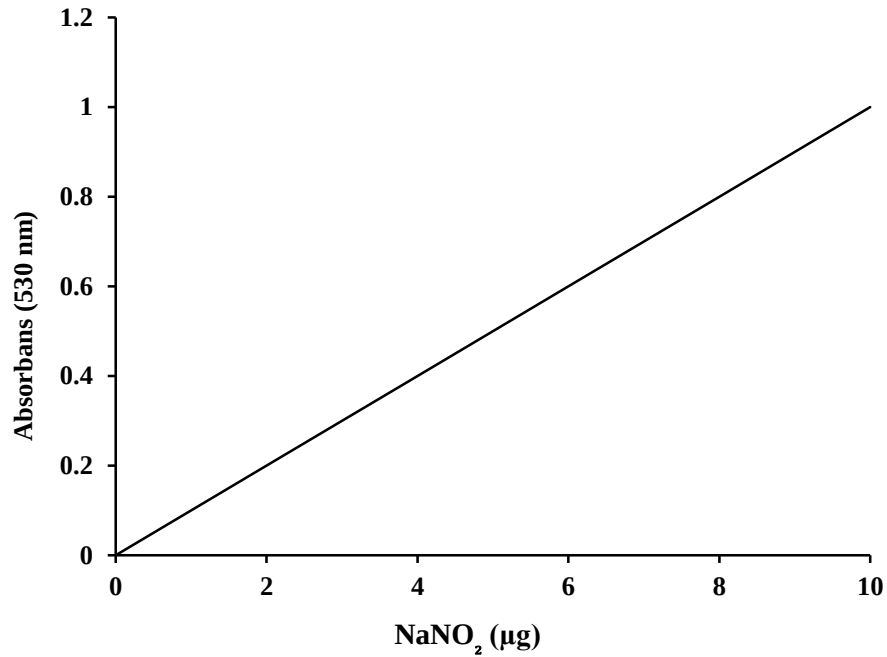


Şekil 3.6. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.12. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$) miktarının belirlenmesi

Süperoksit anyonu içeriği Elstner and Heupel (1976) tarafından tanımlanan metotta ufak modifikasyonlar yapılması sonucunda ölçüldü. Bitki yapraklarından 0.5 gr alınarak 4 ml 60 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) homojenize edildi. Homojenat 12 dakika 12500 rpm 'de santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 0.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 60 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) tamponundan eklendi. Daha sonra karışıma 0.1 ml 10

mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırılacak. Karışım 1 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α -naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve sonra 530 nm'de spesifik absorbanans değerleri belirlendi. Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için sodyum nitrit kullanılarak standart grafik hazırlanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Süperoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.13. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

0.2 gr yaprak örnekleri 4 ml 0.1 M fosfat tamponunda (pH: 6.75) homojenize edilerek 15.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildikten sonra Süpernatant kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.3.13.a. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenme reaksiyonunun SOD

enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Elstner and Heupel 1976).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınıp üzerine 30 μl enzim ekstraktı pipetlendi. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatıldı. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk tutuldu ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durduruldu. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okundu. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler U.mg^{-1} protein olarak sunuldu.

3.3.13.b. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanıldı. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okundu ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilip, sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (U.mg^{-1} protein) olarak hesaplandı.

3.3.13.c. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi

esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml 0.1 M NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5 mM H_2O_2 içeren substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 7 μl (kök) ve 20 μl (yaprak) enzim ekstraktı ilave edildi. 470 nm’de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilip absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlandı. 25°C’de 1 dakikada, absorbansı 0,01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilip sonuçlar g yaprak ve kök başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak hesaplandı (Yee *et al.* 2002).

3.3.13.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm’de absorbanstaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano and Asada 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 6.75), 250 μM askorbik asit (AsA), 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml’lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm’de ASC için $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein olarak ifade edildi.

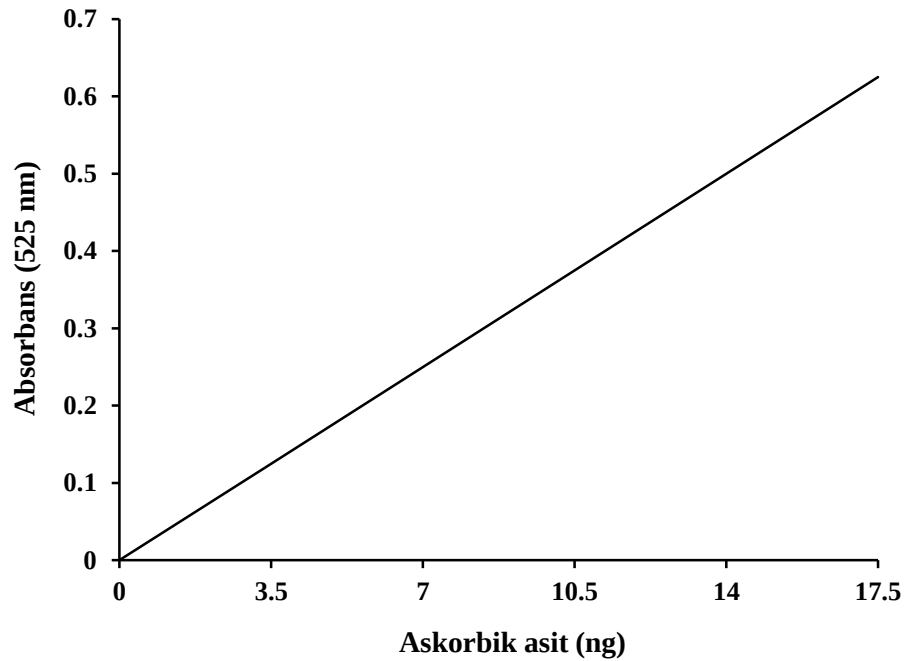
3.3.13.e. Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) 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 kullanılır. 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 edilir. NADPH’in oksidasyonu 340 nm’de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenir. GR aktivitesi $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein olarak ifade edilir.

3.3.14. Askorbat ve glutatyon tayini

3.3.14.a. Askorbat tayini

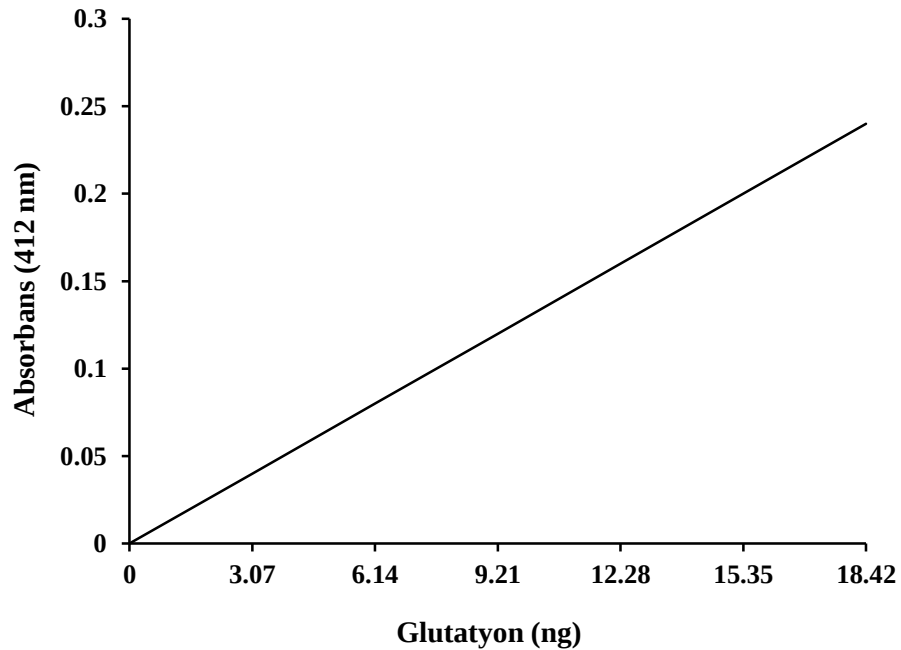
Ascorbik asit içeriği Low *et al.* (1983) ve Costa *et al.* (2005) yöntemine göre belirlendi. Bu metoda göre 0.2 g yaprak dokusu 2 ml %5 TCA içerisinde homojenize edilip, Homojenat 12.000_{xg} de 10 dakika santrifüj edilecek. Süpernatantın 200 µl alınarak üzerine 800 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.4), 3 mM EDTA, 1 mM dithioeritrol (DTT) içeren karışımdan eklenecektir. Karışım vortekslenildikten sonra 25°C’de 10 dakika inkübe edilecek. Daha sonra karışım üzerine sırasıyla 100 µl N-ethylmaleimide, 400 µl 0,61 M TCA, 400 µl ortofosforik asit ve 400 µl α-bipyridyl eklenerek karıştırılacak. Yeni karışım üzerine 200 µl FeCl₃ eklenerek vortekslenicek ve 1 saat süreyle 40°C su banyosunda bekletildikten sonra 525 nm de absorbans değerleri belirlendi. Askorbik asitin konsantrasyonu standart grafikten gram dokudaki ng cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.8. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.14.b. Glutasyon tayini

Glutasyon içeriği Hodges *et al.* (1996) metodunun Wu *et al.* (2009) tarafından modifiye edilmiş protokölüne göre yapıldı. Glutasyon içeriğini belirlerken 0.3 ml süpernatant üzerine 38.7 µl K₂CO₃ (1.25 M) katıldı. Karışım 12.000g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra toplam glutasyon miktarını belirlemek için içeriğinde toplam 1 ml hacimde 120 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8), 0.6 mM DTNB, 6 mM EDTA ve 0.1 mM NADPH bulunan spektrofotometre küvetine 20 µl nötrale süpernatant ve son olarakda 5 µl (0.6 U) glutasyon redüktaz enzimi ilave edildi. Başlatılan reaksiyonun absorbans değişimi 5 dk boyunca ölçüldü. Ticari olarak sağlanacak indirgenmiş glutasyon (GSH) ile hazırlanacak olan standart grafikten yola çıkılarak örnekteki toplam glutasyon miktarı hesaplanmıştır. Yükseltgenmiş glutasyon, glutasyon disülfid (GSSG), miktarını belirlemek için 0.2 ml nötrale süpernatant 1 µl 2-Vinylpyridine (VPD) ile oda şartlarında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında artık VPD yi ortamdan uzaklaştırmak için örnekler iki kez santrifüjlenir ve 20 µl süpernatant alınarak yukarıda ifade edilen deneysel aşamalar tekrarlandı. Hazırlanacak olan standart GSSG grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki yükseltgenmiş glutasyon miktarları belirlendi.



Şekil 3.9. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.15. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Proteinler sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile yürütüldü. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle aktarıldı. Jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklendi. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol döküldü. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Yaklaşık 45 dakika sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Beş dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Daha sonra akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Yığma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6.8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik TEMED'den 3 µl, ve saf sudan 2.2 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)'den 30 µl ilave edildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 2.03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 2.67 ml %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3.2 µl %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 3.15 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10'luk amonyum persulfat ilave edildi. Kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.3.16. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile antioksidan izoenzim profillerinin belirlenmesi

Poliakrilamid jeller SDS-PAGE jelleri ile aynı şekilde hazırlandı ancak jel ortamına SDS katılmadan hazırlandı. İzoenzimler belirlenirken antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan enzim ekstraktlarına %20 gliserol eklendi ve içerisinde 50-300 µg protein olacak şekilde hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Çalışmalarda %4 yığma jeli çalışılan enzime göre %8, 10 ve 11 ayırma jeli kullanıldı. Yürütme tamponu (18.6 glisin ve 3.02 g Tris, 1 L, pH: 8.3) kullanılarak +4°C'de, 80-120 Voltta 3-4 saat yürütüldü. Yürütme tamponuna askorbat peroksidaz için 2 mM askorbik asit ilave edildi.

Bitkinin kök ve yapraklarından elde edilecek taze örnekler +4°C'de 9 mM Tris HCl (pH 6.8) tamponunda homejenize edilip; %13.6 gliserol ilave edildi. Homojenat 15 dakika boyunca 15000 rpm de santrifüj edili. Elde edilecek süpernatant kısımdan protein konsantrasyon miktarı belirlendi (Smith *et al.* 1985). Elektroferik SOD ayırımını yapmak için +4°C'de 120 mA şartlarında %4 yığma ve %12 ayırma jellerinde doğal PAGE de 40 µg protein içeren örnekler yürütüldü (Beuchamp and Fridovich 1971). SOD izoenzimleri NBT ve riboflavin ile boyandı ve fotokimyasal olarak belirlendi. POD izoenzimlerini belirlemek için +4°C'de 120 mA şartlarında %10'luk jelde doğal PAGE de 40 µg protein içeren örnekler yürütülür. Bant yoğunluklarını görüntülemek için yürütme işlemi biten jeller 1.3 mM benzidine ve %3 luk H₂O₂ içeren 200 mM Na-acetat tamponunda (pH 5.0) 30 dakika boyunca 30°C karanlık ortamda bekletildi (Liu 1973). APX izoenzim ayırımını yapmak için Mittler and Zilinskas (1993) tarafından belirtildiği gibi yapılmıştır. Buna göre +4°C'de 120 mA şartlarında 10%’luk jelde doğal PAGE de 40 µg protein içeren örnekler yürütüldükten sonra jel 30 dakika boyunca 2 mM askorbat içeren 50 mM Na-fosfat tamponunda (pH 7.0) bekletilmiştir. Daha sonra aynı jel 20 dakika boyunca 4 mM askorbat ve 2 mM H₂O₂ içeren 50 mM Na-acetat tamponunda (pH 7.0) inkübe edilirdi. Sonra Jel 1 dakika aynı tamponda yıkandıktan sonra 28 mM N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ve 2.45mM NBT içeren 50 mM Na-fosfat tamponuna (pH 7.8) daldırılıp ve 10-20 dakika boyunca ışıklı ortamda hafif çalkalanmıştır. CAT izoenzimlerinin ayırımını yapmak için +4°C'de 120 mA şartlarında

%0.5 çözüdür nişasta içeren %7.5'luk jelde doğal PAGE de 40 µg protein içeren örnekler yürütüldükten hemen sonra jel oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 18 mM sodyum tiosülfat ve 679 mM H₂O₂ içeren çözeltide inkübe edildi. Sonrasında jel saf su ile yıkandı ve 90 mM potasyum iyod çözeltisine daldırılıp ve %0.5 glasiyal asetik asit ile asitleştirilme yapılmıştır. CAT enziminin negatif bantları jelin mavi zemininde görüntülendi (Woodbury 1971).

3.3.17. İstatistik analiz

Sonuçlar ($\pm$ SE), her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

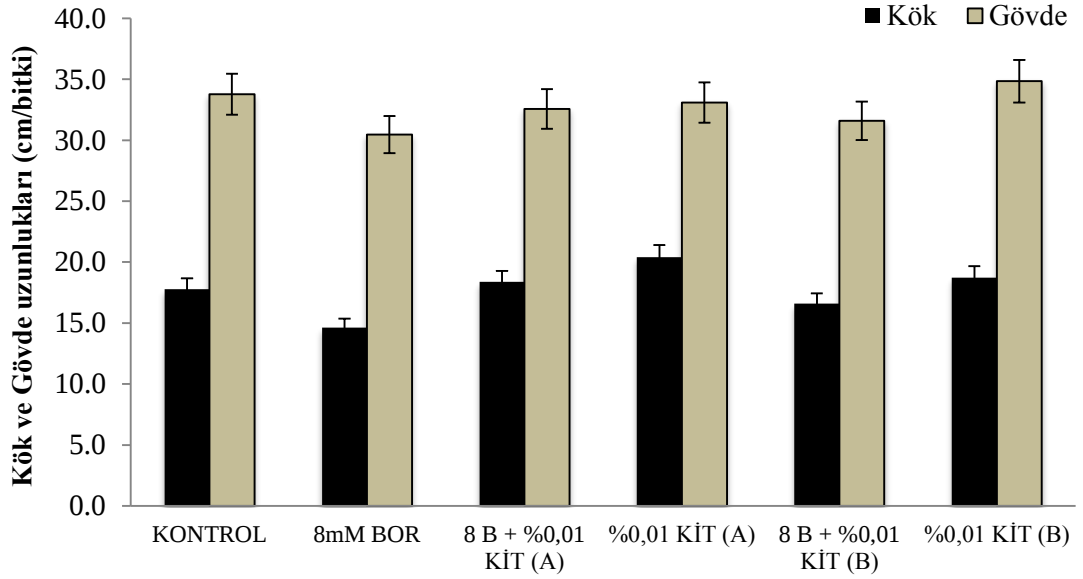
4.1. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kök ve Gövde Uzunluğu Üzerine Etkileri

Mısır kök ve gövde uzunluğu B stresinde (8 mM) istatistiksel olarak oldukça önemli miktarlarda azalma göstermiştir ($P < 0.05$). Köklerde ortalama uzunluk kontrol bitkilerinde 17.8 cm'den, bor uygulamasında 14.6 cm'ye düşerek %18'lik bir azalma göstermiştir (Çizelge 4.1). B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamaları kök uzunluğunu 18.4 cm ve 16.6 cm'ye yükselterek sırasıyla B stresine göre %26 ve %13.6 oranında arttırmıştır. Tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kök uzunluğunu 20.4 cm ve 18.7 cm gibi kontrole göre %14 ve %5 oranında arttırarak kontrolden daha iyi bir seviyeye getirmiştir. Gövdelerde ise kontrol bitkilerinin ortalama uzunluğu 33.8 cm'den bor stresinde 30.5 cm'ye düşerek %10'luk bir azalma göstermiştir. B stresıyla kıyaslandığında B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamasında gövde uzunluğu sırasıyla 32.6 cm ve 31.6 cm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamaları gövde uzunluğunu %26 ve %13.6 gibi istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır. Tek başına Kitosan (A ve B) uygulamaları da gövde uzunluğunu arttırmıştır (Şekil 4.1)

Çizelge 4.1. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Guruplar	Kök	Gövde
Kontrol	17.8 ± 0.10c	33.8 ± 0.10b
8 mM B	14.6 ± 0.13e	30.5 ± 0.15e
8 mM B+%0.01 KİT (A)	18.4 ± 0.10b	32.6 ± 0.13c
%0.01 KİT (A)	20.4 ± 0.16a	33.1 ± 0.62bc
8 mM B + %0.01 KİT (B)	16.6 ± 0.18d	31.6 ± 0.07d
%0.01 KİT (B)	18.7 ± 0.13b	34.8 ± 0.04a

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Uygulamalar

Şekil 4.1. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları (cm/bitki) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

4.2. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kuru Madde ve Bağlı Su İçeriği Üzerine Etkileri

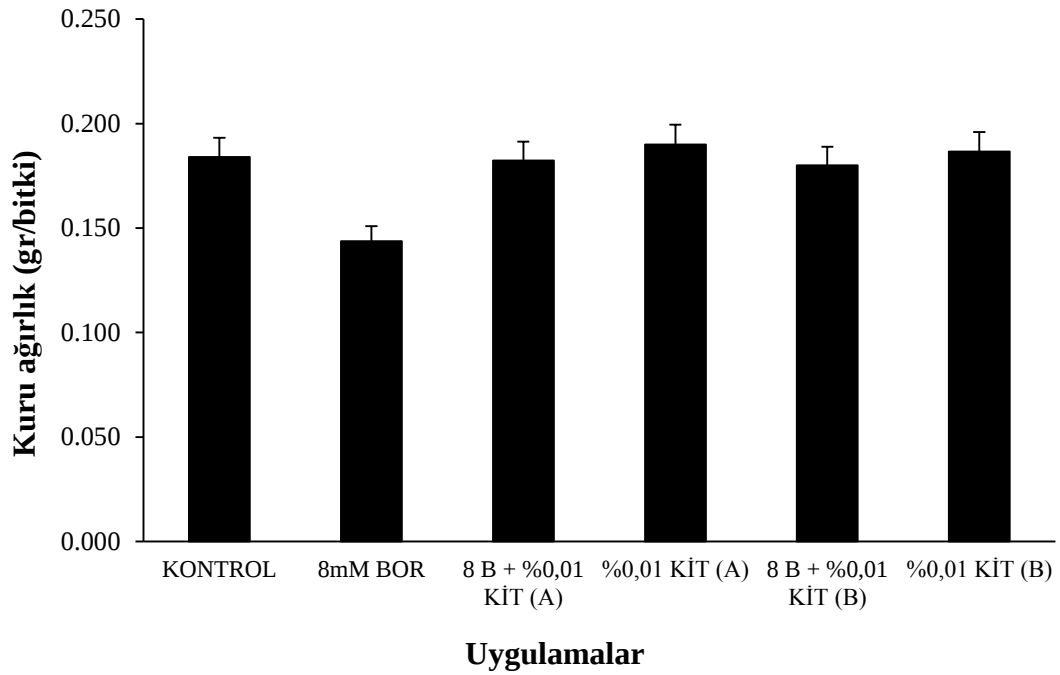
Kuru madde ağırlığı, mısır bitkisinde B stresinde azalış göstermiştir ($P < 0.05$). Kuru madde kontrol bitkilerinde 0.184 gr'dan B stresinde 0.144 gr'a kadar azalmıştır. B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamalarında B stresine göre kuru madde miktarı 0.182 gr ve 0.180 gr'a kadar (kontrol bitkilerinin seviyesine) artmıştır (Çizelge 4.2).

Mısır bitkisinde bağlı su içeriği B stresinde azalmıştır. Kontrol bitkilerinde bu oran %93.58 iken B stresinde %92.45'e düşmüştür. B+Kitosan (A) ve (B) uygulaması tek başına B stresine göre kuru maddeyi sırasıyla %93.17 ve %93.02'e kadar (kontrol bitkilerinin seviyesine) arttırmıştır (Çizelge 4.2).

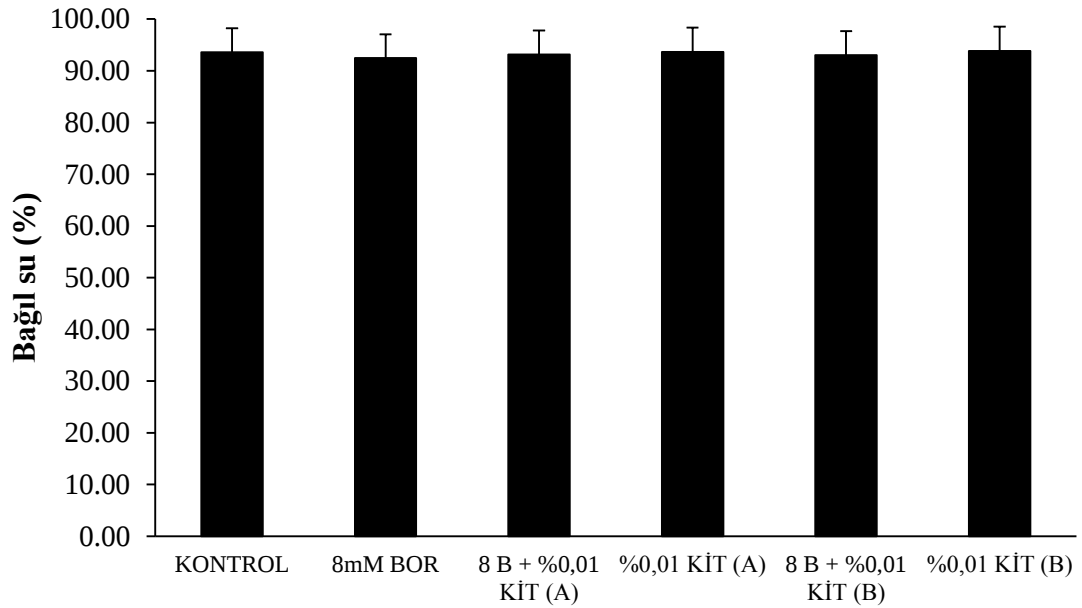
Çizelge 4.2. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kuru madde (gr) ve bağıl su içeriği (%) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.

Guruplar	Kuru madde	Bağıl su
Kontrol	$0.184 \pm 0.026c$	$93.58 \pm 0.25ab$
8 mM Bor	$0.144 \pm 0.020f$	$92.45 \pm 0.10c$
8 B + %0.01 KİT (A)	$0.182 \pm 0.009d$	$93.17 \pm 0.10b$
%0.01 KİT (A)	$0.190 \pm 0.020a$	$93.67 \pm 0.08a$
8 B + %0.01 KİT (B)	$0.180 \pm 0.023e$	$93.02 \pm 0.17b$
%0.01 KİT (B)	$0.187 \pm 0.026b$	$93.86 \pm 0.24a$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasında $\pm$ ki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.2. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin kuru madde (gr) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Uygulamalar

Şekil 4.3. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Bağlı su içeriği %'si üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

4.3. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Kök ve Yaprakta Çözünabilir Protein İçeriği Üzerine Etkileri

Bor stresi mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında toplam çözünabilir protein içeriğini azaltmıştır ($P < 0.05$). Köklerde toplam protein miktarı kontrol bitkilerinde 11.84 mg.gr^{-1} iken B stresinde 9.36 mg.gr^{-1} 'a düşmüştür. Köklerde B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre total çözünabilir protein içeriğini %15.5 ve %17 gibi önemli bir oranda arttırmıştır. Yapraklarda ise kontrol gurubunda 24.91 mg.gr^{-1} dan B stresinde 22.17 mg.gr^{-1} olarak belirlenmiştir. Yapraklarda B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamaları B stresine göre %8 ve %44'lük bir artışa neden olarak toplam çözünabilir protein miktarını istatistiksel olarak oldukça önemli ($P < 0.05$) oranlarda arttırmıştır (Çizelge 4.3).

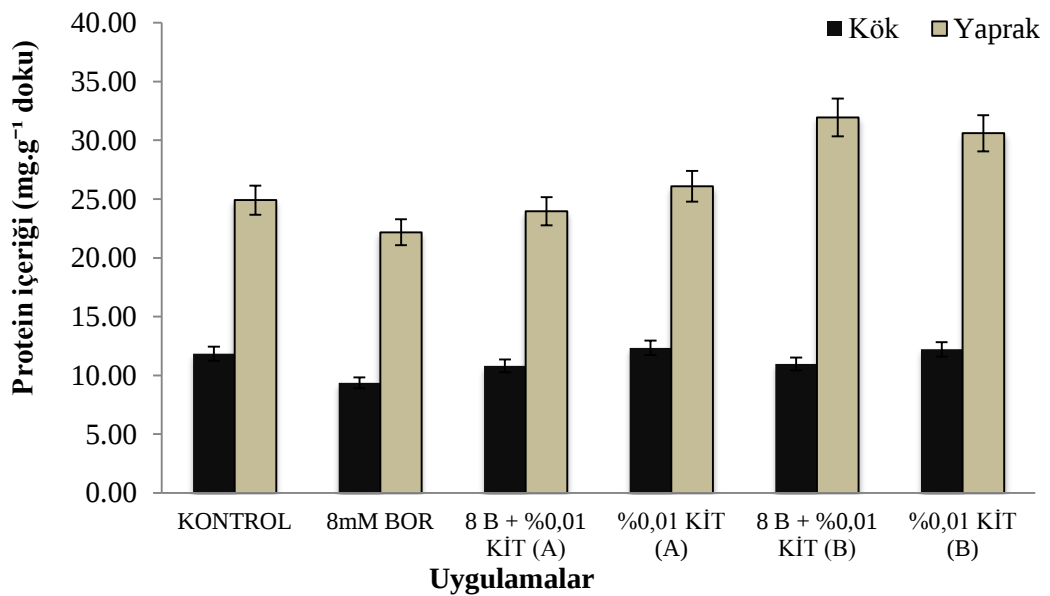
Kökte ve yaprakta tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kontrole göre toplam çözünabilir protein miktarlarını arttırmıştır. Yaprakta bu artışın Kitosan (A) uygulamasında kontrole göre %5 ve Kitosan (B) de ise %23 olduğu bulunmuştur. Bu

sonuçlar, SDS-PAGE verileriyle de desteklenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Örneğin, SDS-PAGE fotoğrafı incelendiğinde, B stresinde hem yaprak hem de köklerde protein miktarı azalırken, B+Kitosan (A) ve (B) uygulamalarında yapraklarda 100, 50, 37 kDa'luk proteinlerin (Şekil 4.5) ve köklerde ise 50, 37, 15 kDa'luk proteinlerin arttığı görülmektedir (Şekil 4.6).

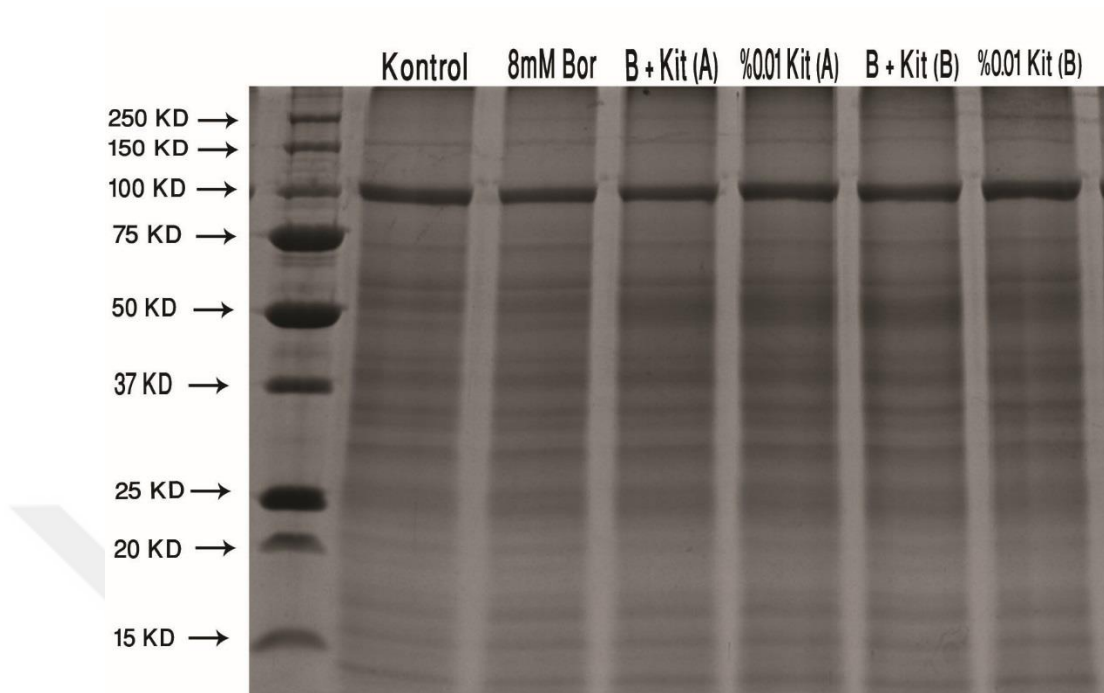
Çizelge 4.3. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam çözünabilir protein içeriği (mg/g doku) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	Total protein	
	Kök	Yaprak
Kontrol	11.84 ± 0.05b	24.91 ± 0.04d
8 mM Bor	9.36 ± 0.04d	22.17 ± 0.02f
8 B + %0.01 KİT (A)	10.81 ± 0.01c	23.95 ± 0.08e
%0.01 KİT (A)	12.34 ± 0.08a	26.09 ± 0.04c
8 B + %0.01 KİT (B)	10.96 ± 0.07c	31.95 ± 0.03a
%0.01 KİT (B)	12.21 ± 0.04a	30.60 ± 0.01b

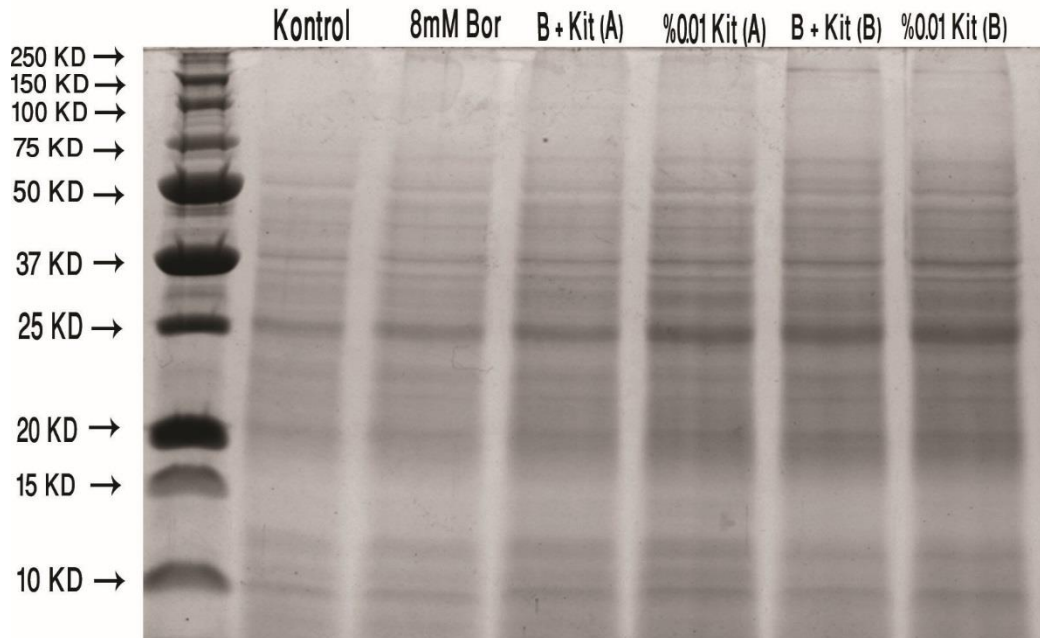
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.4. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam çözünabilir protein içeriği (mg/g doku) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.5. Bor toksisitesine kitosan uygulamalarının mısır bitkisinin yapraklarında protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi



Şekil 4.6. Bor toksisitesine kitosan uygulamalarının mısır bitkisinin köklerinde protein profilinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi

4.4. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Toplam Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkileri

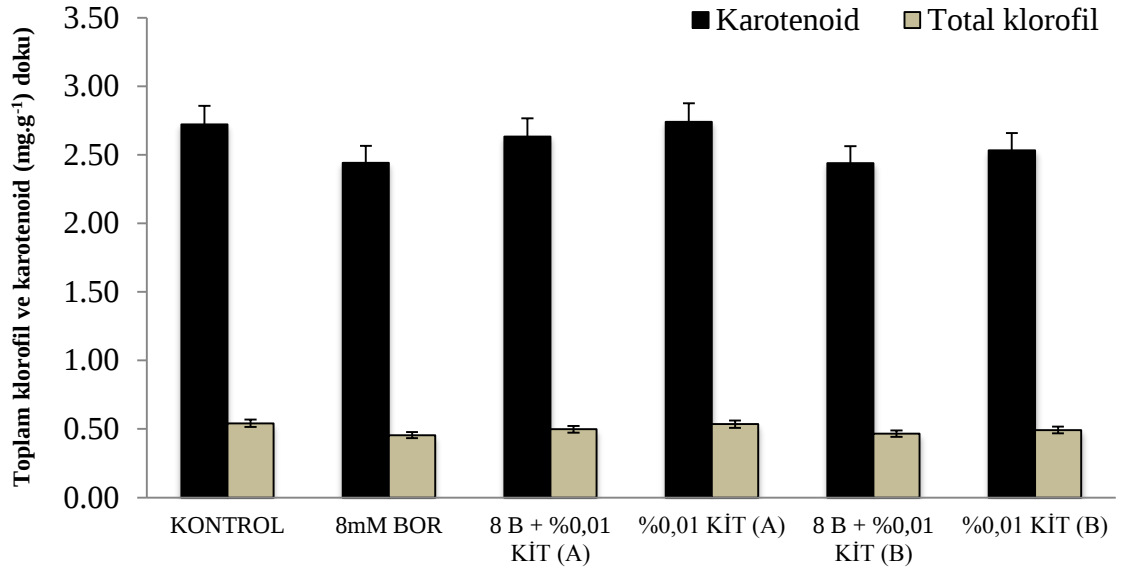
B stresi, mısır bitkisinin yapraklarında toplam klorofil içeriğinde düşüşe (%16) ($P < 0.05$) neden olmuştur. B stresinde kontrolle kıyaslandığında, klorofil_a içeriği %16.7, klorofil_b %13.6 oranında azalmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4. 8). B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları B stresine kıyaslandığında klorofil_a miktarını sırasıyla %21.7 ve %7 oranında arttırmıştır. Klorofil_b ise B stresine göre B+Kitosan (A) uygulamasında %9.7 oranında ve B+Kitosan (B) uygulamasında ise %3 oranında artmıştır. B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları B stresine göre total klorofil miktarlarını sırasıyla %10 ve %3 oranlarında arttırmıştır.

Toplam karotenoid miktarı B stresinde önemli oranda (%10) azalmıştır. B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre toplam karotenoid miktarını %8 arttırırken, B+Kitosan (B) önemli bir değişiklik yapmamıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.7).

Çizelge 4.4. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Fotosentetik Pigment miktarlarına (mg.g^{-1}) kitosan uygulamalarının etkisi

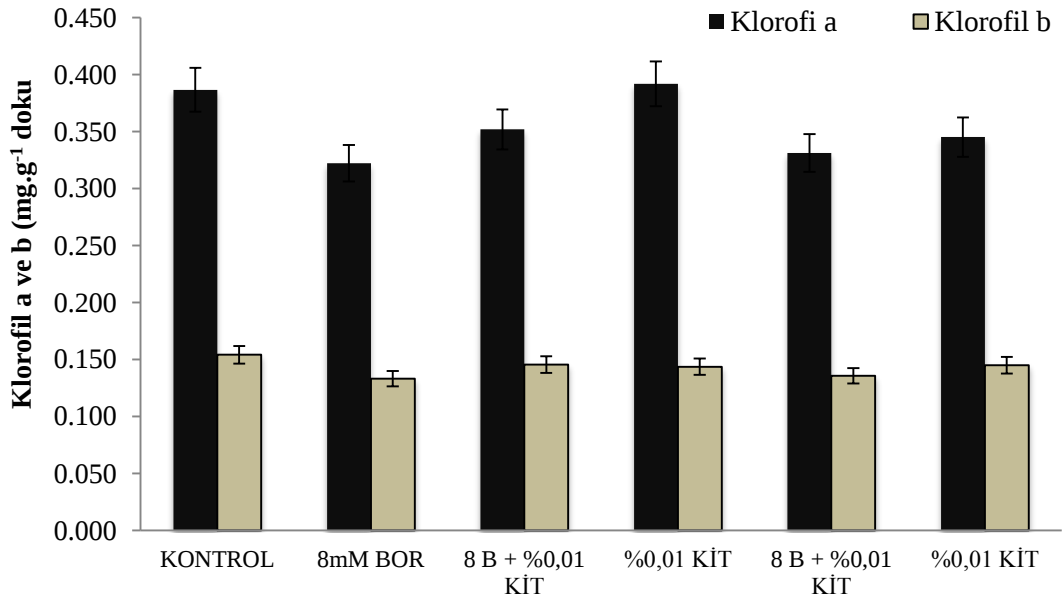
Gruplar	Kla	Klb	Kla/klb	Total kl	Karotenoid
Kontrol	0.387±0b	0.154±0a	2.51±0b	0.541±0a	2.72±0.003a
8mM Bor	0.322±0f	0.133±0e	2.42±0cd	0.455±0f	2.44±0.003d
8 B + %0.01 KİT (A)	0.352±0c	0.146±0b	2.41±0.01cd	0.498±0c	2.63±0.006b
%0.01 KİT (A)	0.392±0a	0.144±0c	2.73±0.01a	0.536±0b	2.74±0.016a
8 B + %0.01 KİT (B)	0.331±0e	0.136±0d	2.45±0.02c	0.467±0e	2.44±0.029d
%0.01 KİT (B)	0.345±0d	0.145±0bc	2.40±0d	0.493±0d	2.53±0.045c

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Uygulamalar

Şekil 4.7. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Toplam klorofil ve karotenoid miktarlarına (mg.g⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi



Uygulamalar

Şekil 4.8. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Klorofil a ve b içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

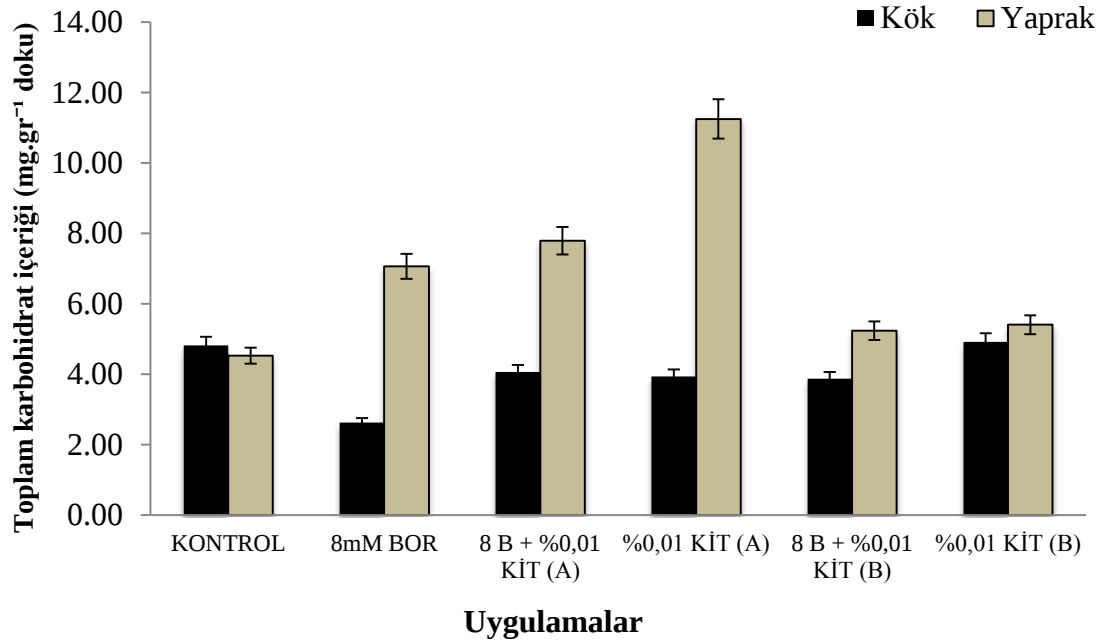
4.5. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Toplam Karbohidrat İçeriğine Etkileri

B stresi mısır köklerinde toplam karbohidrat miktarını azaltırken (%45), yaprakta önemli oranda arttırmıştır (%56). Köklerde B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre toplam karbohidrat miktarını %55 ve %48 gibi önemli oranda arttırmıştır. Yapraklarda B+Kitosan (A) uygulaması toplam karbohidrat miktarını B stresine göre %10 arttırırken, B+Kitosan (B) uygulamasında %25 oranında azalmıştır. Tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kontrole göre toplam karbohidrat miktarlarını mısır bitkisinin yapraklarında sırasıyla %70 ve %15 gibi önemli oranlarda artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam karbohidrat içeriğine (mg.gr⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	Toplam karbohidrat	
	Kök	Yaprak
Kontrol	4.82 ± 0.04a	4.53 ± 0.5e
8 mM Bor	2.62 ± 0.08d	7.07 ± 0.02c
8 B + %0.01 KİT (A)	4.06 ± 0.01b	7.79 ± 0.09b
%0.01 KİT (A)	3.94 ± 0.05b	11.25 ± 0.05a
8 B + %0.01 KİT (B)	3.87 ± 0.04bc	5.24 ± 0.05d
%0.01 KİT (B)	4.92 ± 0.02a	5.41 ± 0.13d

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.9. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam karbohidrat içeriğine (mg.gr⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi

4.6. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Topalm Fenolik Madde ve Prolin Miktarlarına Etkileri

B stresi toplam fenolik madde içeriğini mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında arttırmıştır ($P < 0.05$). Köklerde bu artış %6 iken yapraklarda %10 oranında belirlenmiştir. Köklerde B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre fenolik madde içeriğini %29 ve %39 gibi önemli bir oranda azaltmıştır. Yapraklarda B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre toplam fenolik madde içeriğini %9 oranda azaltırken, B+Kitosan (B) uygulaması istatistiksel olarak önemsiz oranda arttırmıştır (Çizelge 4.6).

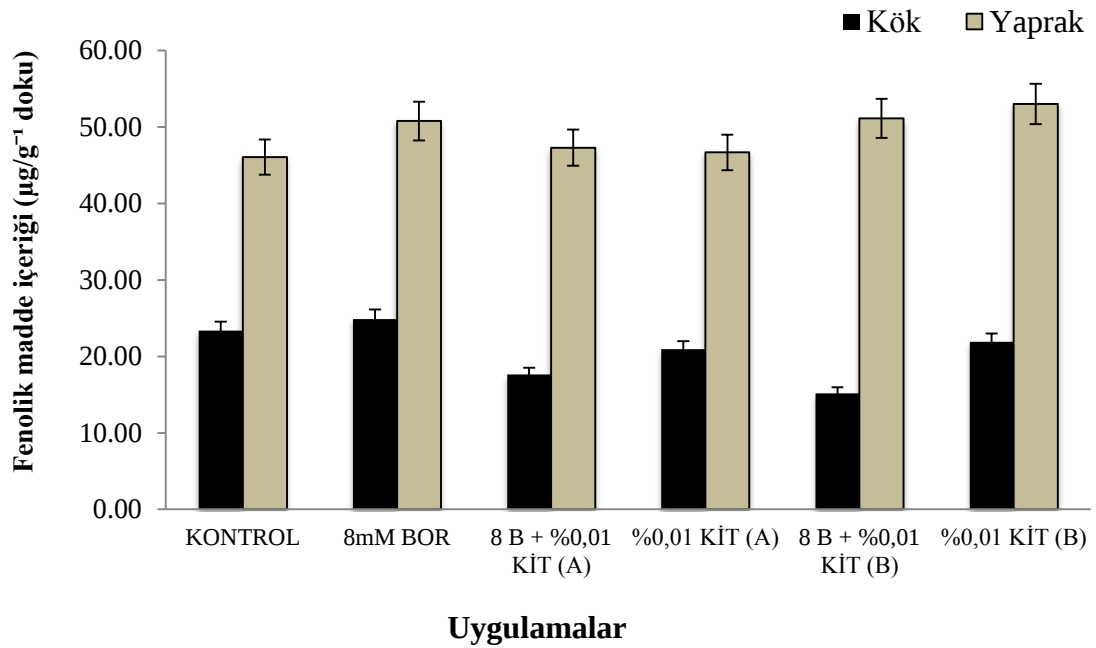
B stresi mısırdaki kök prolin miktarını önemli oranda azaltırken (%29), yaprak dokuda arttırmıştır (%19). Köklerde B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre prolin içeriğini %25 ve %14 oranında arttırmıştır. Yapraklarda prolin miktarı B stresinde kontrol grubuna göre %19 oranında artmıştır. B+Kitosan (A) ve (B)

uygulamaları ise B stresine göre prolin içeriğinin %23 gibi önemli oranlarda azalmasına neden olmuştur (Çizelge 4.6).

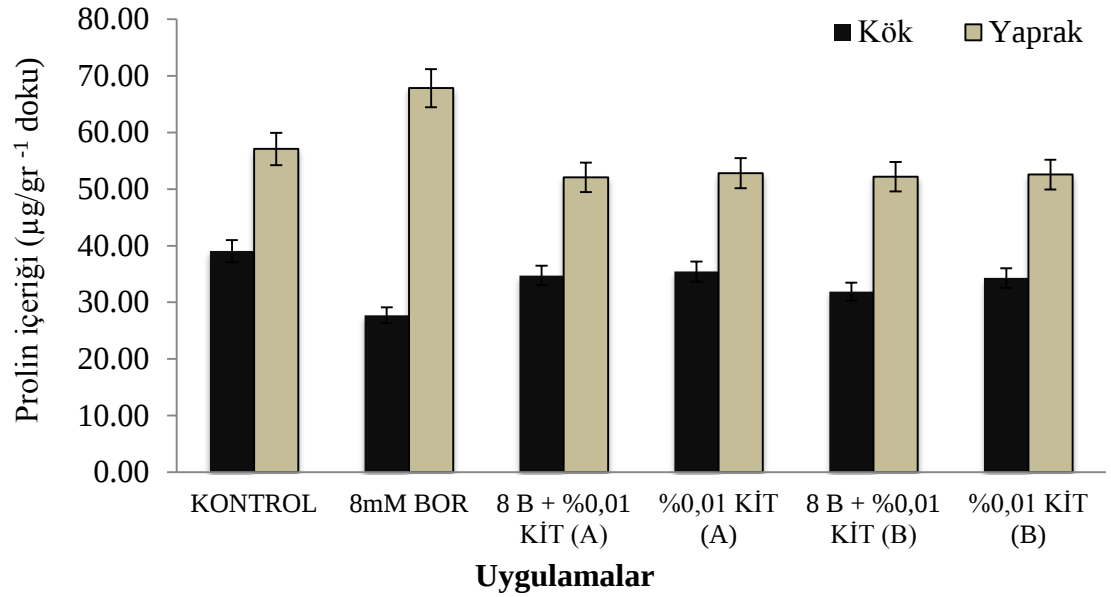
Çizelge 4.6. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam fenolik madde ve prolin miktarı ($\mu\text{g.g}^{-1}$) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	Fenolik madde		Prolin	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	23.38 $\pm$ 0.54b	46.06 $\pm$ 0.40d	39.07 $\pm$ 0.01a	57.09 $\pm$ 0.04b
8 mM Bor	24.90 $\pm$ 0.10a	50.78 $\pm$ 0.38b	27.73 $\pm$ 2.4b	67.83 $\pm$ 0.25a
8 B + %0.01 KİT (A)	17.65 $\pm$ 0.15e	47.29 $\pm$ 0.20c	34.74 $\pm$ 2ab	52.08 $\pm$ 0.43c
%0.01 KİT (A)	20.97 $\pm$ 0.36d	46.68 $\pm$ 0.19cd	35.44 $\pm$ 3.3a	52.82 $\pm$ 0.49c
8 B + %0.01 KİT (B)	15.19 $\pm$ 0.19f	51.12 $\pm$ 0.34b	31.88 $\pm$ 3.1ab	52.18 $\pm$ 0.13c
%0.01 KİT (B)	21.91 $\pm$ 0.23c	53.02 $\pm$ 0.13a	34.31 $\pm$ 0.11b	52.58 $\pm$ 0.04c

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.10. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin toplam fenolik madde miktarı ($\mu\text{g.g}^{-1}$) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.11. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin prolin miktarı ($\mu\text{g.g}^{-1}$) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

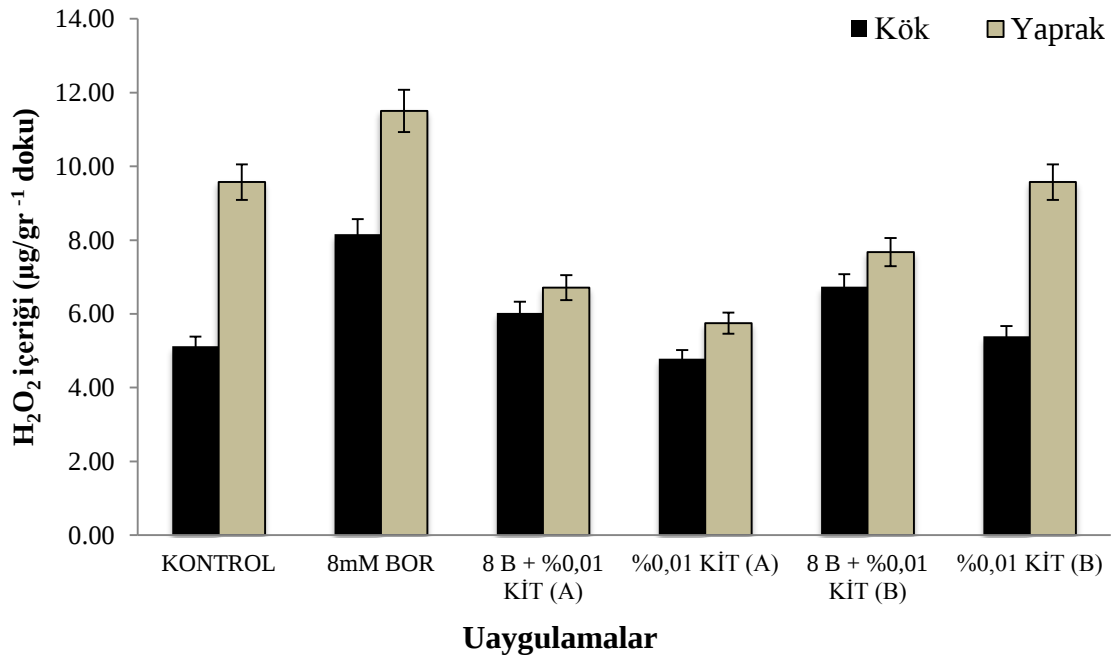
4.7. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Reaktif Oksijen Türlerinin Miktarlarına Etkileri

Mısır bitkisinin köklerinde görülen hidrojen peroksit (H_2O_2) ve superoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) miktarındaki değişim Çizelge 4.7’de verilmiştir. B stresi kontrole göre mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında H_2O_2 miktarlarında önemli artışlara neden olmuştur. Kontrol bitkilerinde H_2O_2 miktarı kökte 5.13 mg.g^{-1} dan B stresinde 8.16 mg.g^{-1} ’a ve yapraklarda 9.57 mg.g^{-1} dan 11.51 mg.g^{-1} ’a kadar artmıştır (Çizelge 4.7). Ancak Kitosan (A) ve (B) uygulamaları B stresinde artan H_2O_2 miktarlarını kök ve yapraklarda önemli oranda azaltmıştır. Kitosan (A) ve Kitosan (B) uygulaması kökteki H_2O_2 miktarını 6.02 mg.g^{-1} ’a ve 6.74 mg.g^{-1} ’a indirmiştir. Yapraklarda ise H_2O_2 miktarı Kitosan (A) ve Kitosan (B) uygulamasında 6.71 mg.g^{-1} ve 7.68 mg.g^{-1} ’a kadar azalmıştır.

Çizelge 4.7. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu (O_2^-) miktarlarına ($\mu g \cdot g^{-1}$) kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	H_2O_2		O_2^-	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	5.13±0.004e	9.57±0.005b	4.05±0.001b	13.53±0.001a
8 mM Bor	8.16±0.060a	11.51±0.013a	4.66±0.002a	14.08±0.001a
8 B + %0.01 KİT (A)	6.02±0.003c	6.71±0.060d	3.67±0.002e	11.87±1.33b
%0.01 KİT (A)	4.78±0.016f	5.75±0.076e	3.86±0.002c	11.96±0.002b
8 B + %0.01 KİT (B)	6.74±0.039b	7.68 ±0.049c	1.59±0.001f	12.85±0.009a
%0.01 KİT (B)	5.40±0.083d	9.57±0.052b	3.85±0.002d	11.90±0.002b

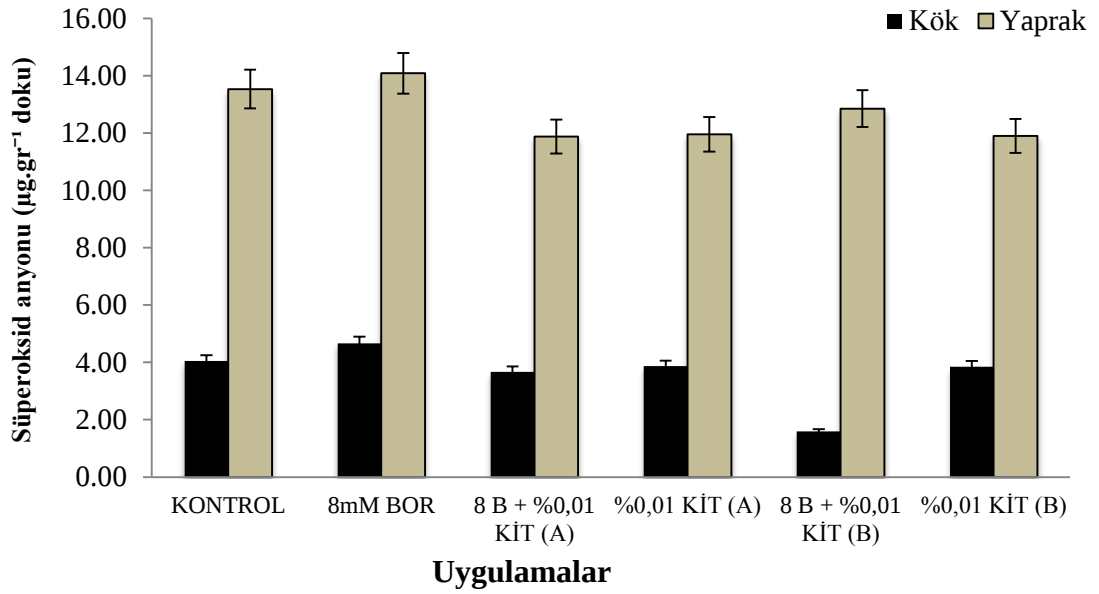
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır.



Şekil 4.12. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

B stresine karşı mısır bitkisinin kök ve yapraklarında belirlenen süperoksit anyonun (O_2^-) miktarındaki değişimler Çizelge 4.7 de verilmiştir. Hem kök hem de yapraklarda B stresi O_2^- miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda arttırmıştır. O_2^- miktarı

kontrol grubunda köklerde 4.05 mg.g^{-1} iken B stresinde %15 (4.66 mg.g^{-1}) artmıştır, yaprakta ise 13.53 mg.g^{-1} dan 14.08 mg.g^{-1} a (%4) yükselmiştir. B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları (özellikle kitosan (B) uygulaması) köklerde O_2^- miktarında oldukça önemli azalmaya ($P<0.05$) neden olmuştur.



Şekil 4.13. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin süperoksit anyonun (O_2^-) içeriği üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

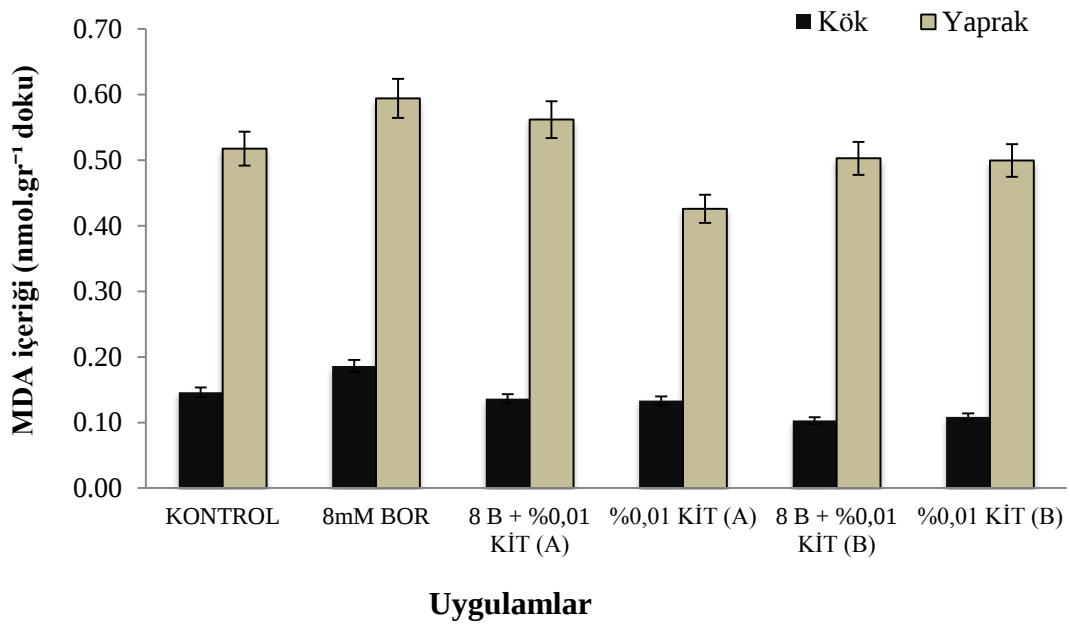
4.8. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Lipid Peroksidasyon (MDA) Seviyesine Etkileri

B stresi kontrol gurubuna göre mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarının MDA miktarlarında önemli artışlara neden olmuştur ($P<0.05$). Kontrol bitkilerinin kök ve yapraklarında MDA miktarları sırasıyla 0.52 ve 0.15 nmol.g^{-1} olarak ölçülürken, bu değerler B stresinde kök ve yaprakta sırasıyla 0.59 ve 0.19 nmol.g^{-1} 'ye kadar artmıştır (Çizelge 4.8). Bor toksisitesine karşı uygulanan Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kök ve yapraklarda MDA seviyesinde önemli azalmalara neden olarak toksisiteye karşı bitkinin tolerans geliştirmesine yardımcı olmuştur.

Çizelge 4.8. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Malondialdehid (MDA) miktarına (nmol.gr⁻¹) kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	MDA	
	Kök	Yaprak
Kontrol	0.15 ± 0.00b	0.52 ± 0.00 c
8 mM Bor	0.19 ± 0.002a	0.59 ± 0.002e
8 B + %0.01 KİT (A)	0.14 ± 0.001c	0.56 ± 0.002d
%0.01 KİT (A)	0.13 ± 0.001d	0.43 ± 0.002 a
8 B + %0.01 KİT (B)	0.10 ± 0.001f	0.50 ± 0.002b
%0.01 KİT (B)	0.11 ± 0.00e	0.50 ± 0.002b

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.14. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Malondialdehid (MDA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi

4.9. Antioksidan Enzimler

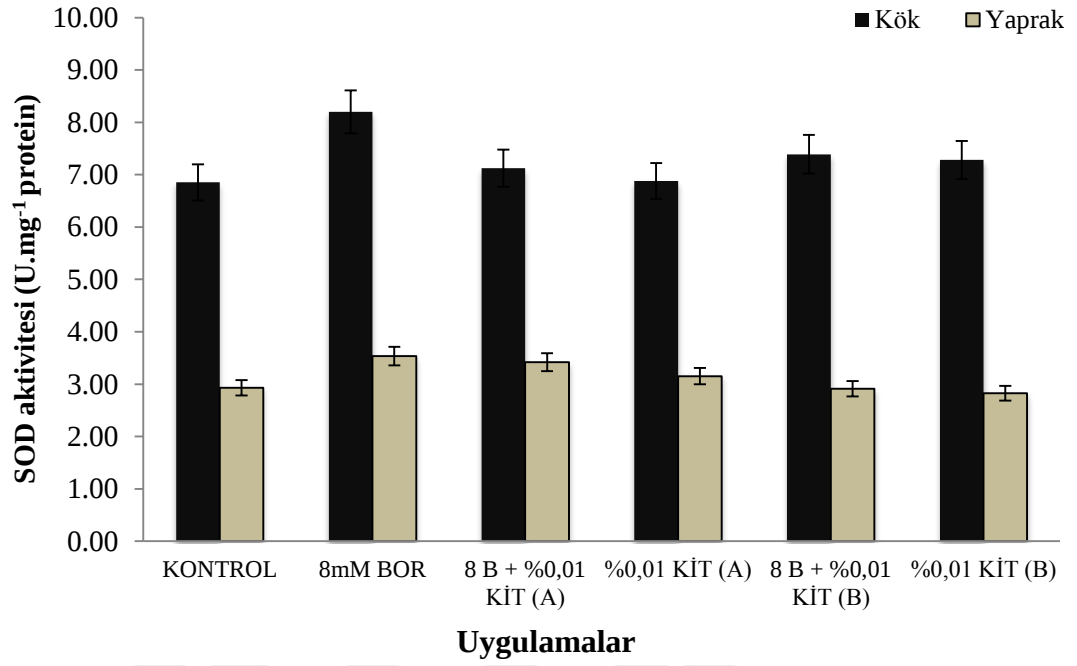
4.9.1. Bor ve kitosan uygulamalarının Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri

B stresi hem kök hem de yaprakta SOD aktivitelerinde %20'lik bir artışa neden olmuştur ($P < 0.05$). B stresine göre B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamaları SOD aktivitesini kökte %13 ve %9.8 oranında azaltmıştır. Yapraklarda ise B stresine göre B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulamaları %3 ve %18 oranında azaltmıştır ($P < 0.05$) (Çizelge 4.9). Bu sonuçlar, SOD izozimleri üzerinde de görülmektedir. Şekil 4.16 ve 4.17'ye bakıldığında, köklerde SOD izozim jeli üzerinde B stresinde, SOD 1 izoenziminde artış görülmektedir. Yapraklarda B stresi ve B+Kitosan (A) ve (B) ve tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamalarında SOD izozimlerinde çok az bir artış gözlemlenmiştir.

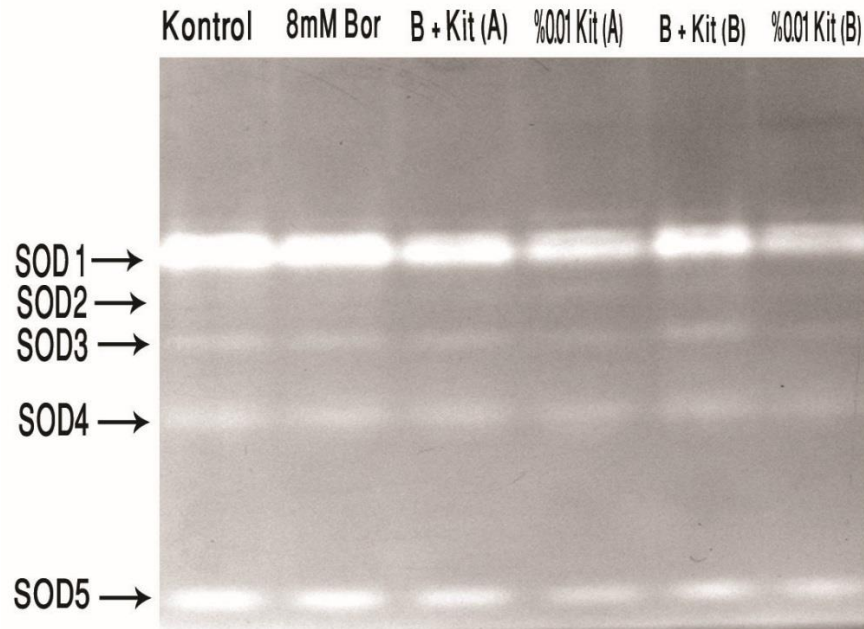
Çizelge 4.9. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	SOD	
	Kök	Yaprak
Kontrol	$6.85 \pm 0.04d$	$2.93 \pm 0.010d$
8 mM Bor	$8.20 \pm 0.14a$	$3.53 \pm 0.008a$
8 B + %0.01 KİT (A)	$7.13 \pm 0.01c$	$3.42 \pm 0.008b$
%0.01 KİT (A)	$6.88 \pm 0.03d$	$3.15 \pm 0.002c$
8 B + %0.01 KİT (B)	$7.39 \pm 0.01b$	$2.91 \pm 0.010d$
%0.01 KİT (B)	$7.28 \pm 0.08bc$	$2.83 \pm 0.009e$

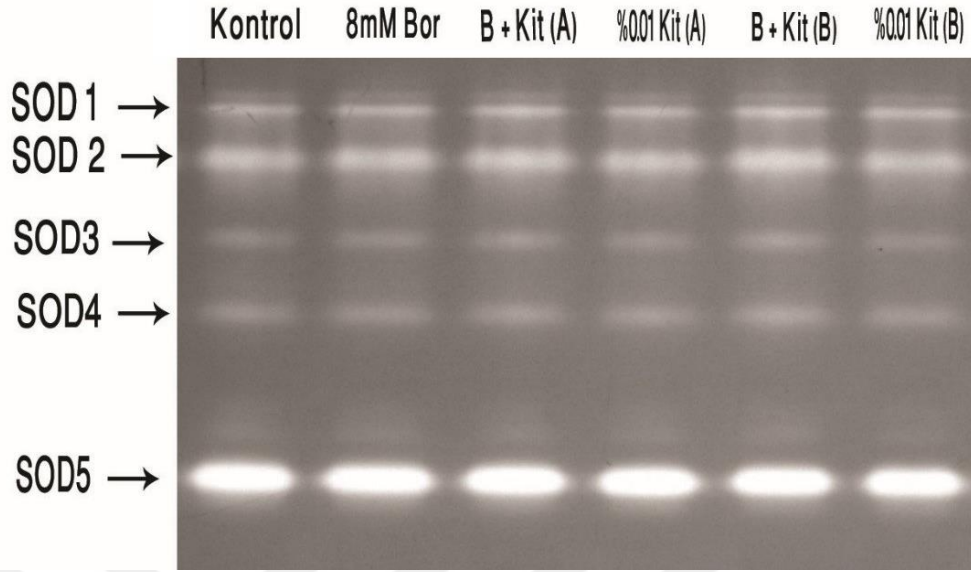
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.15. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.16. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.17. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

4.9.2. Bor ve kitosan uygulamalarının Katalaz (CAT) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri

B stresi mısır bitkisinin kök ve yapraklarında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak oldukça önemli bir düşüşe neden olmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 4.10). Köklerde CAT aktivitesi bor toksisitesinde kontrol gurubuna göre %44 oranda azalmıştır. Köklerde B stresine göre B+Kitosan (A) çok az, B+Kitosan (B) ise %100'den daha fazla bir artışa neden olmuştur ($P < 0.05$). Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücresel CAT aktivitesi ise 2.47 U.mg^{-1} protein iken, 8 mM B stresinde bu değer %41'lik bir azalışla 1.44 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. Yapraklarda CAT aktivitesi B+Kitosan (B) uygulamasında B stresine göre düşerken, B+Kitosan (A) %100'den daha fazla bir artışa neden olmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 4.10).

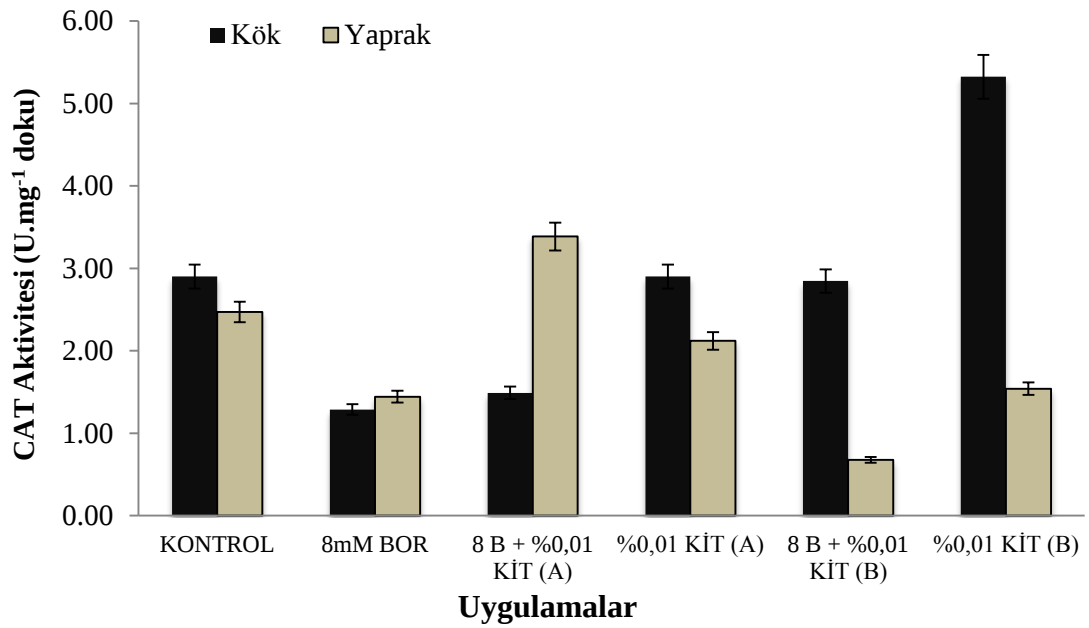
Bu sonuçlar CAT enziminin izoenzim profillerinden elde edilen verilerle desteklenmiştir. Mısır yapraklarında tek bir CAT izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.19). Kontrol bitkisine göre B stresinde bantların yoğunluğunun çok fazla azaldığı görülmektedir. Ancak B+Kitosan (A) uygulaması bu durumu tersine çevirebilmiştir. Bu verilere göre B stresinin hem kök hem de yapraklardaki CAT aktivitesini inhibe ettiği

ve bu olumsuzluğun B stresinden önce uygulanan Kitosan (A) uygulamasıyla iyileştirilebildiği görülmektedir.

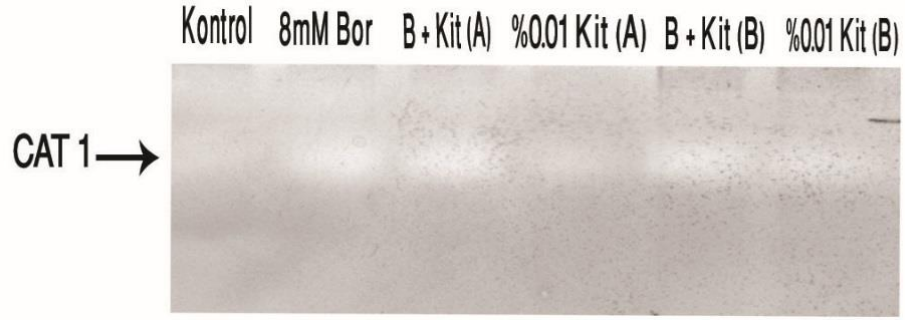
Çizelge 4.10. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	CAT	
	Kök	Yaprak
Kontrol	$2.90 \pm 0.018b$	$2.47 \pm 0.02d$
8 mM Bor	$1.29 \pm 0.015d$	$1.44 \pm 0.02a$
8 B + %0.01 KİT (A)	$1.49 \pm 0.010c$	$3.39 \pm 0.25b$
%0.01 KİT (A)	$2.10 \pm 0.004b$	$2.12 \pm 0.01c$
8 B + %0.01 KİT (B)	$2.85 \pm 0.018b$	$0.68 \pm 0.04d$
%0.01 KİT (B)	$5.33 \pm 0.016a$	$1.54 \pm 0.02e$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.18. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.19. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Katalaz (CAT) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

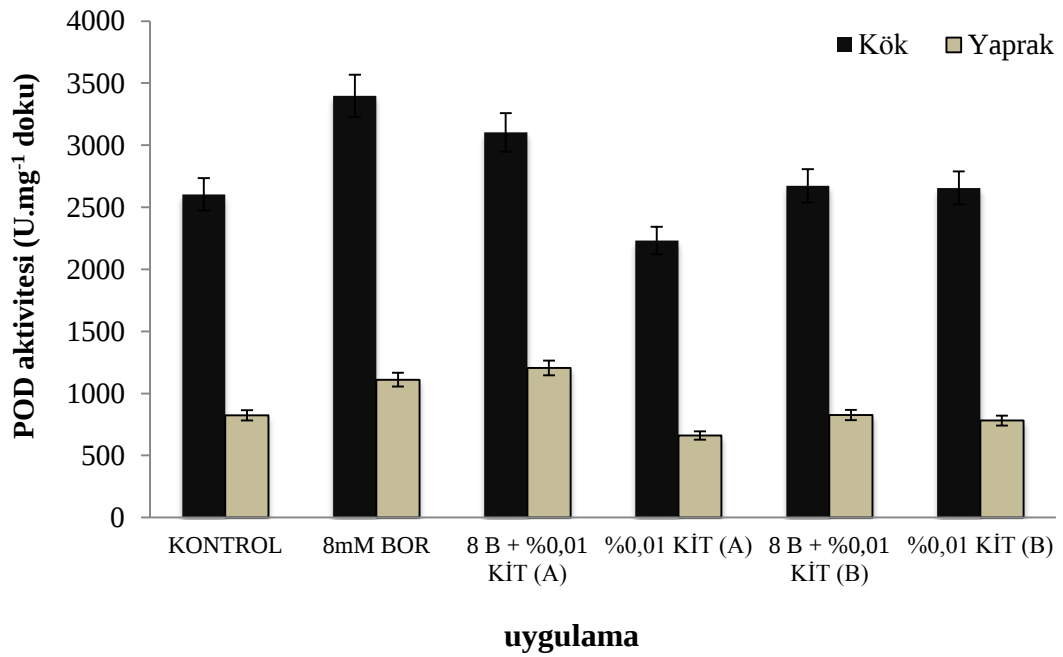
4.9.3. Bor ve kitosan uygulamalarının Peroksidaz (POD) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri

Mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında B stresi kontrole göre POD aktivitesinde artışlara neden olmuştur ($P < 0.05$). Köklerde kontrol grubunda POD aktivitesi 2604 U.mg^{-1} protein iken, B stresinde %30 lük bir artışla 3397 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. B+Kitosan (A) ve (B) uygulaması B stresine göre köklerde POD aktivitesini azaltmıştır (Çizelge 4.11). Kontrol bitkisinin yapraklarındaki POD aktivitesi 823 U.mg^{-1} protein iken, B stresinde bu değer %35 lik bir artışla 1110 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. B+Kitosan (A) uygulamasının B stresine göre POD aktivitesini daha da arttırdığı (%47) belirlenmiştir ($P < 0.05$). Yapraklarda B stresine göre B+Kitosan (B) uygulamasında ise POD aktivitesinde %25’lik bir azalma meydana gelmiştir ($P < 0.05$). Sonuçlar izoenzim profillerinden elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir (Şekil 4.21 ve 4.22).

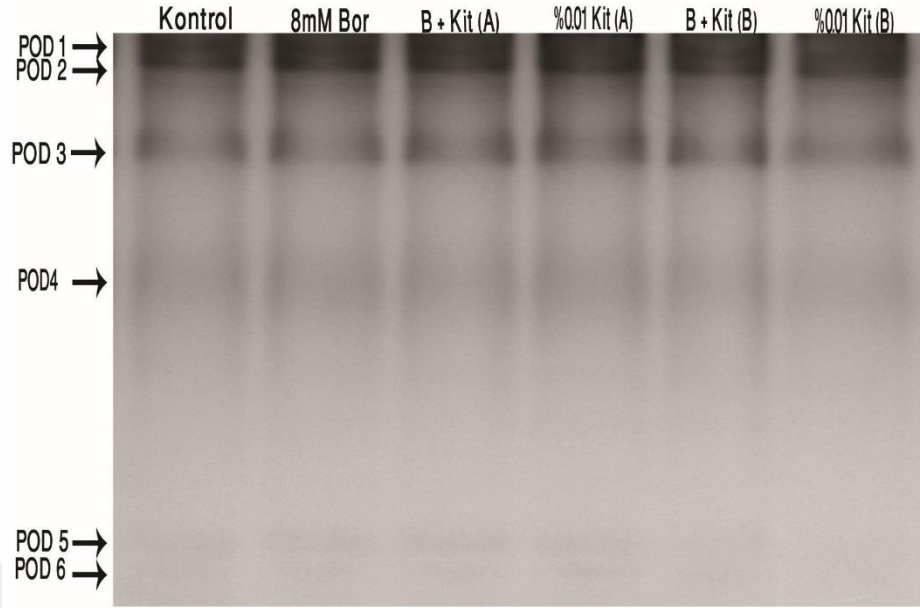
Çizelge 4.11. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Peroksidaz (POD) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi.

Gruplar	POD	
	Kök	Yaprak
Kontrol	$2604 \pm 5.45d$	$823 \pm 6.7c$
8 mM Bor	$3397 \pm 8.25a$	$1110 \pm 11.5b$
8 B + %0.01 KİT (A)	$3104 \pm 31.34b$	$1205 \pm 10.6a$
%0.01 KİT (A)	$2232 \pm 20.6e$	$661 \pm 8.1e$
8 B + %0.01 KİT (B)	$2673 \pm 13.8cd$	$825 \pm 14.3c$
%0.01 KİT (B)	$2656 \pm 11.2c$	$781 \pm 8.6d$

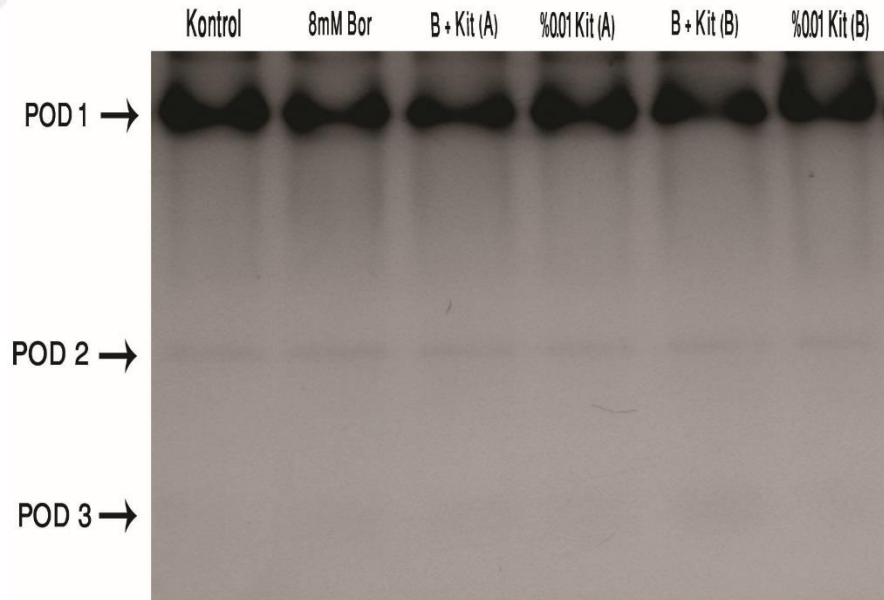
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.20. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Peroksidaz (POD) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.21. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Peroksidaz (POD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.22. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Peroksidaz (POD) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

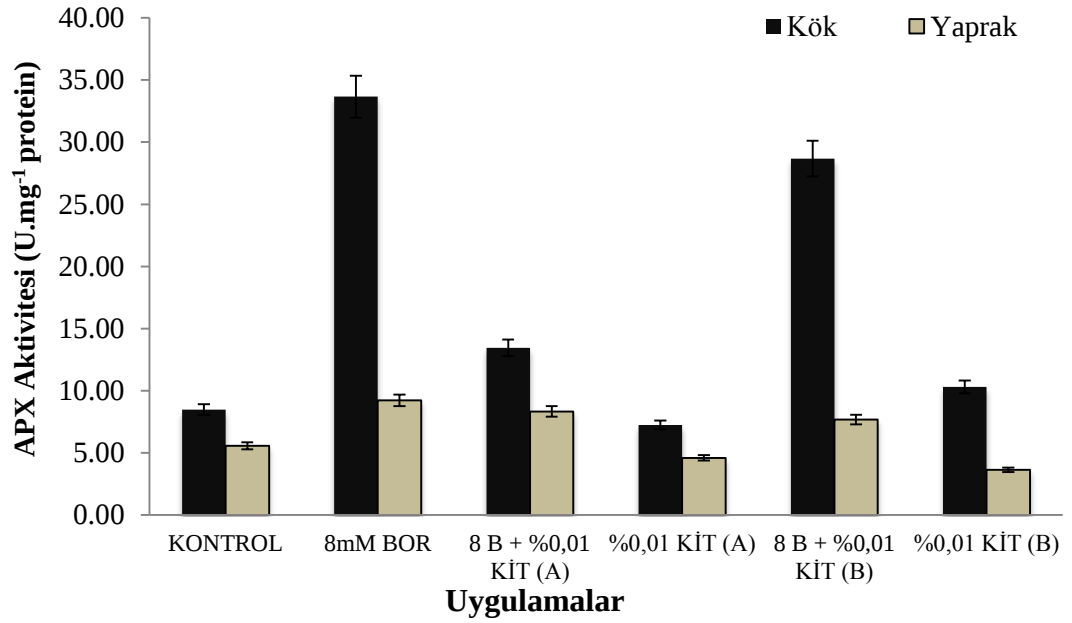
4.9.4. Bor ve kitosan uygulamalarının Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri

B stresi hem kök hem de yaprakta APX aktivitelerinde artışa neden olmuştur ($P < 0.05$). B stresinde kontrol bitkileriyle kıyaslandığında aktivite köklerde kontrole göre 3 kat artarken, yaprakta %65 oranında artmıştır. B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre APX aktivitesini köklerde %60 ve %15 oranında azaltmıştır. Yaprakta B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre APX aktivitesini %5 ve %10 oranında azaltmıştır (Çizelge 4.24). Bulgular yapraklarda izoenzim profillerinden elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir (Şekil 4.16). Köklerde APX izoenzim profillerinden bant elde edilememiştir.

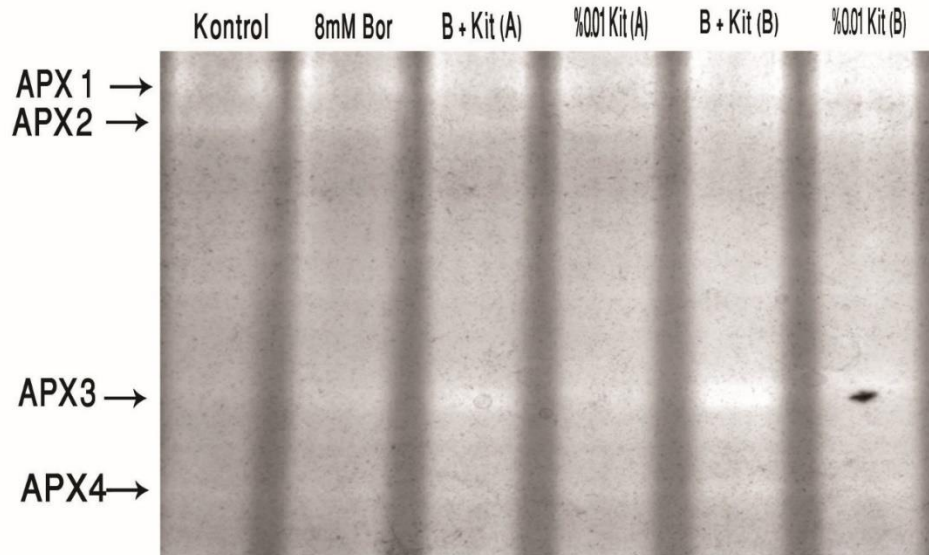
Çizelge 4.12. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	APX	
	Kök	Yaprak
Kontrol	$8.49 \pm 0.10\text{e}$	$5.58 \pm 0.05\text{d}$
8 mM Bor	$33.66 \pm 0.03\text{a}$	$9.22 \pm 0.05\text{a}$
8 B + %0.01 KİT (A)	$13.46 \pm 0.15\text{c}$	$8.34 \pm 0.04\text{b}$
%0.01 KİT (A)	$7.26 \pm 0.03\text{f}$	$4.61 \pm 0.25\text{e}$
8 B + %0.01 KİT (B)	$28.68 \pm 0.06\text{b}$	$7.68 \pm 0.02\text{c}$
%0.01 KİT (B)	$10.32 \pm 0.04\text{d}$	$3.65 \pm 0.01\text{f}$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.23. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.24. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

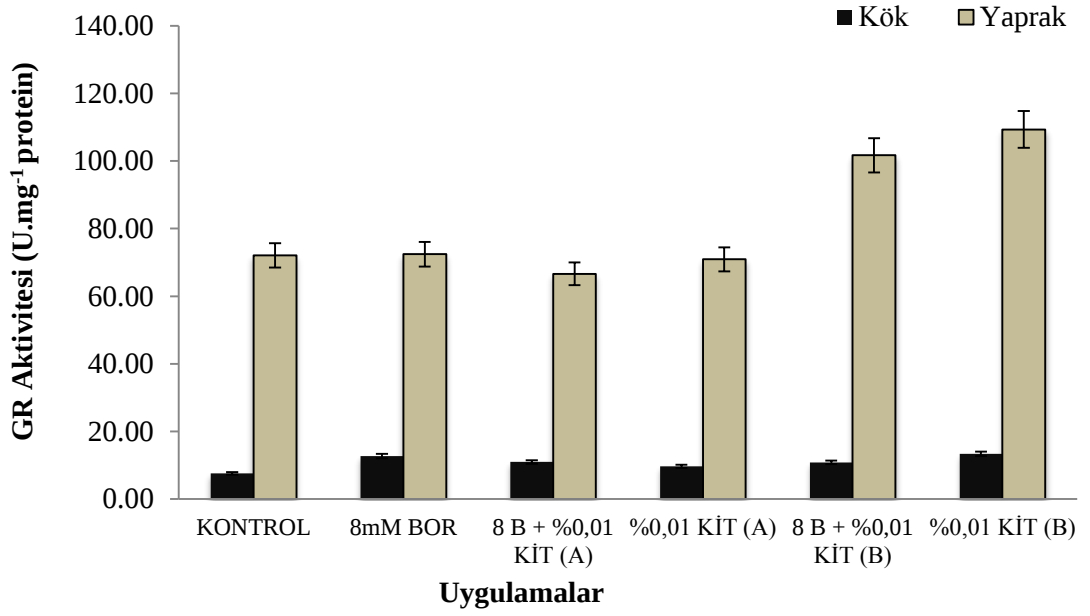
4.9.5. Bor ve kitosan uygulamalarının Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi ve izoenzim profili üzerine etkileri

B stresi köklerde GR aktivitesinde önemli bir artışa neden olurken ($P < 0.05$), yapraktaki artış önemli değildir. B stresinde GR aktivitesi köklerde kontrole göre %67 oranında artmış ve B+Kitosan (A) ve B+Kitosan (B) uygulaması B stresine göre köklerde %22 ve %15 oranında azalmaya neden olmuştur. Yapraklarda GR aktivitesi kontrol bitkilerinde 72.03 U.mg^{-1} protein iken, B stresinde aktivite 72.42 U.mg^{-1} proteine yükselmiştir. Yapraklarda B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre GR aktivitesinde %8 oranında azalışa ve B+Kitosan (B) uygulaması ise B stresine göre %40 oranında artışa neden olmuştur (Çizelge 4.13). Bulgular izoenzim profillerinden elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir (Şekil 4.26 ve 4.27).

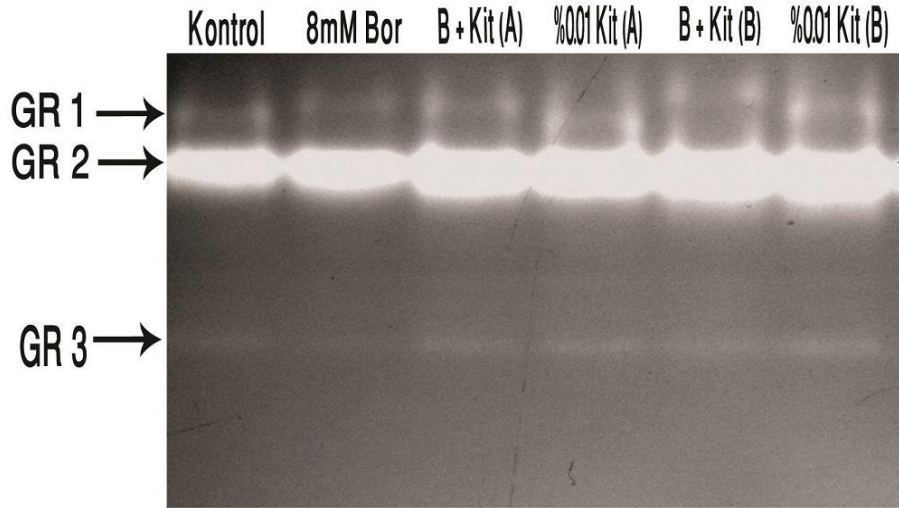
Çizelge 4.13. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi (U.mg^{-1} protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

Gruplar	GR	
	Kök	Yaprak
Kontrol	$7.61 \pm 0.12e$	$72.03 \pm 0.05c$
8 mM Bor	$12.70 \pm 0.13b$	$72.42 \pm 0.07c$
8 B + %0.01 KİT (A)	$10.98 \pm 0.18c$	$66.63 \pm 0.29e$
%0.01 KİT (A)	$9.71 \pm 0.30d$	$70.91 \pm 0.17d$
8 B + %0.01 KİT (B)	$10.84 \pm 0.16c$	$101.67 \pm 0.29b$
%0.01 KİT (B)	$13.40 \pm 0.25a$	$109.32 \pm 0.26a$

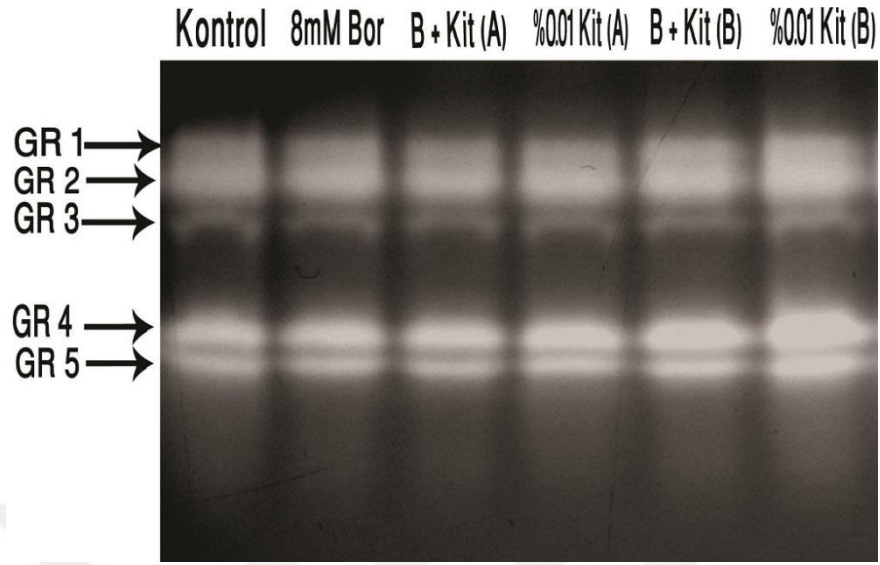
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.25. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin Glutasyon Reduktaz (GR) aktivitesi (U.mg⁻¹ protein) üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.26. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin köklerinde Glutasyon Reduktaz (GR) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.27. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin yapraklarında Glutatyon Reduktaz (GR) izoenzimleri üzerine kitosan uygulamalarının etkisi

4.10. Bor ve Kitosan Uygulamalarının Askorbat ve Glutatyon İçeriğine Etkileri

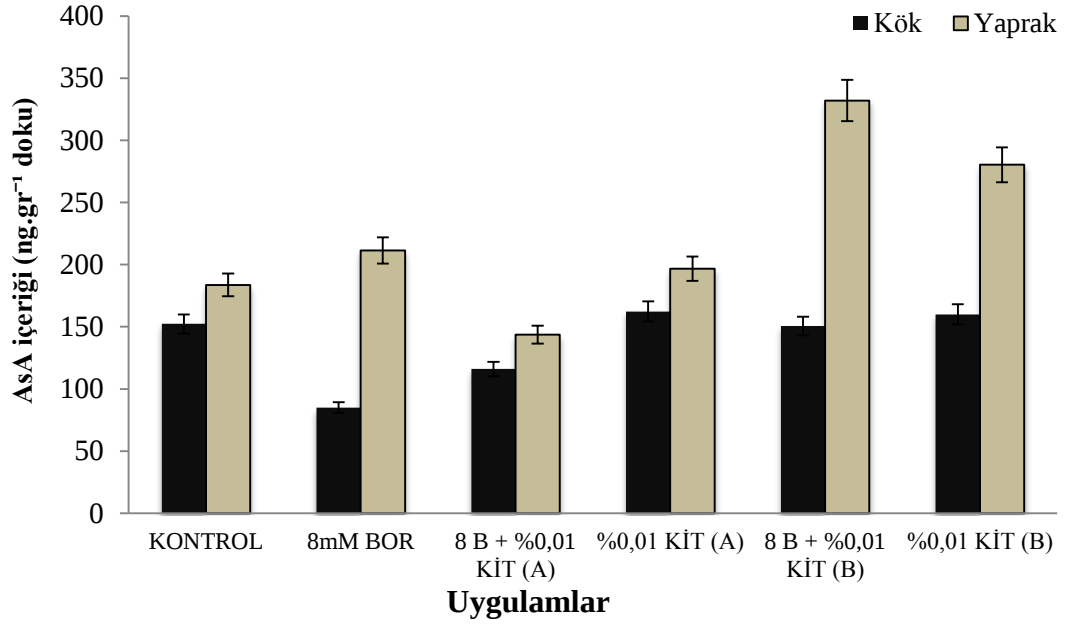
B stresi köklerde askorbat (AsA) ve dehidro askorbat (DHA) içeriğinin azalmasına ($P < 0.05$) neden olurken, yaprakta önemli derecede arttırmıştır. B stresinde kontrol gurubuyla kıyaslandığında AsA içeriği köklerde kontrole göre %44 oranında ve DHA ise %45 oranında azalmıştır. B+Kitosan (A) bor stresine göre köklerde AsA içeriğini %36 ve DHA içeriğini ise %87 oranında arttırmıştır. B+Kitosan (B) uygulaması ile AsA içeriği köklerde B stresine göre %77 ve DHA içeriğini ise %87 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. Yapraklarda AsA içeriği kontrol bitkilerinde 184 nmol.g^{-1} iken, B stresinde 211 nmol.g^{-1} 'a yükselmiştir. B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre yaprakta AsA miktarını 144 nmol.g^{-1} 'a kadar azaltırken, B+Kitosan (B) uygulaması 332 nmol.g^{-1} 'a kadar oldukça önemli oranda arttırmıştır (Çizelge 4.14). Yapraklarda DHA içeriği kontrolde 103 nmol.g^{-1} iken, B stresinde 119 nmol.g^{-1} 'a kadar artmıştır. B+Kitosan (A) uygulaması yaprakta DHA içeriğini düşürürken (91 nmol.g^{-1}), B+Kitosan (B) uygulaması arttırmıştır (198 nmol.g^{-1}) (Çizelge 4.14).

GSH içeriği mısır köklerinde kontrol bitkilerinde 263 nmol.g^{-1} iken, B stresinde 277 nmol.g^{-1} 'a yükselmiştir. B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre GSH'ı 329 nmol.g^{-1} 'a yükselterek %20 oranda bir artışa neden olmuştur. GSH içeriği köklerde B+Kitosan (B) uygulaması ile 219 nmol.g^{-1} olarak ölçülmüş ve B stresine göre %20 oranında azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Mısır yapraklarında glutatyon (GSH) içeriğinde B stresi ve Kitosan (A) ve (B) uygulamaları önemli artışlara neden olmuştur. B stresi yaprakta GSH miktarını kontrole göre %100'den daha fazla arttırmıştır ($P < 0.05$). Yapraklarda B+Kitosan (A) uygulaması GSH içeriğini B stresinden de daha fazla arttırırken, B+Kitosan (B) uygulaması GSH miktarını B stresine göre %50'lik bir oranda azaltmıştır (Çizelge 4.1).

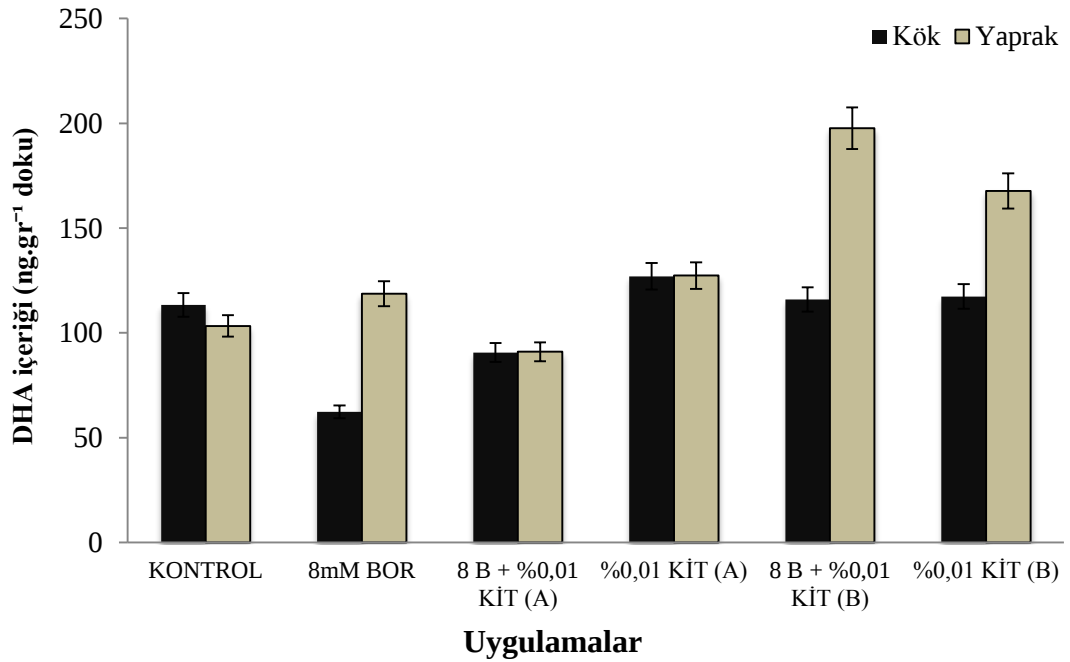
Çizelge 4.14. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin total askorbat (AsA), dehidroaskorbat (DHA) ve glutatyon (GSH) miktarlarına (ng.gr^{-1} doku) kitosan uygulamalarının etkisi.

Gruplar	AsA		DHA		GSH	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	$152 \pm 1.45b$	$184 \pm 0.88e$	$113 \pm 0.33c$	$103 \pm 0.88e$	$263 \pm 0.58c$	$253 \pm 0.26f$
8 mM Bor	$85 \pm 1.15d$	$211 \pm 0.88c$	$62 \pm 0.66e$	$119 \pm 0.88d$	$277 \pm 0.64b$	$578 \pm 0.38b$
8 B + %0.01 KİT (A)	$116 \pm 1.15c$	$144 \pm 0.88f$	$91 \pm 0.33d$	$91 \pm 0.0f$	$329 \pm 0.71a$	$603 \pm 0.37a$
%0.01 KİT (A)	$162 \pm 0.88a$	$197 \pm 0.88d$	$127 \pm 0.57a$	$127 \pm 0.33c$	$276 \pm 0.85b$	$539 \pm 0.17c$
8 B + %0.01 KİT (B)	$151 \pm 1.20b$	$332 \pm 1.73a$	$116 \pm 0.57b$	$198 \pm 0.33a$	$219 \pm 1.24d$	$285 \pm 0.54e$
%0.01 KİT (B)	$160 \pm 1.15a$	$280 \pm 1.45b$	$117 \pm 0.33b$	$168 \pm 0.88b$	$183 \pm 0.78e$	$414 \pm 0.49d$

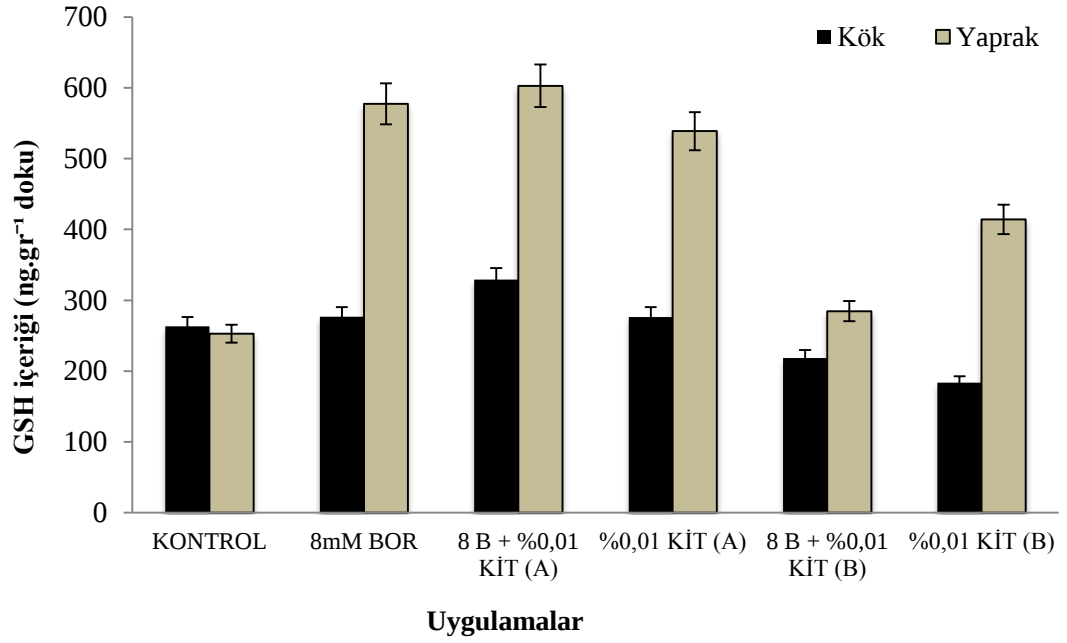
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.28. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin total askorbat (AsA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.29. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin dehidroaskorbat (DHA) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi



Şekil 4.30. Bor toksisitesinde mısır bitkisinin glutatyon (GSH) miktarına kitosan uygulamalarının etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Borun bitkiler için esansiyel bir element olduğu, eksikliği veya fazlalığının çeşitli olumsuz etkilere sebep olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Goldberg 2003; Çamaş 2006; Kekec 2010). Borun sulama suyu ve topraktaki yüksek dozları bitkilerde toksisiteye sebep olup ciddi ürün kayıplarına yol açmaktadır. Ülkemizde bor toksisitesinin yaygın olduğu Orta Anadolu başta olmak üzere kurak-yarı kurak bölgelerde bitkilerde ciddi ürün kayıpları meydana gelmektedir (Staiger and Machelet 1984). Bor toksisitesi ile ilgili olarak domates (Soy and Güneş 2003), buğday (Reid *et al.* 2004), asma (Güneş *et al.* 2006), nohut (Ardıç *et al.* 2009), mısır (Esim *et al.* 2012) ve arpa (Özhuner *et al.* 2013) gibi bitkilerde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bor toksisitesi bitkide morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik birçok olumsuz etkiye neden olmakla birlikte, en önemli etkilerinden birisi, ROT üretimini arttırarak metabolizmanın bozulmasına ve hücrelerde tahribata neden olması ve yüksek miktarlarda uygulanması bitkinin ölümüne kadar giden bir olaydır (Nable *et al.* 1997; Khan *et al.* 1999).

Bu çalışmada mısır bitkisinde yüksek bor konsantrasyonunda meydana gelen strese bağlı protein miktarı, kök ve gövde uzunlukları, kuru madde, karbohidrat miktarı gibi çeşitli büyüme ve gelişme parametrelerindeki değişim, pigment içeriği, bağıl su içeriği, ROT'lar, antioksidant enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POD, APX, GR) gibi çeşitli parametreler belirlenmiştir. B toksisitesinin daha çok mevcut B'un önemli miktarda sitoplazmada birikmesiyle kendini gösterdiği bilinmektedir. Fakat B daha çok hücre çeperinde veya vakuolde bulunursa B'un bitki üzerindeki tahribatının daha az olacağı ifade edilmiştir (Marschner 1995).

Bor toksisitesine maruz bırakılan mısır bitkisinde kök ve gövde uzunluğunun azaldığı tespit edilmiştir (Ogunwole 2015). B stresine maruz bırakılan mısırın hem kök hem de gövde uzunluğu kontrol bitkilerine göre önemli miktarlarda azalma göstermiştir (Şekil 4.1). Toksik konsantrasyonda bora maruz kalmış ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) (Ruiz *et al.* 2003), domates (*Lycopersicum esculentum* L.) (Gunes *et al.* 1999; Alpaslan and

Gunes 2001; Cervilla *et al.* 2007), salatalık (*Cucumis sativus* L.) (Alpaslan and Gunes 2001), kavun (*Cucumis melo* L.) (Goldberg *et al.* 2003), kivi (*Actinidia deliciosa* L.) (Sotiropoulos *et al.* 2003), asma (*Vitis vinifera* L.) (Gunes *et al.* 2006), ahududu (*Rubus idaeus* L.) (Neocleous and Vasilakakis, 2008), elma (*Malus domestica* Borkh) (Sotiropoulos *et al.* 2006; Molassiotis *et al.* 2006), mısır (*Zea mays* L.) (Gunes and Alpaslan 2000), tütün (*Nicotiana tabacum* L.) (Garcia *et al.* 2001), mandalina (*Citrus nobilis* Lour.) (Papadakis *et al.* 2004), arpa (*Hordeum vulgare* L.) (Karabal *et al.* 2003) ve Greyfrut (*Citrus grandis* L.) (Han *et al.* 2009) bitkilerinde büyümenin azaldığı, bitkilerin yaş veya kuru ağırlık yitirdikleri gözlenmiştir.

Kitosanın tek başına uygulandığı bitkilerde büyümeyi arttırıcı bir madde olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Su bitkisi (*Hydrillaverticillata*) (Qiu-jin *et al.* 2007), bamya (Mondali *et al.* 2012), fasulye (Sheikha *et al.* 2015; Ibrahim ve Ramadan 2015), pirinç (Boonlertnirun 2008) ve zerdeçal (Anusuya and Sathiyabama 2016) bitkilerinde yapılmış ve kitosanın bu bitkilerde genel olarak büyümeyi arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada tek başına kitosan (A) ve (B) uygulamalarının bitki uzunluğunu arttırarak bitki büyümesini olumlu yönde etkilediği bilirlenmiştir. Ayrıca B stresine göre B+Kitosan (A) ve (B) uygulamalarının kök ve göve uzunluğunu arttırarak bor toksisitesinin zararlı etkilerini azalttığı da belirlenmiştir (Şekil 4.1).

B stresi mısır kök ve yapraklarında kuru madde kayıplarına neden olmuştur ($p<0,01$) (Şekil 4.2). Buğdayda (Arı baykal 2006), domates ve kabakta (Alpaslan and Gunes, 2001), acı biberde (Lee 2006), mısırdaki (Güneş and Alpaslan 2000), ayçiçeği (Ortaca 2005) ve mung fasulyesinde (Hasnain *et al.* 2011) de B stresinin kuru madde miktarını azlattığı belirlenmiştir. B+Kitosan (A) ve (B) uygulamalarının kuru madde miktarını arttırdığı ve kuru madde kaybına neden olan bor toksisitesine karşın kitosanın iyileştirici etkisi olduğu belirlenmiştir. Kitosan uygulamasının kuru madde artışına neden olması fasulye (Sheikha 2011) ve ajowan (Mahdavi 2013) bitkilerinde de belirlenmiştir.

B toksisitesi altında mısır bitkilerinde bağıl su içeriğinde istatistiksel açıdan önemli

olmayan bir azalma görülmüştür (Şekil 4.3). Toksik miktardaki borun arpa Tokak (bor noksanlığına hassas) ve Hamidiye (bor toksisitesine duyarlı) çeşitlerinde de bağıl su içeriğinde azalma görülmüştür (Keskin 2010). Ardiç, (2006) ve bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmada nohutta bor toksisitesinin yaprak bağıl su içeriğini değiştirmediyini bildirmiştir. B toksisitesi altında bağıl su içeriğinde değişiklik olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Papadakis *et al.* 2004; Güneş *et al.* 2006; Özel 2011). Kitosan uygulamaları ise bağıl su içeriğini kontrol bitkileri seviyesine ulaştırmıştır.

Bitkilerin çeşitli stres koşulları altında stres tolerans mekanizması ile ilişkili proteinler sentezledikleri bilinmektedir (Rauser 1990; Bray 1993; Serrano and Gaxiola 1994; Waters *et al.* 1996; Mahboobi *et al.* 2000; Naqvi *et al.* 2008). Çalışmalar ağır metal toksisitesinde yüksek bitkilerin bakır (Cu), kadmiyum (Cd), çinko (Zn), kurşun (Pb), gümüş (Ag), nikel (Ni), civa (Hg), kalay (Sn), altın (Au), bizmut (Bi), vanadyum (V) ile bileşik oluşturan metal bağlayan polipeptitler sentezlediklerini göstermiştir (Rauser 1990, Öktem 1992). Toksik B konsantrasyonlarının arpa genotiplerinde kök ve yaprak dokularında total protein sayısında ve miktarında artışlara ve azalmalara neden olduğu belirlenmiştir (Mahboobi *et al.* 2000). Bor toksisitesindeki 2 çeşit buğday üzerinde yapılan bir çalışmada protein miktarı bir bitkide artarken diğerinde azalmıştır (Baykal ve Öncel 2006).

Bu çalışmada da bor stresi mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında toplam çözünebilir protein içeriğini azaltmıştır ($P<0.05$). Köklerdeki azalma %21 iken yapraklarda %11 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Stres koşulları altında bitkilerde protein sentezinin azalması, yeni proteinlerin sentezlenmesi ya da mevcut proteinlerin parçalanarak amino asitlere dönüşmesi şeklinde bir savunma mekanizması oluşturabildiği ileri sürülmektedir (Levitt 1972). Tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamalarının toplam çözünebilir protein miktarında hem kök hem de gövde de artışlara neden olduğu, buna bağlı olarakta Kitosan uygulamasının bor toksisitesine karşı olumlu sonuçlara sebep olduğu söylenebilir. Bor+Kitosan (A) ve (B) uygulamalarının her ikisi de toplam çözünebilir protein miktarındaki düşüşü önemli

miktarda azalttığından bor stresinin zararlı etkisini bertaraf ettiği düşünülebilir (Şekil 4.4).

B'un fenolik bileşiklerin içeriğiyle ve fenolik metabolizmasındaki değişmelerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Ruiz *et al.* 1998). Ortario patateslerinde borun yapraklara püskürtülerek uygulamasının fenolik madde miktarını önemli oranda azalttığı belirtilmiştir (Mondy and Munshi 1993). Ayçiçeği bitkisinde yapılan bir çalışma sonucunda; B'un plazma membranları üzerinde özel bir rolü olduğunu ve membran elemanlarını fenoliklerle kompleks oluşturarak koruduklarını ve bunu fenoliklerin oksidasyonu ile yüksek toksik düzeylere ulaşmasını ve serbest oksijen oluşumunu önleyerek yaptıklarını belirtmişlerdir (Çakmak *et al.* 1995). Fenolik miktarın ayçiçeği, domates, marul ve turpta B'un bitkideki konumu ile ters orantılı olduğunu ifade etmişlerdir (Perkins and Aronoff 1956). Bu çalışmada da B stresi hem kök hem de yaprakta kontrol grubuna göre toplam fenolik madde miktarında artışa neden olmuştur (Şekil 4.10). B konsantrasyon artışına paralel olarak fenolik miktarındaki artış B'un hücre çeperi ve vakuolde değil de sitoplazmada biriktiğini göstermektedir. Bu da çözünür fenoliklerin B'a karşı biyokimyasal açıdan dayanıklılıkta rol oynayabileceğini göstermektedir (Dear 1967).

B stresi toplam fenolik madde içeriğini mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında arttırmıştır ($P < 0.05$). Köklerde bu artış %6 iken yapraklarda %10 oranında bulunmuştur. Köklerde B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre toplam fenolik madde içeriğini %29'luk ve B+Kitosan (B) uygulaması ise %39 gibi önemli oranda azaltmıştır (Çizelge 4.6). Yapraklarda B+Kitosan (A) uygulaması B stresine göre toplam fenolik madde içeriğini %9 oranında azaltırken, B+Kitosan (B) uygulaması istatistiksel olarak önemsiz oranda arttırmıştır.

Bitkilerde bor toksisitesi; büyüme, gelişme ve membranların geçirgenliği vb. üzerlerindeki zararlarının dışında oksidatif zarara da neden olmaktadır (Bray *et al.* 2000; Karabal *et al.* 2003). Bitkilerde meydana gelen stresin sonucunda artan oksidatif stresin önemli bir göstergesi membran lipidlerinin (doymamış yağ asitlerinin) peroksidasyonu

ile son ürün olarak oluşan ortamdaki malondialdehit (MDA) miktarına göre tayin edilmektedir (Eltner and Ossiviold 1984; Posmyk *et al.* 2005). LPO düzeyi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hem de yansıması olarak kabul edilmektedir (Neto *et al.* 2006). Oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkus, 1995). Bu çalışmada uygulanan toksik bor konsantrasyonu mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında MDA da önemli artışlara sebep olmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.22). Bor toksisitesine maruz bırakılan mercimek ve arpada da kontrol bitkilerine göre MDA miktarında artışlar olduğu belirlenmiştir (Karabal *et al.* 2003; Tepe ve Aydemir 2011). Aşırı bor uygulanan domatestede (Cervilla *et al.* 2007), elma kök sürgünlerinde (Molassiotis *et al.* 2006) ve asmada (Gunes *et al.* 2006) MDA miktarının arttığı, arpada ise gövdede artış göstermekle birlikte, kökteki MDA miktarının azaldığı rapor edilmiştir (Karabal *et al.* 2003). Bor toksisitesine karşı Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kök ve yapraklarda MDA seviyesinde önemli azalmalara neden olarak toksisiteye karşı bitkinin tolerans geliştirmesine yardımcı olmuştur. Kitosan uygulamalarının lipid peoksidasyonunu zararlı seviyeden çok daha düşük seviyelere indirdiği saptanmıştır. MDA seviyesinin düşmesinin bir nedeni de uygulanan kitosanlar ile artan SOD aktivitesinin (Şekil 4.15) etkisiyle özellikle O_2^- radikalının dismutasyona uğraması olabilir. Çalışmada kitosan uygulamalarının (özellikle de köklerde Kitosan (B)) hücrelerde oluşan oksidatif hasarların önemli bir göstergesi olan MDA seviyesini düşürmesi, bitki canlılığında hücre bütünlüğünü için son derece önemlidir. Bu bakımdan da hücre bütünlüğünü sağlayabilen bir bitki stres şartlarında daha çok adaptasyon yeteneği kazanacaktır.

Borun bitkilerde ROT'ların artışına neden olması konusunda zıt fikirler sunan çalışmalar mevcuttur. Esim *et al.* (2013) bor stresine maruz kalan mısır bitkilerinde ROT oluşumunun önemli derecede arttığını bildirirken, Karabal *et al.* (2003) arpada ROT miktarının artışında borun herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmiştir. Bu çalışmalardaki farklı veriler bitki ve uygulama farklılıklarından kaynaklanabilir. Bu çalışmada da ölçülen yüksek ROT miktarı borun tilakoid membranlardaki tahribatından kaynaklanmış olması muhtemeldir (Kohl HC and Oertli 1961). Süperoksit anyonu (O_2^-), stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden

olan bir ROT ürünüdür. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırılmalarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan *et al.* 2005; Asada 2006). Kontrol bitkilerine göre bor uygulanan bitkilerde süperoksit anyonunun konsantrasyonu ve H_2O_2 içeriği ciddi derecede artırmıştır.

Mevcut çalışmada tek başına bor, kontrole göre, kök ve yapraklarda içsel O_2^- miktarını arttırmıştır (Şekil 4.13). Bu durum, bor stresi esnasında metabolizmada oksijenin kullanıldığı yerlerde büyük bir dengesizlik olduğuna ve oksidatif stresi tetikleyen O_2^- anyonu üretiminde çok hızlı bir artışa işaret eder. Daha önce yapılan çalışmalarda da patates ve mısır gibi bitkilerinin bor toksisitesine maruz kaldıklarında O_2^- miktarının arttığı rapor edilmiştir (Luis *et al.* 2012; Esim *et al.* 2013).

Diğer taraftan, bor stresinden önce kitosan uygulamaları tek başına B uygulamasına göre O_2^- miktarını hem kök hem de yapraklarda önemli oranda düşürmüştür (Şekil 4.13). Bu sonuç, bor stresi öncesinde uygulanan kitosanların bitkiyi oksidatif hasara karşı hazırladığına ve bitki bor stresıyla karşılaştığında ROT'lardan kaynaklanan oksidatif hasarı yatıştırdığına işaret eder. Bor toksisitesine karşı uygulanan kitosan'ın O_2^- miktarı üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak yapılan diğer bir çalışmada mısır bitkisinde soğuk stresine karşı kitosan uygulamasında MDA seviyesini azaltarak ve CAT ve POD aktivitesini artırarak oksidatif hasarı azalttığı tespit edilmiştir (Guan *et al.* 2009). Stres şartlarında artan O_2^- miktarı özellikle membran hasarlarına neden olmaktadır. Uygulanan kitosan ile azaltılmış O_2^- miktarı ya daha az zararlı olan peroksinitrite dönüştürülmüş ya da aktivitesi artan SOD enzimi ile dismutasyona uğramış olabilir. Azalmış olan O_2^- miktarı membran yapısına zarar veremeyeceğinden hücre bütünlüğü korunmuş olur. Bunun sonucunda hücre canlılığını koruyabilir ve bitki bir bütün olarak strese karşı tolerans gösterebilir. Çalışmanın sonuçları kitosanın her iki şekilde uygulanmasının da bor toksisitesi altındaki mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında O_2^- miktarını azaltarak oksidatif stres zararından korumaya önemli bir katkı yaptığını göstermektedir.

Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir sinyal olarak kullanılan H_2O_2 , düşük seviyelerde bitki savunma sisteminin uyarılmasına, yüksek miktarlarda ise dokularda oksidatif hasarlara, yani strese neden olmaktadır (Liu *et al.* 2010). Mevcut çalışmada, mısır bitkilerine tek başına bor uygulaması, kontrol grubuna göre H_2O_2 miktarını arttırmıştır (Şekil 4.13). Arpa, salatalık, asma ve domates bitkisinde yapılan çalışmalarda da B toksisitesine bağlı olarak H_2O_2 miktarında önemli derecede bir artış görülmüştür (Karabal *et al.* 2003; Gunes *et al.* 2006; Cervilla *et al.* 2007; Wang *et al.* 2010). Bu artış bitkide birçok fizyolojik ve metabolik işlevlerin bozulmasına yol açan ve dolayısıyla bor toksisitesi esnasında bitkiye zarar veren mekanizmalardan birisidir. Çalışmada bor toksisitesi öncesi uygulanan kitosan uygulamaları, bor stresi uygulamasıyla karşılaştırıldığında, hem kök hem de yapraklarda H_2O_2 miktarında önemli derecede azalmalar sağlamıştır (Şekil 4.13). Aynı zamanda özellikle köklerde Kitosan B ve yapraklarda Kitosan A uygulamaları H_2O_2 'yi süpüren antioksidan enzimlerden CAT aktivitesini arttırmıştır. İncelemelerimize göre, literatürde bor toksisitesine maruz bırakılan bitkilerde kitosanın H_2O_2 içsel seviyesi üzerine etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma belirlenememiştir. Bu bulgulara göre, mısır bitkisinde bor toksisitesi ile artan H_2O_2 miktarının, bor stresi öncesi uygulanacak kitosan ile önemli derecede azaltılabileceği ve bu yolla oksidatif strese karşı bitki toleransının artırılmasına önemli katkı sağlanabileceği ileri sürülebilir.

Buğday (Aktaş *et al.* 2004; Neocleous and Vasilakakis 2008), greyfrut (Han *et al.* 2009), havuç (Demiray ve Dereboylu 2005), arpa (Nable *et al.* 1997), armutda (Wang *et al.* 2011), portakalda (Keles *et al.* 2004), kirazda (Sotiropoulus *et al.*, 2006), kivide (Larsson *et al.* 1998) ve kanolada (Lovatt and Bates 1984) yapılan yüksek oranda bor uygulamasının klorofil miktarını azalttığı tespit edilmiştir. B toksisitesinin bitkilerin yeşil aksam büyümesini engelleyen bir mikroelement problemi olduğunu ve özellikle bitki boyunun uzamasını ve yeşil aksam gelişmesini durdurduğu, yaprak alanının azaldığı mısırdaki (Birnbau *et al.* 1974), pekan cevizinde (Picchioni and Miyamoto 1991), mung fasulyesinde (Hasnain *et al.*, 2011) ve domates bitkisinde (Cervilla *et al.* 2012) tespit edilmiştir (Paul *et al.* 1990; Alkan 1998). Papadakis *et al.* (2004) B uygulamasının mandarin bitkisinde klorofil miktarını ve kloroplastların büyüklüğünü

azaltırken, yapısında bir değişiklik oluşturmadığını bildirmişlerdir. (Demiral 2003). B stresi altında klorofil miktarındaki azalışın; bu radikaller tarafından klorofil moleküllerinin parçalanması sonucunda olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Salin 1987; Streb and Feirabend 1996). Yapılan çalışmada da 8 mM bor uygulaması toplam klorofil miktarını kontrole göre yaklaşık %16 azaltmıştır (Çizelge 4.4). Stres faktörlerine maruz kalınması sonucunda, serbest oksijen radikallerinin üretim ve miktarının artması ile hücre zarı ve işlevleri büyük zarar görmektedir. B stresinde klorofil miktarındaki azalma sentezinin azalmasından veya artan ROT un klorofilin yapısını bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kitosan A ve B uygulamaları 8 mM borun etkisi ile azalan klorofil miktarını arttırmıştır, özellikle Kitosan (A) (Şekil 4.7). Bor stresi altındaki bitkilerin azalan klorofil miktarı ile kitosanın uygulandığı her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak kuraklık stresi altındaki fasulye bitkilerine kitosan uygulandığı zaman klorofil miktarının arttığı tespit edilmiştir (Abu-Muriefah 2013). Ayrıca kitosanın klorofil miktarını arttırdığı salatalık, turp ve börülce bitkilerinde rapor edilmiştir (Farouk *et al.* 2008; 2011; 2012). Sonuç olarak, Kitosan A ve B uygulamalarının klorofil miktarını arttırarak bitkinin maruz kaldığı B stresinin zararlı etkilerini azalttığı söylenebilir (Şekil 4.7 ve 4.8).

Prolin, bitkilerde stres koşullarında meydana gelen serbest radikalleri süpürücü, su stresini dengeleyen ve proteinlerin kararlılığını sağlayan bir osmolit ve antioksidan olarak görev yapmaktadır (Jain *et al.* 2001; Zhu 2001; Khaled *et al.* 2003). Çalışmada kontrol bitkileri ile kıyaslandığında 8 mM bor uygulamasında köklerde prolin miktarı azalırken (%29), yapraklarda artmıştır (%19) (Şekil 4.11). B toksisitesine toleranslı nohutta (*Cicer arietinum* L. Gökçe) (3 kattan fazla) ve makarnalık buğdayda prolin miktarında kontrole oranla artış görülmüştür (Rascio *et al.* 1994). Eraslan *et al.* (2007)'un yaptığı bir çalışmada, bor uygulamalarının havuç bitkisinde prolin miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bor stresine maruz kalan mısır bitkisinde prolin içeriğinin arttığına dair araştırmalar da yer almaktadır (Turan and Aydın 2005). Bor toksisitesine maruz kalan mısır bitkisinin köklerindeki prolin azalışı, B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları ile yenilmiştir. Prolinin stres durumlarındaki olumlu rolleri göz önüne alındığında Kitosanın B stresine karşı köklerde olumlu sonuçlara neden olduğun

söylenbilir. Yapraklarda B stresinde görülen prolin artışı B+Kitosan (A) ve (B) uygulamalarıyla azaltılmıştır (%23) (Şekil 4.11).

Bor karbonhidrat metabolizmasında yaptığı bileşikler sayesinde hem eksikliğinde hem de toksisitesinde karbohidrat miktarında artışa neden olmaktadır (Brown and Hu 1996). Bor toksisitesine maruz bırakılan fıstık bitkisinin (*Pistacia vera*) yapraklarında toplam çözünür şeker miktarının artış gösterdiği belirlenmiştir (Brown ve Hu 1996; Ortaca 2005). Hücre özsuyu osmotik yoğunluğunun düzenlenmesinde rol oynayan ve koruyucu moleküller olarak tanımlanan şekerler özellikle stres koşullarında meydana çıkan bileşikler olarakta bilinmektedirler. Hücre dehidrasyonunu engellemede önemli role sahip olan çözünür karbohidratların bitki yapraklarında yeterli miktarda bulunması, prolin oksidasyonunu önlemektedir (Oaks *et al.* 1970). Bu prolin birikiminin çözünür karbohidrat ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Buna dayanarak, şekerlerin serbest prolin sentezini sağlayan öncü maddeler olarak rol oynadıkları kabul edilmektedir (Stewart 1978). Yapılan diğer bir çalışmada, B toksisitesine dayanıklı (toleranslı) ve Duyarlı 2 çeşit buğdayda toplam karbohidrat ve prolin miktarında artışlar tespit edilmiş, B toksisitesinin belirlenmesinde serbest prolin ve çözünür karbohidrat miktarının önemli olduğu ve B toksisitesine karşı oluşturulan biyokimyasal adaptasyonda serbest prolin ve çözünür karbohidratların ilişkili olabileceğini savunulmuştur (Başlat *et al.* 2011). Çalışmada 8 mM bor uygulaması mısırın kontrolüne göre köklerde toplam şeker miktarını azaltırken, yapraklarda 1.5 kat arttırmıştır (Şekil 4.9). Köklerde karbohidrat miktarındaki azalma Kitosan A ve B uygulamalarıyla yenilmiş ve kontrol bitkileri seviyelerine ulaşmıştır (Şekil 4.9). Yapraklarında ise uygulanan Kitosan A toplam karbohidrat miktarını arttırırken, Kitosan (B) uygulaması azaltmıştır (Çizelge 4.5). Yapraklardaki çözünür karbohidrat ve serbest prolin ile ilişkili olarak sonuçlar göz önüne alındığında çözünür karbohidratların prolin sentezini sağlayan öncü maddeler olduğunu ileri süren Stewart (1978)'in görüşlerinin desteklendiği söylenebilir.

Bitkiler aktif oksijen türlerinin fizyolojik üretimini kontrol etmek için birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalara sahiptirler. SOD, süperoksit radikallerinin süpürülmesinden sorumlu olan ve oksijenli solunum yapan hücreler için

anahtar bir antioksidant enzimdir (Asada 1999). Cu/Zn-SOD'un kloroplastlarda oksidatif strese yol açan süperoksit radikalini süpürme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. B stresinde mısır bitkilerinin kontrolüne göre hem kök hem de yapraklarda SOD artışı görülmüş ve B stresine maruz bırakılan iki arpa çeşitinde (Karabal *et al.* 2003), iki farklı domates çeşitinde (Cerville *et al.* 2007), elma kök sürgünlerinde (Molassiotis *et al.* 2006; Sotiropoulos *et al.* 2006), asma bitkisi yapraklarında (Gunes *et al.* 2006) ve greyfrutta (Han *et al.* 2009) ölçülen SOD aktivitesinin artış gösterdiği rapor edilmiştir. B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları bor stresinde artan SOD miktarında azalmalara neden olmuştur (Şekil 4.15). SOD aktivitesine ait bu bulgular elektroforetik izoenzim profilinin belirlendiği jeller üzerinde de görülmektedir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

CAT hücresel zararı önlemede rol alan en etkili antioksidant enzimlerden birisidir (Scandalios 1993). Mevcut çalışmada B uygulamasında CAT aktivitesi kontrole göre hem kök hem de yapraklarda azalmıştır. Toksik B uygulamalarıyla elma kök sürgünlerinde (Molassiotis *et al.* 2006), patates bitkisinde (Ayvaz *et al.* 2015), *Citrus grandis* L. Bitkilerinde (Han *et al.* 2009) ve armut yapraklarında da (Wang *et al.* 2011) CAT aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. B+Kitosan (A) uygulaması CAT aktivitesini hem kök hem de yaprakta arttırırken, B+Kitosan (B) uygulaması bor stresine göre köklerde CAT aktivitesini arttırırken, yapraklarda azaltmıştır (Şekil 4.18). Düşük sıcaklık şartlarında mısırdaki kitosan uygulaması CAT aktivitesinde artışlara neden olmuştur (Guan *et al.* 2009).

Peroksidazlar sadece üretilen H₂O₂'in uzaklaştırılmasında değil, aynı zamanda büyüme ve gelişimle ilgili bazı süreçlerde de görev almaktadırlar (Dionisio-Sese and Tobita 1998). Kontrol bitkilerine göre POD aktivitesi bor stresinde artış göstermiştir. Çalışma bulguları POD aktivitesinin stres koşullarında arttığını belirten çalışmalarla uyumludur (Lopez *et al.* 1996; Renard *et al.* 1997). Bor stresi altındaki tarhunda POD aktivitesinde artışlar gözlenmiştir (Karabal *et al.* 2003; Aaftab *et al.* 2010). B+Kitosan (A) yapraklarda bu aktiviteyi daha da arttırırken, köklerde azaltmıştır. B+Kitosan (B) uygulaması ise hem kök hem de yaprakta bor stresindeki artışa göre POD aktivitesini

düşürmüştür (Şekil 4.20). Düşük sıcaklık şartlarındaki mısırdaki da kitosan uygulaması POD miktarında artışlara neden olmuştur (Guan *et al.* 2009). Kuraklık stresine maruz bırakılan gene otunda da POD aktivitesi kitosan uygulamasıyla artmıştır (Karimi *et al.* 2009). POD aktivitesine ait bu bulgular elektroforetik izoenzim profilinin belirlendiği jeller üzerindede kök ve yaprakta görülmektedir (Şekil 4.21ve Şekil 4.22).

APX, H_2O_2 'yi suya çeviren ve toksisitesinin yok edilmesinde rol alan en önemli peroksidazdır (Foyer and Halliwell, 1976; Noctor and Foyer, 1998). Çalışmada B toksisitesine maruz kalan mısır bitkisinin hem kök hem de yapraklarında kontrole göre APX aktivitesinde önemli bir artış olduğu ve bu artışın köklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Toksik bor stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde (Cerville *et al.* 2007), arpada (Karabal *et al.* 2003), greyfrutta (Han *et al.* 2009), patates bitkisinde (Mondy and Munshi 1993), asma anaçlarında (Ersöz 2009), acı biberde (Lee 2006) ve porakal bitkisinde (Keles *et al.* 2004) ve armut yapraklarında da (Wang *et al.* 2011) APX aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı rapor edilmiştir. B+Kitosan (A) ve (B) uygulamaları hem kök hem de yapraklarda APX aktivitesini bor stresine göre azaltmıştır. Tek başına Kitosan (A) uygulaması APX aktivitesini kök ve yapraklarda kontrole göre azaltırken, Kitosan (B) uygulaması bu miktarı kökte arttırmış ancak yapraklarda azaltmıştır (Şekil 4.23). Askorbat peroksidaz aktivitesine ait bu bulgular elektroforetik izoenzim profilinin belirlendiği jeller üzerindede yaprakta görülmektedir (Şekil 4.24).

Glutasyonun (GSH) metabolik düzenleyici ve antioksidan olarak oynadığı birçok rol, onun glutasyon disülfite (GSSG) okside olmasıyla açıklanmaktadır (Noctor and Foyer, 1998). Okside olmuş glutasyonun (GSSG), GSH'a indirgenmesi önemli bir antioksidan enzim olan GR tarafından NADPH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon sonucunda ortamda hidroksil radikalının varlığı azalır ya da oluşumu engellenir (Madhava Rao and Sresty 2000). Mevcut çalışmada tek başına B stresi kontrole göre köklerde GR aktivitesini arttırmış, yapraklarda ise önemli bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.25). B toksisitesine toleranslı nohutta (*Cicer arietinum* L. Gökçe) ve arpada GR'de artış görülmüştür (Karabal *et al.* 2003). B stresine maruz kalan *Citrus grandis* L.

bitkilerinde de GR aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir (Han *et al.* 2009). Wang *et al.* (2011) armut yapraklarında artan B konsantrasyonunda GR aktivitesinin önce arttığı daha sonra azaldığını belirtmişlerdir. Tek başına bor uygulamasına göre B+Kitosan (A) ve (B) uygulamasıyla aktivitede köklerde düşüş, yapraklarda ise B+Kitosan (A) da azalma ve B+Kitosan (B) de ise artış göstermiştir (Şekil 4.25).

Tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamaları kontrol bitkilerine göre köklerde GR aktivitesini oldukça önemli miktarlarda arttırmıştır (Şekil 4.25). Yapraklarda ise Kitosan (A) uygulaması GR aktivitesinde azalmaya neden olurken, Kitosan (B) bu aktiviteyi arttırmıştır. Çalışmada B stresi altında kitosan etkisiyle GR aktivitesinin artışı ile aynı koşullarda içsel GSH'nın artması (Şekil 4.30), elde edilen bulguların güvenilirliğini desteklemektedir. Çünkü sonuçlardan görüldüğü gibi hücrelerde GR aktivitesinin artışı, GSH fazlalığına neden olacaktır. Bu olay, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz gibi diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri için gerekli GSH'ı üretmesi bakımından önemli olup bitkinin antioksidan kapasitesinin artırılmasında en büyük katkıyı yapacaktır (Alvarez *et al.* 2005). GR aktivitesine ait bu bulgular elektroforetik izoenzim profilinin belirlendiği jeller üzerinde kök ve yaprakta görülebilmektedir (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).

Canlı hücrelerindeki ROT oluşumu hem normal hem de stres şartlarında ve süpürülmesi arasındaki denge enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizma ile birlikte sağlanır (Noctor and Foyer 1998). Enzimatik olmayan antioksidan mekanizma askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi redoks düzenleyici metabolitlerle sağlanır. GSH, canlı hücrelerin plazmatik bölmelerinde düşük konsantrasyonlarda (μM) bulunan düşük molekül ağırlıklı önemli bir tioldür (Foyer and Noctor 2005). Merkezinde yer alan sistein grubundan dolayı glutatyon, okside ya da redükte hale dönüştürülebilir. Bu nedenle glutatyon hücrede, ya indirgenmiş glutatyon (GSH) ya da okside olmuş glutatyon disülfid (GSSG) olarak bulunmaktadır. Hücredeki okside ve indirgenmiş glutatyonların dengesinin sağlanması canlı hücrelerinde sinyal iletim yolunun devamlılığı için son derece önemlidir. Literatürdeki pek çok çalışmaya göre hücredeki GSH seviyesinin artışı, biyotik veya abiyotik streslere toleransı arttırdığı

yönündedir. Örneğin, kuraklık stresinde ayçiçeği fidelerinde GSH seviyesinin ve AsA-GSH döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin artmasıyla hücrelerdeki oksidatif hasarın engellendiği rapor edilmiştir (Sgherri and Navari-Izzo 1995). GSH miktarı B stresinde kontrol bitkilerine göre hem kök hem de yapraklarda artmış (Şekil 4.30), yapılan bir başka araştırmada da, bor stresine uğratılan iki domates çeşitinden birinde glutatyon miktarı artış gösterirken, diğer çeşitte anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Cervilla *et al.* 2007). B+Kitosan (A) uygulaması bora göre GSH miktarı kök ve yapraklarda daha da artmıştır. B+Kitosan (B) da ise B stresine göre GSH miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Tek başına Kitosan (A) kontrol bitkilerine göre GSH miktarını hem kök hem de yapraklarda arttırmıştır. Tek başına Kitosan (B) ise köklerde GSH da azalma ve yapraklarda artışa neden olmuştur (Şekil 4.30). Mevcut araştırmada özellikle yapraklarda tek başına bor uygulamasına göre Kitosan (A)'nın GSH oranını artırması mısır bitkisinin toksik bora karşı toleransta etkili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.30).

Askorbik asit (AsA), GSH gibi ROT'ların aşırı birikimi sonucu hücrelerde meydana gelen hasarı engelleyen güçlü ve suda çözünebilir bir antioksidandır (Zhou *et al.* 2008). Tüm bitkisel dokularda oluşmasına rağmen genellikle fotosentetik ve meristematik hücrelerde daha yüksek oranda bulunur. AsA, normal koşullar altındaki bitkilerin yaprak ve kloroplastlarında çoğunlukla indirgenmiş formda bulunur. Toplam AsA'nın %30-%40'ı kloroplastta ve stromada bulunur (Smirnoff 2000). AsA, enzimatik ve enzimatik olmayan birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak görev yaptığından güçlü bir ROT süpürücüsü olarak kabul edilmektedir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikallerinin süpürülmesi ve tokoferoksil radikalinden alfa-tokoferol'un yeniden oluşumunda rol oynamasından dolayı hücre membranlarının korunmasını sağlayabilir. AsA'nın AsA-GSH döngüsündeki görevine ek olarak prostetik geçiş metal iyonlarını içeren enzimlerin aktivitelerinin korunmasında da önemli rol oynarlar (Noctor and Foyer 1998). Yang vd (2005) yüksek ışık ve kuraklık koşullarında *Cassia tora* fidelerinde AsA miktarının arttığını rapor etmişlerdir. Benzer olarak Agarwal (2007)'da UV-B stresine bağlı olarak *Cassia angustifolia* fidelerinde AsA'nın arttığını rapor etmiştir. Bor bitkilerde AsA gibi birçok bileşiği üretme yeteneğini önemli ölçüde

etkileyebilir (Gunes *et al.* 2006; Eraslan *et al.* 2008). AsA içeriğinde artış patates ve portakalın yapraklarında (*Citrus grandis*) yüksek bor uygulamasından sonra belirlenmiştir (Mondy and Munshi 1993; Keles *et al.* 2004). Eraslan *et al.* (2007a) 5 µM bor içeren besi çözeltisinde yetiştirilen havuç bitkisinin hem kök hem de yapraklarında AsA miktarında azalma tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada da AsA miktarı tek başına bor uygulamasında kontrole göre köklerde azalmış, ancak yapraklarda artmıştır. B+Kitosan (A) grubunda tek başına B uygulamasına göre kökte önemli oranda artmış ancak yapraklarda azalmıştır (Şekil 4.28). B+Kitosan (B) uygulamasında ise tek başına B stresine göre hem kök hem de yapraklarda önemli miktarlarda artış göstermiştir. Tek başına Kitosan (A) ve (B) uygulamaları AsA miktarını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Bitkilerdeki AsA artışı, strese toleranstaki artışla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgulara göre, mısır bitkisine B stresi öncesinde uygulanan kitosan, enzimatik olmayan sistem parametrelerinden hem GSH hem de AsA seviyelerini arttırarak, enzimatik antioksidan sisteme destek olarak, bitkinin antioksidatif kapasitesini artırdığı söylenebilir.

5.1. Sonuç

Araştırmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- 1) Mısır bitkisinde (*Zea mays* L. cv. Hido) büyüme ve gelişme üzerinde %50 inhibisyona neden olan bor (H_3BO_3) konsantrasyonunun 8 mM olduğu ve bu konsantrasyonun sebep olduğu toksisitenin yatıştırılmasında en uygun kitosan A ve B konsantrasyonunun %0.01 olduğu belirlenmiştir.
- 2) Bor stresıyla mısır bitkisinin büyüme parametreleri (kuru ağırlık ve bitki uzunluğu) azalmıştır. Azalan büyüme parametrelerinin kitosanın 2 farklı uygulamasıyla; yapraktan püskürterek (Kitosan A) ve hidroponik ortama ilave ederek kökten (Kitosan B) iyileştirilmesi, kitosan'ın MAP kinazları aktive ederek büyüme parametrelerinde olumlu yönde etkiye sahip olmasıyla ilgili olduğu düşünülebilir.
- 3) BOR stresi, mısır fidelerinde çalışılan ROT seviyelerinin toksik düzeye çıkmasına neden olmuştur, ancak stres öncesi fidelere uygulanan Kitosan ROT seviyelerini

düşürmüştür.

- 4) Lipid peroksidasyonu (MDA) B uygulamasıyla artmış, ancak kitosanın her iki uygulama şekli MDA seviyesini düşürmüştür
- 5) B uygulaması, genelde pigment ve protein içeriğini düşürmüştür. B stresinin bu olumsuz etkisi B stresi öncesi uygulanan Kitosan (A) ve (B) uygulamalarıyla iyileştirilebilmiştir.
- 6) B toksisitesine dayanıklılık noktasında çözünür fenolik ve çözünür protein miktarında meydana gelen değişimlerin tolerans mekanizmasıyla ilişkili olabileceği söylenebilir.
- 7) Bu çalışmada B stresi altında kök ve yaprakta SOD, CAT, POD, APX ve GR aktiviteleri ve izoenzimleri belirlenmiştir. SOD, POD, APX ve GR aktiviteleri artmış CAT aktivitesi azalmıştır. Aktivite sonuçları izoenzimlerdeki sonuçlarda uyumludur. Kitosan uygulamaları ise B stesi altında meydana gelen SOD, POD, APX ve GR aktivitelerindeki artışı düşürmüş, CAT aktivitesini ise arttırmıştır.
- 8) Sonuç olarak, mısır bitkisine bor stresine maruz kalmadan önce uygulanan kitosan uygulamaları, büyümeyi tetikleyici bir madde olarak bitkide çalışılan fizyolojik, biyokimyasal parametreler ile bitki toleransının artırılmasına önemli bir katkı yaptığı belirlenmiştir.
- 9) Toksik seviyede bor içeren tarım alanlarında bor miktarının azaltılması için; düşük bor içeren sularla sulama yapılması, kalsiyum, azot, kireç, sülfatça zengin maddelerin ortama ilave edilmesi veya bor toleransı yüksek bitki çeşitlerinin ekilmesi önerilir.
- 10) Bu amaç için kullanılan kitosanın toksik olmaması, biyouyumluluğu (vücuttaki önemli fonksiyonel karbohidratlarla (hyalüronik asit, mukopolisakkaritler) uyumludur) ve biyobozunurluğu, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal biyoetkilerinin varlığından dolayı şu ana kadar strese karşı uygulanan zararlı kimyasallar yerine kullanılmasının uygun olacağı ileri sürülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abu-Muriefah, SS., 2013. Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. international research journal of agricultural science and soil science, 3,192–199.
- Acar, O., 1999. Kurağa dayanıklı bazı arpa (*hordeum* spp.) çeşitlerinde süperoksit dismutaz (sod) aktivitelerinin araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Adriano, DC., 1986. Trace elements in the terrestrial environment. 533 Seiten, 99 Abb., zahlr. Tab. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo. Preis: 228, - DM.
- Aftab, T., Masroor, AM., Idrees, MK., Naeem, M., Hashmi, N. 2010. Boron induced oxidative stress, antioxidant defence response and changes in artemisinin content in *artemisia annua* L. Journal of Agronomy and Crop Science, 196 (6), 423–430.
- Agarwal, S., Pandey, V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*, Biologia Plantarum, 48 (4), 555-560.
- Akın, E., 2009. İzmir, Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, Meslek Yüksek Okulu 2 E.Ü. Tekstil Mühendisliği Bölümü, Bornova- Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 3, No: 2, 92-103.
- Akkus, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyo-patolojik etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Alkan, A., Gultekin, I., Eker S., Kiral A.S., Bağcı S.A., Ekiz, H., 1995. Effects of zinc fertilization and irrigation on grain yield and zinc concentration of various cereals grown in zinc-deficient calcareous soils. Journal of Plant Nutrition, 21, 2245-2256.
- Alkan, A., Torun, B., Ozdemir, A., Bozbay, G., Chakmak, I., 1998. Effect of zinc on boron toxicity different wheat and barley cultivars. I. National Zinc Congress, 12- 16 May, Eskisehir, Turkey, pp. 779- 782.
- Allan, CR., Hadwiger. LA. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. Experimental Mycology, 3, 285–287.
- Allen, R., 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology, 107, 1049-1054.
- Amborabe', Be' -E., Bonmort J., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G., 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. Journal of Experimental Botany, 59 (9) 2317–2324.
- Anjum, NA., Umar, S., Ahmad, A. 2011a. Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Anjum, NA., Umar, S., Chan, M.T., 2010. Ascorbate-Glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Anjum, NA., Umar, S., Iqbal, M., Khan, NA., 2011b. Cadmium causes oxidative stress in moongbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] by affecting antioxidant enzyme systems and ascorbate-glutathione cycle metabolism. russian journal of plant physiology. 58, 92–99

- Anonim, 2008. Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Mùdùrlùğü Bitki Besleme Laboratuvarı kayıtları. Isparta.
- Aravind, P., Prasad, M., 2005. Cadmium and zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L. adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17, 3–20.
- Ardıc, M. Sekmen, AH., Tokur, S., Ozdemir, F., Turkan, I., 2009. Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity. Plant Biology. 11 (3), 328–338.
- Ardıç, M., 2006, Bor toksisitesinin nohut (*cicer arietinum* l.) bitkilerinde bazı fizyolojik ve biyokimyasal özeellikler üzerindeki etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Ari Baykal, S., Oncel, İ., 2006. Changes of soluble phenolic and soluble protein amounts on the tolerance of boron toxicity in wheat seedlings. Journal of Natural Sciences, 7 (1), 13-25.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum, 85, 235-241.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 601–639.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141 (2), 391-396
- Ashraf, M., Foolad, MA., 2007. Improving plant abiotic stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycine betaine and proline. Environmental and Experimental Botany, 59 (2), 206-216.
- Avci, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. Ecotoxicology Environmental Safety. 60 (1), 101-105.
- Ayvaz. M., Guven, A., Blokhina, O., Fagerstedt, KV., 2015. Boron stress, oxidative damage and antioxidant protection in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.). Acta Agriculturae Scandinavica, Soil & Plant Science. 66 (4), 302–316.
- Babaoğlu, S., Yorgancıoğlu, M., Akbudak, M.A., 2002. Doku Kùltürü: temel laboratuvar teknikleri: bitki biyoteknolojisi- I, doku kùltürü ve uygulamaları.(Edt. Babaoğlu S., Gürel E., Özcan S.). Selçuk üniversitesi vakfı yayınları (ss. 1-3). Konya.
- Barrs, HD., Weatherly, PE., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15, 413-428.
- Bates, L., Waldren, RP., Teare, İD., 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant soil, 39, 205-207.
- Beaulieu, C., 2005. Chitin and Chitosan, <http://www.plasticstrends.net>. Eriřim Tarihi: 11/11/2006.
- Beuchamp, C., Fridovich, I., 1971. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ, Biochimica et Biophysica Acta, 317, 50-64.
- Birnbaum, EH., Beasley CA., Dugger, WM., 1974. Boron Deficiency in unfertilized cotton (*Gossypium hirsutum*) ovules grown *in vitro*. Plant Physiology, 54, 931-935

- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, GS., Nichols, EJ., 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology* 107(3), 167-175.
- Blevins, DG., Lukaszewski, KM., 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 481-500.
- Bohnert, HJ., Jensen, RG., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*, 14: 89-97. DOI: 10.1016/0167- 7799(96)80929-2
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., Blevins, D.2004. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 907–912.
- Bolwell, GP., Daudi, A., 2009. Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. Berlin: Springer-Verlag, 113–133.
- Boonlertnirun, S., Boonraung, C., Suvanasara , R., 2008. Application of chitosan in rice production. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 18 (2), 47-52.
- Boonreung, C., Boonlertnirun, S., 2013. Efficiency of chitosan for controlling dirty panicle disease in rice plants. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*, 8 (5).
- BOREN, 2017. Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü: www.boren.gov.tr.
- Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ., Savaşçı, S., Paşlı, N., 2001. *Ekoloji –II (Toprak)*, Başkent Klşe Matbaacılık, Kızılay-Ankara.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stres tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83-116.
- Boyer, JS., 1982. Plant productivity and environment. *Science*. 29 (218), 443-448.
- Bozcuk, S., 1978. Domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.), Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve Pamuk (*Gossyplum hirsutum* L.) bitkilerinin büyüme ve gelişmesinde tuzkinetin etkileşimi üzerinde araştırmalar (Doçentlik Tezi). H.Ü. Fen Fak. Bot. Böl., Ankara.
- Bray, E., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiyotik stresses chapter 22. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. B.B.Buchanan ,W.Gruissem and R.L. Jones,(ed.) American Society Plant Physiology Rockrille MD.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., Gruissem, W., Jones, R., 2000. Responses to abiotic stresses, in Buchanan. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 1158–1203.
- Bray, EA., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 1035–1040.
- Brown, PH., Bellaloui, N., Wimmer, MA., Bassil, ES., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F., Romheld, V., 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4, 205–223.
- Brown, PH., Hu, H., 1996. Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol- rich species. *Annals of Botany*, 77, 497-505
- Brown, PH., Shelp, BJ. 1997. Boron mobility in plants. *Plant and Soil*. 193, 85–101.
- Cakmak, I., Kurz, H., Marschner, H., 1995. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiologia Plantarum*. 95, 11–18.

- Cakmak, I., Strbac, D., Marschner, H., 1993. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of experimental botany*, 44, 127–132.
- Cartwright, B., Zarcinas, BA., Spouncer, LR., 1986. Boron toxicity in South Australian barley crops. *Australian Journal of Agricultural Research*. 37 (4), 351–359.
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M., 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany*, 100, 747-756.
- Charbaji, T., Ayyoubi, Z., 2004. Differential growth of some grapevine varieties in Syria in response to salt in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40 (2), 221–224.
- Costa, P., Neto, A., Bezerra, M., 2005. Antioxidantenzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (4), 353-362.
- Çamaş, M., 2006. Borun genotoksik etkilerinin *hordeum vulgare* L. üzerinde incelenmesi., Yüksek Lisans Tezi., Gebze, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Çetin, M., Kaman, H., Topcu, S., Kirda, C., 2006. Investigation of salt accumulation in soil under drought conditions by using probabilistic methods. *International Symposium on “Water and Land Management for Sustainable Irrigated Agriculture”*, At Çukurova University, Adana, Turkey., Volume: 1
- Dannel, F., Pfeffer, H., Römheld, V., 2000. Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotope ¹⁰B and ¹¹B. *Australian Journal of Plant Physiology*, 156, 756–761.
- Dear, JM. 1967. Phenolic acids and the boron requirement of plants. *Retrospective Theses and Dissertations*. 3380.
- Demir, A., Seventekin, N., 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3 (2), 92-103.
- Demiral, T., 2003, Genç pirinç fidelerine dışarıdan glisinbetain uygulanmasıyla, tuza (NaCl) toleransının artırılmasında antioksidant enzim aktivitesinin rolünün araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Demiray, H., Dereboylu, E., 2006. The effect of excess boron with niacin on *Daucus carota* L. (carrot) root callus. *Acta Biologica Hungarica*, 57, 105–114.
- Demirtaş, A., 2004. Bitkide bor ve etkileri. Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi. 36 (2), 217.
- Desikan, R., Hancock, JT., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R, Neill, SJ., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 137, 831–834.
- Devirian, TA., Volpe, SL., 2003. The physiological effects of dietary boron. *critical reviews in food science and nutrition*, 43, 219–231.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *journal of agricultural and food chemistry*, 50, 3010-3014.
- Dhindsa, RS., Matowe, W., 1981. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *journal of experimental botany*, 32, 79-91.

- Dionisio-Sese ,ML., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*. 135, 1-9.
- Dische, Z., 1962. Color reactions of carbonhydrates. *Methods in carbonhydrates chemistry*, 1, 475-415.
- Dordas, C., Brown, Ph., 2000. Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *Journal of Membrane Biology*, 175, 95–105.
- Dordas, C., Chrispeels, MJ., Brown, PH., 2000. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant physiology*, 124 (3), 1349–1362.
- Dordas, C., Chrispeels, MJ., Brown, PH., 2000. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology*, 124, 1349–1361
- Dubey, JP., 1994. Toxoplasmosis. *Journal the American Veterinary Medical Association* 205, 1593-1598.
- Ediz. N., Özday, H., 2001. "Bor Mineralleri ve Ekonomisi" D.P.Ü. FBE Dergisi, Sayı, 2, Kütahya .
- Edreva, A., 1988. New aspects of plant peroxidases-metabolic and physiological functions and physiological functions. *American Society of Plant Biologists*, 1158–1203.
- Edreva, A., 1998. Stress physiology, definitions and concepts of stress. Classifications of stress factors, Approaches applied in stres research, *Bitkilerde stres fizyolojisinin moleküler temelleri sempozyumu*, 22-26 Haziran, Ebiltem, Bornova, İzmir.
- Edreva, A., Yordanov I., Kardjieva, R., Gesheva, E., 1998. Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Plant Biology*, 41, 185-191.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., Bélanger, RR., 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology*, 84, 313-320.
- Elstner, EF., Heupel, A., 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase, *analytical biochemistry*, 70, 616-620.
- Elstner, EF., Osswald, W., 1994. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B: 131-154 p.
- Emebiri, L., Michael, P., Moody, D., 2009. Enhanced tolerance to boron toxicity in two-rowed barley by marker-assisted introgression of favourable alleles derived from Sahara 3771. *Plant Soil*, 314, 77–85.
- Enescu., D., 2008. Use of chitosan in surface modification of textile material, Bucharest University. *Roumanian Biotechnological letters*vol. 13 (6), 4037-4048.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M., 2007b. Boron toxicity alters nitrate reductaseactivity, proline accumulation, memberanepermeability and mineral constituents oftomato and Pepper plants. *Journal of Plant Nutrition*, 30, 981-994.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M., 2008. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity., *Scientia Horticulturae*, 133, 120-128,

- Ermiş, İ., 2002. Bazı arpa çeşitlerinin çimlenme yüzdesi ve antioksidant enzim düzeylerine bor stresinin etkisi. Yüksek lisans tezi, Ege üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Esim, N., Tiriyaki, D., Karadagoglu, O., Atici, O., 2012. Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (9).
- Farouk, S., Amany, AR., 2012. Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. *Egyptian Journal of Biology*, 7 (2), 100-116.
- Farouk, S., Mosa, AA., Taha, AA., Ibrahim, HM, EL-Gahmery, AM., 2011. Protective Effect of humic acid and chitosan on radish (*Raphanus sativus* L. var. Sativus) plants subjected to cadmium stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7 (2), 99-116.
- Farouk, S., Ghoneem, KM., Abeer, A., 2008. Induction and expression of systematic resistance to downy mildew disease in cucumber plant by elicitors. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 1 (2), 95-111.
- Foyer, CH., Descourvieres, P., Kunert, KJ., 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants, *Plant Cell Environ.* 17, 507-523.
- Foyer, CH., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 21-25.
- Foyer, CH., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28 (8), 1056–1071.
- Foyer, CH., Shigeoka, S., 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photo-synthesis. *Plant Physiology*, 155, 93-100.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112.
- Fridowich, I., 1998, Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 1203-1209.
- Gençtan, T., Emekliler, Y., Çölkesen, M., Baer, I., 1995. Consume projections of cereal crops and production targets. IV. Technical Congress of Turkish Agriculture Engineering. Ankara, Turkey.
- Gezgin, S., N., Dursun, M., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Onder, B., Sade, A., Topal, S., Soylu, N., Akgun, M., Yorgancilar, E., Ceyhan, N., Ciftci, B., Acar, I., Gultekin, Y., Işık, C., Babaolu, M., 2002. Determination of boron contents of soils in central Anatolian cultivated lands and its relations between soil and water characteristics, *Boron in Plant and Animal Nutrition*, 391–400.
- Ghonaime, AA., EL-Nemr, MA., Abdel-Mawgoud, AMR., El-Tohamy, WA., 2010. Enhancement of sweet pepper crop growth and production by application of biological, organic and nutritional solutions. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 6 (7), 349-355.
- Gill, SS., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.

- Goldbach, HE., Yu, Q., Wingender, R., Schulz, M., Wimmer, M., Finderklee, P., Baluška, F., 2000. Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal Plant Nutr Soil Science*. 161, 173–181.
- Goldberg, S., 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*, 193 (2), 35–48.
- Goldberg, S., Souise, P., Lesch, S., Grieve, C., Poss, J., Forster, H., Suarez, D., 2003. Effect of high boron application on boron content and growth of melons. *Plant and Soil*, 256, 403–411.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Botanical bulletin of Academia Sinica*, 42, 259–264.
- Gökçe Y., 2008. Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, s. 3-16.
- Guan, Yj., HU, J., X-ju, Wang., Shao, C., 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science*, 10(6), 427–33.
- Guang, W.Y., 2002. The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, Ph. D. Thesis, Hong Kong Polytechnic University.
- Gunes, A., Alpaslan, M., 2000. Boron uptake on toxicity in maize genotypes in relation to boron and phosphorus supply. *Journal plant nutrition*, 23 (4), 541- 550.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, EG., Coban, S., Sahina O., 2006. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity, *Scientia Horticulturae*. 110 (3), 279–284.
- Güneş, A., Alpaslan, M., İnal, S., 2002., Plant nutrition and fertilization. Ankara, Turkey: Ankara Univ Fac of Agric Press No:1526 (in Turkish).
- Hadwiger, L.A., 2008. Pea–*Fusarium solani* interactions contributions of a system toward understanding disease resistance, *Phytopathology*, 98, 372–379.
- Hadwiger, L.A., Fristensky, B., and Riggelman, R.C., 1984. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields In *Chitin, Chitosan, and related enzymes*. ISBN: 978-0-12-780950-2 , 291–302.
- Hadwiger, LA., Chiang C., Victory, S., Horovitz, D., 1989. The molecular biology of chitosan in plant/pathogen interaction and its application in agriculture, sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications, Elsevier Applied Science, London, pp. 119–138
- Halliwell, B. Gutteridge J.M.C. 1989, Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Pres, 86–123 p.
- Han, S., Chen, LS., Jiang, HX., Smith, BR., Yang, LT., Xie, CY., 2008. Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1331–1341.
- Hare, PD., Cress, WA., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79–102.
- Hare, PD., Cress, WA., van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment*, 21, 535–553.

- Hartney, S., Carson, J., Hadwiger, L.A., 2007. The use of chemical genomics to detect functional systems affecting the non-host disease resistance of pea to *Fusarium solani* F. Sp. Phaseoli. *Plant Science*, 172, 45–56.
- Hayes, J.E., Reid, R.J., 2004. Boron tolerance in barley is mediated by boron efflux from the roots. *Plant Physiology*, 136 (2), 3376–3382.
- Helvacı, C., Mordoğan, H., Çolak, M., Gündoğan, İ., 2004. Presence and distribution of lithium in borate deposits and some recent lake waters of west-central Turkey. *International Geology Review*, 46 (2), 177–190.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I. 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Plant Physiology*, 98, 685–692.
- Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Plant Biology*, 46, 73–78.
- Hu, H., Brown, P.H., 1994. Localization of boron in the cell wall and its association with pectin (Evidence of a structural role of boron in the cell wall). *Plant Physiology* 105, 681–9.
- Hu, H., Brown, P.H., 1997. Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil*, 193, 49–58.
- Hu, H., Brown, P.H., Labavitch, J.H., 1996. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of experimental botany*, 47, 227–232.
- Inal, A., Pilbeam, D.J., Gunes, A., 2009. Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley. *Journal of Plant Nutrition*. 32(1), 112–128.
- Iriti, M., Faoro, F., 2009. Chitosan as a MAMP searching for a PRR. *Plant signaling and Behavior*, 4, 66–68.
- Iwai, H., 2002. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proceeding of the National Akademik Scince of the USA*, 99 (25), 16319–24.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N.B., 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress- induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 463–468.
- Jones, C., Cole, A.C.V., Sharpley, A.N., Williams, J.R., 1984, A simplified soil and plant phosphorus model: I. documentation. *Soil Scince Society of America Journal*. 48 (4), 800–805.
- Kadioğlu, A., 2004. Bitki fizyolojisi. Trabzon: Lokman Yayınları 453.
- Kadioğlu, A., 1999. Boron stress affects the peroxidase activity, plant peroxidase newslett. *Journal of Crop And Horticultural Science*, .27, 257–261.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Bouriotis, V., 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90 (7), 564–2568
- Kar, D.M., Maharana, L., Pattnaik, S., Dash, G.K., 2006. Studies on hypoglycemic activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract in rats. *Journal Ethnopharmacology*, 108, 251–256.
- Karabal, E., Yucel, M., Oktem, H.A., 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Scince*, 164, 925–933.
- Karimi, S., Abbaspour, H., Sinaki, J.M., Makarian, H., 2012. Effects of water deficit and chitosan spraying on osmotic adjustment and soluble protein of cultivars castor

- bean (*Ricinus communis* L.). Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 8, 160-169.
- Kavi, K, Sangam, PB., Amrutha, S., Laxmi, R.N., Naidu, P.S., Rao, K.R., Rao, K.R.S.S., Reddy, S., Theriappan, K.J., Sreenivasulu, P., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. current science, 88, 424–438.
- Kecec, G., Sakcali, MS., Uzonur, G., 2010. Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 84, 759-764.
- Keles, Y., Öncel, I., Yenice, N., 2004. Relationship between boron content and antioxidant compounds in Citrus leaves taken from fields with different water source. Plant and Soil, 265, 345–353.
- Keren, R., Bingham, FT., Rhoades, JD., 1985. Plant uptake of boron as affected by boron distribution between liquid and solid phases in soil. Soil Science Society of America Journal, 49, 297-302.
- Keskin, H., 2010. Arpa çeşitleri (*Hordeum vulgare*) ile çorak çimi'nde (*Puccinellia distans*) bor toksisitesinin temel fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Khan, M., Singha, H., Panda, KLB., 2002. Changes in antioxidant levels in *Oryza sativa* L. roots subjected to NaCl salinity stress. Acta Physiology Plantarum, 24, 145–148.
- Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter., A.M., 1999. The effect of salinity on growth, ion content, and osmotic relations in *Halopyrum mucronatum* (L.) Stapf. Plant Nutrition, 22, 191–204.
- Khan, N., Young, K.J., Gartrell, J.N., 1999. Boron toxicity in barley. Division of plant Research, Agriculture Western Australia, Farmnote. Farmnote, 85.
- Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J., 1996. Two chain of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. Plant Physiology 110, 1017-1020.
- Koca, H., 2002. Tuz stresinin farklı domates genotiplerind fizyolojik ve biyokimyasal özellikler üzerine etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimle Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir
- Kocaçalışkan, İ., 2001. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kohl, H C., Oertli, JJ., 1961. Distribution of boron in leaves. Plant Physiol. 36, 420–424.
- Kohle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W., Kauss, H., 1985. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} dependent process, Plant Physiology. 77, 544–551.
- Läuchli, A., 2002. Functions of boron in higher plants: recent advances and open questions. Plant Biology, 4, 190–192.
- Lazarow, PB., Fujiki, Y., 1985. Biogenesis of peroxisomes. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1, 489-530.
- Lee, DH., Park, B., Saxena, A., Serene, TP. 1996. Enhanced surface hardness by boron implantation in nitinol alloy. Journal of Endodontics, 22 (10), 543-6.

- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.S., Oh, K.Y., Choi, E.J., Taylor, A.T.S., Low, P., Lee, Y., 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*, *Plant Physiology*, 121, 147–152.
- Lemarchand, D., Gaillardet, J., Lewin, E., Allegre, C.J., 2000. The Influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH. *Nature*, 408, 951–954.
- Levitt, J., 1972. Responses of plants to environmental stresses: water, radiation, salt and other stresses. Academic Press. New York. Science, 177 (4051), 786.
- Lin, W., Hu, X., Zhang, W., Rogers, W.J., ai, W., 2005. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice, *Journal of Plant Physiology*, 162, 937–944.
- Liu, A.R., Chen, S.C., Lin, X.M., Wu, S.Y., Xu, T., Cai, F.M., Raesh, J., 2010. Endophytic *Pestalotiopsis* species spp. associated with plants of *Palmae*, *Rhizophoraceae*, *Planchonellae* and *Podocarpa ceae* in Hainan, China. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2661–2669.
- Loomis, W.D., Durst, R.W., 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3, 229–239.
- Lopez, F.B., Johansen, C., Chauhan, Y.S., 1996. Effect of timing of drought stress on phenology, yield and yield components of a short-duration pigeon pea. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 177, 311–320.
- Loschke, D.C., Hadwiger, L.A., Wagoner, W., 1983. Comparison of mRNA populations coding for phenylalanine ammonia lyase and other peptides from pea tissue treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers, *physiology plant pathology*. 23, 163–173.
- Lovatt, C.J., Bates, L.M., 1984. Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*. *Journal of experimental botany*, 35, 297–305.
- Low, P.A., Caskey, P.E., Tuck, R., Fealey, D.R., Dyck, P.J., 1983. Quantitative sudomotor axon reflex test in normal and neuropathic subjects. *Annals of Neurology*, 14, 573–580.
- Luis, M., Cervilla, B., Juan, J.R., Miguel, A., Eva Sánchez Rodríguez, M., Luis, R., Juan M.R., 2012. Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 1–17.
- Lukaszewski, K.M., Blevins, D.G., 1996. Root growth inhibition in boron deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiology*, 112, 1135–1140.
- Madhava, Rao, Sresty, K.V., 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 15, 113–128.
- Madhava, Rao, Raghavendra, K.V., Janardhan, A.S., Reddy, K., 2005. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. *Netherlands, Springer*, 345–347.
- Mahboobi, H., Yücel, M., Öktem, H.A., 2000. Changes in total protein profiles of barley cultivars in response to toxic boron concentration, *Journal of Plant Nutrition*, 23(3), 391–399.
- Mahdavi, B., Rahimi, A., 2013. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *EurAsian Journal of BioSciences*, 7, 69–76.

- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Plants. 2nd Ed. Academic Press. New York. 379-396.
- Matamoros, MA., Dalton, DA., Ramos, J., Clemente, MR., Rubio, MC., Becana M., 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia legume symbiosis. *Plant Physiology*, 133, 499-509.
- Matoh, T., 1997. Boron in plant cell walls. *Plant Soil*. 193, 59–70.
- Matoh, T., Akaike, R., Kobayashi, M., 1997. A sensitive and convenient assay for boron in plant using chromotropic acid and HPLC. *Plant Soil*, 192;115-118
- Mauch, B., Mauch, T., 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue, *Plant Physiology*. 88, 936–942.
- Melgar, JC., Guidi, L., Remorini, D., Agati, G., Degl'Innocenti E., 2009. Antioxidant defenses and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. *Tree Physiology*, 29, 1187-1198.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410
- Mittler, R., Zilinskas, BA., 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212 (2), 540-546.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis G., Therios, I., 2006. Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple root- stock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environmental and Experimental Botany*, 56, 54–62.
- Mondal, MMA., Malek, MA., Puteh, AB., Ismail, MR., Ashrafuzzaman, M., Naher, L., 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science*, 6 (5), 918-92.
- Mondy, NI. Munshi, CB., 1993. Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid content of potatoes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 554-556.
- Muhammad, AJ., Shaheed, AI., 2012. Effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in mung bean cuttings under boron toxicity. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*. 1.22.
- Nable, R.O., G.S. Banuelos, J., Paull, JG., 1997. Boron toxicity. *Plant Soil*, 193, 181-198.
- Nable, RO. 1988. Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant Soil*, 112, 45-52.
- Nakano, Y., Asada, Y., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Neto, ADA., Prisco, JT., En'eas-Filho, J., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 56, 87–94.
- Niemi, A., Venalainen, E., Hirve, R., Hirn, T., Karppanen, E., 1991. The lead, cadmium and mercury concentrations in muscle, liver and kidney from Finnish pigs and cattle during 1987–1988. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 192, 427–429

- Noctor, G., Foyer, CH., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, CH., 2012. Glutathione in plants: an integrated overview, *Plant Cell Environ*, 35, 454-484
- Noguchi, K., Yasumori, M., Imai, T., Naito, S., Matsunaga, T., Oda, H., Hayashi, H., Chino, M., Fujiwara, T., 1997. bor1-1, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant Physiology*, 115, 901–906.
- Oaks, A, Mitchell , DJ., Barnard, RA., Johnson, FJ., 1970. The regulation of proline biosynthesis in maize roots. *Canadian Journal of Botany*, 48 (12), 2249-2258
- Ogunwole, AA., Otusanya, OO., Oloyede FA., Olabamiji, TM., 2015. Comparative effects of boron toxicity and deficiency on the growth, chlorophyll, protein and some cations accumulation in *zea mays* seedlings. *nternational Journal of Innovation and Scientific Research*, 17 (2), 316-335.
- O'Neill, M., Eberhard, S., Albersheim, P., Darvill, A., 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294 (5543), 846–849.
- O'Neill, MA., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, AG., 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109–139.
- Ortaca, Ş., 2005. Borun ayçiçeği bitkisinde vejetatif büyüme, pigment, protein miktarı ve protein profili üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Öktem, HA., Özalp, VC., Özkan, F., Nalbant, D., Naqvi, SMS., Memon, AR., Yücel, M., 1992. Identification of stress induced proteins in different varieties of poppy (*Papaver somniferum*) keystone symposia on molecular and cellular biology, Colorado, USA, Crop Improvement via Biotechnology: An International Perspective, pp. 418.
- Özel, M., 2011, Bor kirliliğinin *Zea mays* L. üzerindeki etkilerinden fizyolojik ve biyokimyasal analizlerle incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Fatih Üniversitesi, İstanbul, Yüksek Lisans Tezi.
- Özhuner, E., Eldem, V., Ipek, A., Okay, S., Skcali, S., Zhang, B., Boke., H., Unver, T., 2013. Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley. *PLoS ONE* 8(3), e59543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.005954>
- Palanisamy, K., 2004. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. *Environmental Biotechnology*, 8 (1).
- Papadakis, IE., Dimassi, N., Bosabalidis, AM., Therios, IN., Patakas, A., Giannakoula, A., 2004a. Boron toxicity in ‘Clementine’ mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Sci.* 166, 539–547.
- Papadakis, IE., Dimassi, N., Bosabalidis, AM., Therios, IN., Patakas, A., Giannakoula, A., 2004b. Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of ‘Navelina’ orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 247–257.
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W., Muallem, S., 2004. NaC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Molecular Cell*. 16(3), 331-341.

- Parr, A.J., Loughman, B.C., 1983. Boron and membrane function in plants. Academic Press, London, 87-107.
- Paulert, R., Ebbinghaus, D., Urlass, C., Moerschbacher, B.M., 2010. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan a polysaccharide from green macroalgae and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants, *Plant Pathology*, 59, 634–642.
- Paull, E., Staswick, S., Su, W., Howell, S.H., 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (15), 6837-6840.
- Paull, J.G., Rathjen, A.J., Cartwright B., Nable, R.O., 1990. Selection parameters for assessing the tolerance of wheat to high concentrations of boron. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. Ed. N El Bassam. 361–369. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Paull, J.G., Nable, R.O., Lake AWH, Materne, M.A., Rathjen, A.J., 1992. Response of annual medics (*Medicago* spp.) and field peas (*Pisum sativum*) to high concentration of boron: genetic variation and the mechanism of tolerance. *Australian Journal Of Agricultural Research*, 43, 203–213.
- Perkins, H.J. Aronoff, S., 1956. Identification of the blue fluorescent compounds in boron-deficient plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 64, 506–507.
- Picchioni, G.A., Miyamoto, S., 1991. Boron Uptake and Effects on Growth and carbohydrate Partitioning of Pistachio Seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116 (4), 706-711.
- Posmyk, M.M., Bailly, C., Szafranska, K., Janas, K.M., Corbineau, F., 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 162, 403-412.
- Qi, J., Luo, H., Bailin, H., 2004. CVTree: A phylogenetic tree reconstruction tool based on whole genomes. *Nucleic Acids Research*, 32, Web Server Issue, W45–W47.
- Ralston, N.V.C., Hunt, C.D., 2000. Biological boron interactions: Charge and structure characteristics required for boron ester formation with biomolecules. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 14, A538.
- Rascio, A., Plantani, C., Sealfati, G., Tonti, A., Di Fonzo, N., 1994. The accumulation of solutes and water binding strength in durum wheat. *Physiologia Plantarum*, 90, 554-558.
- Rauser, W.E., 1990. Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 61-86
- Rauser, W.E., Meuwly, P., 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109, 195-202.
- Raven, J.A., 1980. Short and long distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist*, 84, 231–249.
- Rehman, S.U., Hussain, N., Tariq, M., Hussain, M., Nasir, M., Ayaz, M., 2012. Response of wheat to exogenous boron supply at various growth stages. *Sarhad Journal Agriculture*, 28 (3), 411-414.
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D., 2004. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant Cell and Environment*, 25, 1405-1414.
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D., 2004. A critical analysis of causes of boron toxicity in plant. *Plant Cell and Environment*, 25, 1405-1414.

- Renard, M., Guerrier., G., 1997. Is proline a compatible solute in cali from NaCl sensitive *Lycopersicon esculentum* and NaCl-tolerant l.pennellii, Plant Physiology, 150, 331-337.
- Ride, R., 2010. Can we really increase yields by making crop plants tolerant to boron toxicity?. Plant Science, 178 (1), 9-11.
- Riley, MM., Robson, AD., 1994. Pattern of supply affects boron toxicity in barley. Journal of Plant Nutrition, 17 (10), 1721-1738.
- Roessner, U., Patterson, JH., Forbes, MG., Fincher, GB., Langridge, P., Bacic, A., 2006. An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. Plant Physiology, 14, 1087-1101.
- Roush, AH., Gowdy, BB., 1961. The inhibition of yeast alcohol dehydrogenase by borate. Biochimica et Biophysica Acta, 52, 200-202.
- Rowe, RI, Eckhert, CD., 1999. Boron is required for zebrafish embryogenesis. Journal of Experimental Botany, 202, 1649-1654
- Ruiz, JM., Aghour, MB., Retones, GB., Belakbir, A., Romero, L., 1998. Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of boron as a possible regulatory factor. International Journal of Plant Science, 159, 121-126.
- Sağlam, MT., Bahtiyar, M., Cangir, C., Tok, HA., 1993. Toprak Bilimi. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi, 1, 2-3
- Sairam, RK., Saxena, DC., 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science, 184 (1), 55-61.
- Sairam, RK., Srivastava, GC., 2001. Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L. : Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. Journal of Agronomy and Crop Science. 186, 63-70.
- Salachna1, P., Zawadzińska, A., 2014. Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted. Journal of Ecological Engineering, 15 (3), 97-102.
- Salin, ML., 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. Physiologia Plantarum, 72, 681-689.
- Sathiyarayanan, A., Sathiyabama, M., 2016. Effect of chitosan on growth, yield and curcumin content in turmeric under field condition. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 6 (2), 102-106.
- Seckin, ZE., Volkan, M., 2005. Flow injection fluorescence determination of dopamine using a photo induced electron transfer (PET) boronic acid derivative. Analytica Chimica Acta, 547 (1), 104-108.
- Seçkin, B. 2005. Mannitolün tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinin antioksidant enzim düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir
- Serrano, R., Gaxiola, R., 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 13, 121-138.
- Sgherri, CLM., Navari-Izzo, F., 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. Physiologia Plantarum, 93, 25-30.
- Sheikha, SA., Al-Malki, FM., 2011. Growth and chlorophyll responses of bean plants to chitosan applications. European Journal of Scientific Research, 50 (1), 124-134.

- Shkolnik, MY., 1974. General conception of the physiological role of boron in plants. *Fiziolog Rast*, 21, 174-186.
- Shorrocks, V., 1997. The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil*, 193, 121- 148.
- Sivritepe, N., Eris, A., 1999. Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under in vitro conditions. *Turkish Journal of Biology*, 4, 473-485.
- Smirnoff, N., Conklin, PL., Loewus, FA., 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 437-467.
- Smith, CJS., Watson, CF., Ray, J., Bird, CR., Morris, PC., Schuch, W., Grierson, D., 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334 (6184), 724-726.
- Smith, PK., Krohn, RI., Hermanson, GT., Mallia, AK., Gartner, FH., Provenzano, MD., Fujimoto, EK., Goeke, NM., Olson, BJ., Klenk, DC., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analitic Biochemistry*, 150, 76-85.
- Sotiropoulos, TE., Molassiotis, AN., Mouhtaridou, GI., Papadakis, I., Dimassi, KN., Therios, IN., Diamantidis, G., 2006. Sucrose and sorbitol effects on shoot growth and proliferation in vitro, nutritional status and peroxidase and catalaze isoenzymes of M 9 and MM106 Apple (*Malus domestica* Borkh.) root stocks. *European Journal of Horticultural Science*, 71 (3), 114-119.
- Sotiropoulos, TE., NI., Therios, NK., Dimassi, Bosbalidis A., Kofilids, G., 2002. Nutritional status, growth, CO assimilation and leaf anatomical responses in two kiwi fruit species under boron toxicity. *Journal Plant Nutrition*, 2, 1244-1261.
- Soy, M., Güneş, A., 2003. Fosforun domates (*Lycopersicon esculentum* L.) bitkisinde bor toksisitesini önlemede etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, A. Ü. Ziraat Fakültesi 3 (9), 279-277.
- Srinivas, V., Balasubramanian, D., 1995. Proline is a protein-compatible hydrotrope. *Langmuir*, 11, 2830-2833.
- Staiger, K., Machelet, B., 1984. Grenzwerte für schwermetalle und bor im bewässerungswasser. proc. mengen. u. spurenelemente arbeitst. Karl-Marx Univ. Leipzig. 236-239.
- Stangoulis, JCR., Reid, RJ., 2002. Boron toxicity in plants and animals. boron in plant and animal nutrition, Kluwer Academic Press, New York, 227-240.
- Stewart, CR., 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. *Plant Physiology*, 61, 775-778
- Streb, P., Feirabend, J., 1996. Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta*, 109 (2), 125-132.
- Süzer, S., 2004. Mısır tarımı, Trakya Tarımsal Enstitüsü Yayınları.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2005. *Plant Physiology.*, Palme yayınevi, Ankara.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420, 337-340
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von, Wiren. N, Fujiwara, T., 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, 18, 1498-1509

- Tanaka, M., Fujiwara, T., 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *European Journal of Applied Physiology*, 456 (4), 671-677.
- Tantawy, EM El., 2009. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12 (17), 1164-1173
- Tariq, M., Shah, M., 2007. Effect of boron on the behavior of nutrients in soil-plant systems-A Review. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (1), 195-202.
- Teixeira, E., Fischer, G., van, H., Ewert, F., 2013. Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170 (15), 206-215.
- Tepe, M., Aydemir, T., 2011. Antioxidant responses of lentil and barley plants to boron toxicity under different nitrogen sources. *African Journal of Biotechnology*, 10 (53).
- Torun, AA., Yazici, A., Erdem, H. Cakmak, I. 2006. Genotypic variation in tolerance to boron toxicity in 70 durum wheat genotypes. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30, 49–58.
- Velikova, V., Yordancv, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Wang, G., Romheld, V., Li, C., Bangerth, F., 2006. Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants (*Pisum sativum* L.). *J. Plant Physiology*. 163, 591–600.
- Wang, JZ., Tao, ST., Qi, KJ., Wu, J., HQ, Wu., Zhang, SL., 2011, Changes in photosynthetic properties and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity, *African Journal of Biotechnology*, 10 (85),19693-19700.
- Waters, ER., Lee, GJ., Vierling, E., 1996. Evolution, structure and function of small heat shock proteins in plants. *Experimental Biology*, 47, 325-338.
- Wimmer, MA., Mühling, KH., Brown, PA., Goldbach , HE., 2003. The interaction between salinity and boron toxicity affects the subcellular distribution of ions and proteins in wheat leaves. *Plant Cell and Environment*, 26 (8), 1267–1274.
- Wise, RR., Naylor, AW., 1987. Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*, 83, 278-282.
- Witham, FH., Blayles, DF., Devlin, RM., 1971. *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinheld Company, 55-56. New York.
- Woods, WG., 1994. An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ Health Perspect*, 102 (7), 5–11.
- Wu, T., Hsu, Y., Lee, T., 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *ulva fasciata*. *Botanical Studies*, 50, 25-34.
- Xu, QJ., Nian, YG., Jin, XC., Yan, CZ., Liu, J., Gao-ming, J., 2007. Effects of chitosan on growth of an aquatic (*Hydrilla verticillata*) inpolluted waters with different chemical oxygen demands. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 217–221.
- Xuan, L., Naotsugu, T., Shinpei, M., Noriko, Ishioka, S., Takehito I., Tamikazu, K., 2001. Effect of radiation-degraded chitosan on plants stressed with vanadium. *Radiation Physics and Chemistry*, 61, 171–175.

- Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, XW., Wang, H., 2005. Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 804–821.
- Yau, SK., 2002. European versus West Asian and North African winter barleys in tolerance to boron toxicity. *Euphytica*, 123, 307–314.
- Yazbeck, C., Kloppmann, W., Cottier, R., Sahuquillo, J., Debotte, G., Huel, G., 2005. Health impact evaluation of boron in drinking water: a geographical risk assessment in northern France. *Environ Geochem Health*, 27, 419–427.
- Yee, Y., Tam, NFY., Wong, YS., Lu, CY., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 49 (3), 209–221.
- Yin, H., Zhao, X., Bai, X., Du, Y., 2010. Molecular cloning and characterization of a *Brasica napus* L. MAP kinase involved in oligochitosan-induced defense signaling, *Plant Mol. Biol. Rep.* 28, 2292–2301.
- Yin, H., Zhao, X., Du, Y., 2010. Oligochitosan: a plant diseases vaccine—a review. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1–8.
- Zhao, YX., Zhang, H., 2003. Cloning and differential gene expression of two catalases in *Suaeda salsa* in response to salt stress. *Acta Botanica Sinica*, 45 (1), 93–97.
- Zhou, ZS., Wang, SJ., Yang, ZM., 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70 (8), 1500–1509.
- Zhu, JK., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6, 66–71.
- Zuppini, A., Baldan, B., Millionini, Renato., Favaron, F., Navazio, L., Mariani, P., 2003. Chitosan induces Ca^{2+} mediated programmed cell death in soybean cells, *New Phytologist*, 161, 557–568.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İran’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İranın Urmıye ilinin Salmas ilçesinde tamamladı. Lisans ve yüksek lisanısını Biyoloji-Botanik alanında İran’da yaptı. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başlayıp, Ağustos 2017’de tamamladı.

