



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

**BOR STRESİNE KARŞI BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM L.*)**  
**FİDELERİNDE EKSOJEN FERULİK ASİTİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**Hüseyin KARAHAN**  
**YÜKSEK LİSANS**  
**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Eylül 2019**  
**KONYA**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Hüseyin Karahan tarafından hazırlanan “Bor stresine karşı buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde eksojen ferulik asitin iyileştirici etkilerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması 02/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

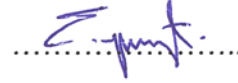
**Başkan**  
**Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK**

**Danışman**  
**Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY**

**Üye**  
**Prof.Dr. Gökalp Özmen GÜLER**

### İmza







Yukarıdaki sonucu onaylarım.

**Prof. Dr. Mustafa YILMAZ**  
FBE Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

  
Hüseyin KARAHAN

Tarih: 02.09.2019

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### BOR STRESİNE KARŞI BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM* L.) FİDELERİNDE EKSOJEN FERULİK ASİTİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Hüseyin KARAHAAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY

2019, 59 Sayfa

Jüri

Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK  
Prof.Dr. Gökbalp Özmen GÜLER  
Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY

Ferulik asit (FA; 3-metoksi-4-hidroksisinamik asit) bir fenolik bileşiktir ve reaktif moleküllerin süpürülmesinde, lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinde ve hücre zarının stabilizasyonunda rol oynayabilir. FA, suda çözünürlüğü ve antioksidan aktiviteyi geliştirerek stres koşulları altında bitki toleransını geliştirmeye aday olabilir. Bildiğimiz kadarıyla, bitkilerde aşırı bora (B) karşı toleransı arttırmak için eksojen FA uygulamasının potansiyel rolünü araştırılmamıştır. Bu amaçla, buğday fideleri hidroponik kültürde büyütüldü ve buğday bitkileri, 7 gün boyunca çeşitli konsantrasyonlarda FA (25 ve 75  $\mu$ M) yalnız veya B stresiyle (4 ve 8 mM) birlikte uygulandı. Sonuçlar, B stresinin su içeriğinde (RWC), ozmotik potansiyelde ( $\Psi_{\pi}$ ) ve prolin içeriğinde (Pro) bir azalmaya neden olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, FA uygulaması bu parametreler üzerindeki inhibisyonu önledi. Sadece 8 mM B, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırdı. Katalaz, peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri stres altında artmadı. Bu nedenle, stres koşullarında süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) arttı. SOD aktivitesinin artması nedeniyle, stres altında FA başarıyla  $O_2^{\cdot-}$  içeriğini azalttı. Ayrıca, 4 mM B stresi altında eksojen olarak uygulanan FA, CAT ve POX'un aktivitelerini arttırdı. Her ne kadar buğday yapraklarındaki B stresi APX, GR, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktivitelerinde ve total askorbat (tAsA) ve dehidroaskorbat (DHA) içeriklerinin indüksiyonu tetiklemese de, stres ile birlikte FA bu parametreleri indükledi. B stresi altındaki 25  $\mu$ M FA, indüklenmiş CAT aktivitesinin yanısıra askorbat-glutatyon döngüsünde yer alan indüklenen tAsA ve GSH'nin rejenerasyonunu önemli ölçüde korudu. Antioksidan enzimlerin bu aktivasyonu sayesinde, strese bağlı  $H_2O_2$  içeriği önemli ölçüde azaldı ve FA uygulaması ile buğdayda  $OH^{\cdot}$  süpürülme aktivitesi arttı. Ayrıca FA, radikallerin süpürülme aktivitesini indüklenmesinden dolayı stresin neden olduğu lipid peroksidasyonu (TBARS) önledi.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan sistemi; Bor stresi; Ferulik asit; Fenolik bileşikler; Su içeriği

## ABSTRACT

### MS THESIS

# DETERMINATION OF AMELIORATIVE EFFECTS OF EXOGENOUS FERULIC ACID ON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) SEEDLING AGAINST BORON STRESS

Hüseyin KARAHAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
SELÇUK UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY

2019, 59 Pages

Jury

Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK  
Prof.Dr. Gökalp Özmen GÜLER  
Assoc.Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY

Ferulic acid (FA; 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid) is a phenolic compound and can role in scavenging of reactive molecules, inhibition of lipid peroxidation and stabilization of cell membrane. FA can be a candidate for evolving plant tolerance under stress conditions through improving the water solubility and antioxidant activity. To our knowledge, no study has thus far explored the potential role of exogenous FA application to improve tolerance against boron (B) excess in plants. For this purpose, the wheat seedlings were grown in hydroponic culture and wheat plants were treated with the various concentrations of FA (25 and 75  $\mu$ M) alone or in combination with B stress (4 and 8 mM) for 7 d. The results showed that B stress caused a decrease in water content (RWC), osmotic potential ( $\Psi_{\pi}$ ) and proline content (Pro). However, FA application prevented this inhibition on these parameters. Only 8 mM B increased the superoxide dismutase (SOD) activity. The activities of catalase, peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) did not increase under stress. So, the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) increased during stress conditions. However, due to increased SOD activity, FA under stress successfully decreased  $O_2^{\cdot-}$  content. Besides, the exogenously applied FA under 4 mM B stress increased the activities of CAT and POX. Although B stress in wheat leaves did not trigger the induction in the activities of APX, GR, monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) and total ascorbate (tAsA) and dehydroascorbate (DHA) contents, FA with stress did. 25  $\mu$ M FA under B stress remarkably maintained the regeneration and induced contents of tAsA and GSH including ascorbate-glutathione cycle as well as induced CAT activity. Thanks to this activation of antioxidant enzymes, stress-induced  $H_2O_2$  content significantly decreased and the scavenging activity of  $OH^{\cdot}$  increased in wheat with FA application. Also, FA prevented the lipid peroxidation (TBARS) caused by stress because of induced scavenging activity of radicals.

**Keywords:** Antioxidant system; Boron stress; Ferulic acid; Phenolic compounds; Water content

## ÖNSÖZ

Deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun belirlenmesinde ve analiz sonuçlarımın değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK hocama teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşim Ceyhan Pırıl KARAHAN'a, aileme ve değerli dostum Hasan Hüseyin KAZAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hüseyin KARAHAN  
KONYA-2019

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1. Bor Elementi ve Bitkiler Açısından Önemi .....	4
2.1.1. Bitki köklerinden bor alımı.....	4
2.1.2. Bor eksikliği.....	5
2.1.3. Bor toksisitesi .....	5
2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Bitkiler Üzerine Etkileri .....	6
2.2.3. Hidroksil radikali (OH <sup>•</sup> ).....	9
2.3. Buğday Bitkisinin Genel Özellikleri ve Buğdayda Bor Stresi .....	9
2.3.1. Buğdayda bor toksisitesi.....	10
2.4. Ferulik Asit .....	13
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1. Bitki Materyalinin Temini ve Saklanması .....	15
3.2. Deneme Serilerinin Hazırlanması .....	15
3.2.1. Fidelere uygun ferulik asit ve bor konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	15
3.2.2. Denemenin kurulması .....	16
3.3. Analiz Yöntemleri.....	16
3.3.1. Büyüme parametreleri.....	17
3.3.2. Yaprakların ROS içeriklerinin belirlenmesi .....	18
3.3.3. Yaprakların lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinin belirlenmesi.....	19
3.3.4. Enzimatik antioksidanların aktivitelerindeki değişimlerin belirlenmesi .....	19
3.3.5. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi.....	22
3.4. İstatistiksel Analizler .....	22
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA</b> .....	<b>23</b>
4.1. Yaprakların Su İlişkileri.....	23
4.2. Yaprakların ROS ve TBARS İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler .....	24
4.3. Enzimatik Antioksidanların Aktivitelerindeki Değişimler .....	26
4.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler .....	35

<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	<b>37</b>
5.1. Sonuçlar .....	37
5.2. Öneriler .....	38
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>47</b>



## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Kültürlenmiş buğday türlerinin evrimsel değişimi ve genetik etkileşimleri (Shewry, 2009)..... 10
- Şekil 4.1.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in yaprak bağıl su içerikleri (RWC), ozmotik potansiyel ve prolin (Pro) içeriklerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 23
- Şekil 4.2.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in yaprak süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ),  $OH^{\cdot}$  radikali süpürülme aktivitesi ve lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 25
- Şekil 4.3.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) SOD izozimleri ve (B) total SOD aktivite ( $Units\ mg^{-1}\ protein$ ) değişimleri. Jele  $40\ \mu g$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 27
- Şekil 4.4.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in total katalaz (tCAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 28
- Şekil 4.5.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in peroksidaz (POX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) POX izozimleri ve (B) total POX aktivite ( $Units\ mg^{-1}\ protein$ ) değişimleri. Jele  $40\ \mu g$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). .... 29
- Şekil 4.6.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in askorbat peroksidaz (APX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) APX izozimleri ve (B) total APX aktivite ( $Units\ mg^{-1}\ protein$ ) değişimleri. Jele  $40\ \mu g$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 30
- Şekil 4.7.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) GR izozimleri ve (B) total GR aktivite ( $Units\ mg^{-1}\ protein$ ) değişimleri. Jele  $40\ \mu g$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 31
- Şekil 4.8.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in NADPH oksidaz (NOX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) NOX izozimleri ve (B) total NOX aktivite ( $Units\ mg^{-1}\ protein$ ) değişimleri. Jele  $40\ \mu g$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ). ..... 32
- Şekil 4.9.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR-A), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR-B) enzim aktiviteleri ile dehidroaskorbat (DHA-C),

total askorbat (tAsA-D), indirgenmiş glutatyon (GSH-E) ve okside glutatyon (GSSG-F) içeriklerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P<0.05$ ).... 33



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

%: Yüzde

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

O<sub>2</sub>: Oksijen

OH<sup>•</sup>: Hidroksil radikali

### Kısaltmalar

APX: Askorbat peroksidaz

CAT: Katalaz

Co: Kobalt

DAB: 3.3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DHAR: Dehidroaskorbat redüktaz

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

FA: Ferulik asit

g: Gram

GR: Glutasyon redüktaz

KA: Kuru ağırlık

KCN: Potasyum siyanür

MDA: Malondialdehit

MDHAR: Monodehidroaskorbat redüktaz

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

NBT: Nitro blue tetrazolium

NOX: NADPH oksidaz

POX: Peroksidaz

PVPP: Polivinilpolipirrolidon

ROS: Reaktif oksijen türleri

RWC: Nispi su içeriği

SOD: Süperoksit dismutaz

TA: Turgorlu ağırlık

TBA: Tiobarbütirik asit

TCA: Trikloroasetik asit

YA: Yaş ağırlık

µg: Mikrogram

µM: Mikromolar

## 1. GİRİŞ

Canlı varlıklar üzerinde stres, yaşadığı ortam ve çevrede gerek fizyolojik gerekse biyolojik olarak canlıyı olumsuz yönde etkileyen, yaşam kapasitesini azaltan ve zora sokan durumlar olarak nitelendirilir. Stres durumunun oluşması için canlının bu yaşadığı çevre ve ortamda bir takım değişimlerin meydana gelmesi gerekmektedir. Meydana gelen bu değişimler canlıları etkiler. Canlılar da bu değişimlere tepki göstererek olumsuz durumları yenmeye çalışarak yanıt verir. Doku ve organlarda meydana gelen değişimler ile strese karşı tepki başlar, dış ve iç ortamı dengede tutma ile strese verdiği tepki son bulur. Bitkilerin strese gösterdiği değişim türler içerisinde değişiklik gösterir. Ancak türlerde benzeri karakteristiğe ait fizyolojik cevaplar görülür (Lichtenthaler, 1996).

Bitkide stres faktörlerinin vermiş olduğu zarar, çevreye genetik olarak uyum sağlama durumuna bağlı olarak değişmektedir. Bu adaptasyon, farklı bitkilerin habitatlarının en iyi şekilde etkileyen faktördür. Bitkilerin strese dayanıklılığı, strese karşı geliştirmiş oldukları sistemlerle ya stresin etkisini bertaraf ederler ya da strese karşı geliştirdikleri mekanizmalarla engel olurlar (Mahajan ve Tuteja, 2005). Bitkiler yaşamları boyunca kuraklık, tuzluluk, ışık, yüksek veya düşük sıcaklık, besin yetersizliği ve toksisitesi, UV ve ağır metaller gibi yaşamsal faaliyetleri sınırlayan ve zora sokan stres durumlarına maruz kalırlar (Allakhverdiev ve ark., 2000).

Bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için az veya çok miktarda besin elementlerine ihtiyaç duyarlar. Minimal miktarda ihtiyaç duydukları bu elementleri şu şekilde sıralayabiliriz; bor, demir, bakır, mangan, çinko, molibden, kobalt, vanadyum ve wolfram gibi. Bu elementler çok az miktarda ortamda bulunduğu bitki gelişimi için pozitif etki sağlarlar. Ancak bu ve benzeri moleküllerin miktarında artış strese neden olabilir. Bor gibi mikrobese elementlerinin fazlaca bulunması toksik etkiye neden olarak bitkilerde stoma hareketleri, fotosentez, çimlenme, transpirasyon, su alımı, enzim aktivitesi, membran stabilitesi ve hormonal denge gibi fiziksel faaliyetlerin engellenmesine ve bozulmasına yol açabilmektedir (Aller ve ark., 1990).

Bor elementinin bitkilerin gelişimi açısından yararı ve toksisite aralığının çok az olmasından dolayı tarımsal açıdan çok ilginç bir elementtir (Blevins ve Lukaszewski, 1994). Bor elementinin bitkiler üzerindeki zararı, kurak ve yarı kurak bölgelerde üretimi kısıtlamaktadır. Bor elementinin eksilik ve zarar durumu birbirine çok yakındır ve bitkilerde bu elemente çok az miktarda ihtiyaç duyarlar (Brown ve ark., 2002). Bor

elementi bitkilerde önemli etkilere sahiptir ve toprakta hiç bulunmaması durumunda bitki gelişimini durdurur (Loomis ve Durst, 1992; Veliöglu ve ark., 1999). Genellikle ülkemizde tarımsal faaliyetlerde sulama yapılırken fabrikalardan çıkan atık sular veya kirlenmiş sular kullanılmaktadır ve bu durumdan dolayı topraklarda bor elementi birikmektedir. Bu da bitkilerin zarar görmesine ve toprakların kirlenmesine neden olmaktadır (Eraydın, 2000). Bitki gelişiminin normal seyrinde ilerleyebilmesi için bor elementine ihtiyaç duyulmaktadır fakat fazlası toksik özelliğinden dolayı bitki yetiştiriciliğini engelleyen önemli bir problemdir (Gupta ve ark., 1985).

Bor, pasif absorpsiyonla topraktan kökler vasıtasıyla bitkiye ulaşır ve aktarımda toprağın pH'ı, nemi ve sıcaklığı etkili olur (Goldberg, 1997). Hücre zarı, nükleik asit, protein, polen çimlenmesi, kök uzaması ve indol asetik asit metabolizması üzerinde bor elementinin etkisi vardır (Lewis, 1980; Lovatt, 1985; Robertson ve Loughman, 1974; Mahboobi ve ark., 2000).

Borun bitkilere verdiği zararlar şu şekilde sıralanır; hücre çeperinde hasar, NADH, NADPH ve ATP'ye bağlanan riboz kısımlarında metabolik bozukluklar meydana getirir. Bu toksisitelere ek olarak yapraklarda yoğun olarak biriken bor elementi, transpirasyon akım yönündeki osmotik düzeni bozar (Reid ve ark., 2004).

Bor elementinin çok fazla bitki çeşidinde biyokimyasal, fizyolojik ve yapısal faaliyetlere etki gösterdiği bilinmektedir. Bor toksisitesinde genel olarak görülen belirtiler kök uzamasının engellenmesi, kuru madde kaybı, yapraklarda öncelikle uç ve kenarlarda başlayan kahverengi lekeler ile sararma ile başlayıp patolojik doku ölümleri ile devam eden bozulmalar, kabuk ölümleri ve kambiyum nekrozuna bağlı gövde ölümü ve yaşlı yaprakların erken dökülmesidir (Blevins ve Lukaszewski, 1998). Şu sıralar yapılan çalışmalarda bor toksisitesinin aynı türler arasında olduğu gibi farklı türlerin genotipleri arasında da bu zarara karşı duyarlılık olduğu ve bu farklılıkların nedeni ise bitkilerin bor elementine olan toksisite etkisine aynı oranda morfolojik ve fizyolojik olarak etkilenmemesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Shireen ve ark., 2018).

Beslenmelerinin temeli tahıla ve bitkisel ürünlere dayalı olan ülkelerde, bitkilerin beslenmesi çok önemlidir. Çeltik, mısır ve buğday gibi ürünlerin üretim oranı dünyada %54 iken, Türkiye gibi gelişen ülkelerde bu oran %90'a ulaşmaktadır (Graham ve Welch, 1996). Türkiye'de tarımsal üretim yapılan alanların neredeyse yarısında tahıl üretimi yapılmaktadır ve bu üretimin yapıldığı alanların %67'sinde buğday yetiştirilmektedir (Unakıtan ve Aydın, 2018).

Genellikle bitkilerin bor elementine duyduğu ihtiyaç oldukça azdır ve bir karşılaştırılma yapılacak olursa tek çenekli bitkilerin çift çenekli bitkilere göre bor elementine ihtiyacı daha azdır (Marschner, 1995). Tahıllar bor elementine karşı oldukça duyarlı bitkilerdir. Buğday, yetiştiği ortamda 2 mg/kg'a kadar bora dayanıklıdır fakat bu oranın üzerindeki bordan olumsuz yönde etkilenir (Gupta ve ark., 1985).

Fenolik asitlerin günümüzde yapılan araştırmalara göre kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı önemli bir etkisi olduğundan dolayı bu asitler üzerinde çok fazla çalışma yapılmaktadır (Heleno ve ark., 2015). Fenolik asitlerin antimikrobiyal, antialerjenik, antioksidan, iltihap oluşumu önleme ve anti-trombotik gibi birçok etkisinin var olduğu ve bu olumlu etkilerinin asıl nedeninin antioksidan etki göstermelerinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır. Bunların yanında kaynaklardaki bazı bilgiler fenolik bileşenler ve antioksidan arasında bir bağ olduğunu savunurken başka kaynaklardaki araştırmalar ise bunların arasında bir ilişki olmadığını belirtir (Balasundram ve ark., 2006).

Ferulik asit sebze ve meyvelerde çok fazla bulunan sağlık bakımından olumlu etkisi olan fenolik bir bileşiktir (Srinivasan ve ark., 2007). Bu bileşen, pirinç, yulaf, buğday, kahve turunçgiller, yaban mersini ve elmada çok fazla bulunmaktadır (Clifford, 1999). Ferulik asit fenolik hidroksil grupları ile serbest radikallere karşı proton veya hidrojen iyonları sağlayarak antioksidan etki gösterir (Fazary ve Ju, 2007). Ferulik asitler aynı zamanda aktif oksijen veya süperoksit dismutaza benzeyen süperoksitin toksisitesine karşı da koruyucu görevi vardır (Srinivasan ve ark., 2007).

Sunulan çalışma, yukarıda verilen bilgiler çerçevesinde, eksojen ferulik asidin, buğday fidelerinde bor stresine karşı iyileştirici etkilerinin araştırılmasını amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, buğday fideleri, hidroponik ortamda ferulik asitle ya da borla kombinasyonlu olarak muamele edilmiş ve bitkilerdeki su miktarı, ozmotik potansiyel, prolin içeriği, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit seviyesi, süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz enzim aktiviteleri ile askorbat ve glutatyon içeriklerindeki değişimler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ferulik asidin, buğday fidelerinde aşırı bor uygulaması ile oluşan reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde etkili olduğunu göstermiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Bor Elementi ve Bitkiler Açısından Önemi

Bor, metaloid içerisinde alt grup III'ün bir üyesidir ve metal- metal olmayan arası bir özellik gösterir (Marschner, 1995). Doğada az bulunmasına karşılık bor elementi litosferden hidrosfere bir dağılım gösterir ve kayalarda, nehirlerde ve okyanuslarda bulunur (Shorrocks, 1997; Power ve Woods, 1997; Lemarchand ve ark., 2000).

Bor bitkiler için önemli bir elementtir ve tarımsal üretimde, toprakta ve sulama suyunda bor mevcudiyetiyle kritik düzeyde belirleyicidir (Warington, 1923; Tanaka ve Fujiwara, 2008).

Toprakta bor, borik asit formunda tutulur ve yoğun yağış koşulların kolayca topraktan süzülür. Bu durum, bölgede yetişen bitkiler açısından bor eksikliğine neden olur (Shorrocks, 1997; Yan ve ark., 2006). Ancak, aksi durumda, az yağışlı koşullarda toprakta bor birikmesine bağlı olarak bitkide bor toksisitesi görülür (Reid, 2007). Ayrıca yer altı sularında yoğun miktarda bulunabilecek bor elementinin, evaporasyonla toprağa karışması da bitkiler açısından toksik etki yaratabilir (Tanaka ve Fujiwara, 2008).

Bor ve borik asit, cis-konformasyonunda iki hidroksil grubu içeren biyolojik bileşenlerle kompleksler oluşturabilir. Borun bu zamana kadar yüksek bitkilerde bildirilmiş en önemli fonksiyonu, rhamnogalacturonan II rezidüleriyle borat esterler oluşturma kapasiteleridir (Kobayashi ve ark., 1996). Bu kompleks oluşumu, bitkide hücre duvarı porositelerinin ve geriliminin kontrolüne önemli derecede izin verdiğinden hücre duvarı yapısı ve görevi için kritiktir (Fleischer ve ark., 1999; Ryden ve ark., 2003; O'Neill ve ark., 2004). Bu kompleksin oluşumunda yaşanacak aksaklıkların normal bitki büyümesine olumsuz etki edeceği farklı çalışmalarda vurgulanmıştır (Matoh, 1997; Ishii ve ark., 2001; Noguchi ve ark., 2003).

#### 2.1.1. Bitki köklerinden bor alımı

Borun köklerce normal pH'lı (pH 5.5-7.5) topraklardan alımı birkaç farklı yolla gerçekleşebilir; ancak, en iyi bilinen mekanizma borik asit şeklinde alınmasıdır. Bor konsantrasyonuna bağlı olarak, kökler boru (i) lipid bilayer boyunca pasif difüzyon, (O'Neill ve ark., 2004) majör intrinsik protein (MIP) kanalı yoluyla kolaylaştırılmış

transport ve (iii) BOR transporterleri aracılığıyla gerçekleşen, düşük bor koşullarında indüklenen ve enerji bağımlı yüksek afinite transport sistemi aracılığıyla alırlar (Tanaka ve Fujiwara, 2008).

Yüksek bor konsantrasyonu içeren koşullarda, bor köklerden, lipid bilayer üzerinden pasif difüzyonla absorplanır. Borun teorik ve deneysel geçirgenlik katsayısı pasif difüzyonun gerçekleşebileceğini kanıtlamaktadır (Brown ve ark., 2002).

Borun küçük nötral molekülleri transport eden MIP kanalları ile taşınabileceği, bu kanalları bloke eden civa klorit ve floretin gibi moleküllerin kullanılmasıyla deneysel olarak kanıtlanmıştır (Dordas ve Brown, 2000).

Düşük bor koşullarında, borun köklerce aktif transport aracılığıyla alınabileceği metabolik inhibitörler ve köke soğuk uygulamasıyla gösterilmiştir (Pfeffer ve ark., 1999; Dannel ve ark., 2000). Bilinen ilk bor aktif transport sistemi, pirinçte görülen BOR transport (OsBOR1) sistemidir (Nakagawa ve ark., 2007).

### **2.1.2. Bor eksikliği**

Bor eksikliği, vasküler bitkilerde çok farklı süreçler üzerinde etki gösterebilir. Bunlar kök uzaması, indolasetik asit oksidaz aktivitesi, şeker translokasyonu, karbonhidrat metabolizması ve nükleik asit sentez mekanizmasıdır (Goldbach ve Wimmer, 2007). Tüm bu mekanizmalara ek olarak bor eksikliği, membran potansiyeli, membranlar arası iyon akışı, hücre iskeleti proteinleri, fenoliklerin ve poliaminlerin akümülyasyonları ve nitrojen metabolizması üzerine de etki eder (Camacho-Cristóbal ve González-Fontes, 2007).

### **2.1.3. Bor toksisitesi**

Bor toksisitesi, tarımsal bölgelerde ekin verimi üzerinde ciddi etkiler gösteren bir problemdir ve düşük yağış oranı ve düşük süzülme oranları ile alkalın ve salın topraklarda karakterize edilir (Nable ve ark., 1997).

Bor toksisitesi, vasküler bitkilerde birçok olumsuz etkiye sahiptir. Bunlar değişen metabolizma, azalan kök hücre bölünmesi, azalan yaprak klorofil içeriği ve fotosentez oranı ve düşen lignin ve süberin seviyeleri şeklinde sıralanabilir (Nable ve ark., 1997). Artan bor konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde gövde ve kök gelişiminde azalma görülmektedir (Nable ve ark., 1990).

Aşırı bor bitkide tipik toksisite semptomları gösterir özellikle yaşlı yapraklarda kloroza ve nekroza neden olur (Marschner, 1995; Roessner ve ark., 2006). Bor toksisitesinin fizyolojik temelleri tam olarak bilinmese de borun kimyasal yapısından kaynaklanan çıkarımlar vardır. Buna göre bor toksisitesi (i) hücre duvarı yapısında değişikliklere neden olur (O'Neill ve ark., 2004), adenosin trifosfat, nikotinamid adenin dinükleotid ya da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat gibi moleküllerin riboz yapılarına bağlanarak metabolik bozulmaya neden olur ve (iii) RNA'da ya da serbest durumdaki riboz yapılarına bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişmesinde bozulmalara yol açar. Bor toksisitesi en yoğun olarak, fotooksidatif stres aracılığıyla reaktif oksijen türlerini oluşturup birçok hücresel sürecin olumsuz etkilenmesine atfedilir (Reid ve ark., 2004).

## 2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Bitkiler Üzerine Etkileri

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için mutlak gerekli olmasına rağmen, normal metabolizma faaliyetleri sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücutta çok fazla olumsuz etki oluşturmaktadır (Diplock ve ark., 1998). Serbest radikaller, bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom, molekül veya atom grubu içerirler. Ancak,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Mo^{+5}$  elementleri serbest radikallerin tanımına uygun oldukları halde, bu grubun içerisinde yer almazlar. Bu elementlerin, serbest radikallerin oluşmasında önemli etkileri vardır (Kocuyigit ve ark., 2004).

Süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen biyolojik sistemler için en başta gelen serbest oksijen radikalleridir. Bir süperoksit radikali olmayan hidrojen peroksidin atomları çiftleşmiştir ancak serbest oksijen radikallerini çok kolay bir şekilde oluşturmasından dolayı bu kategoride incelenmektedir (Fridovich, 1997).

Serbest oksijen radikalleri vücut metabolizmasının normal işleyişi sırasında da oluşabilmektedir. Bu basamaklarda oluşan serbest oksijen radikallerinin organizmaya zarar verme olasılıkları oldukça yüksektir fakat bu radikallerin meydana gelişi mecburidir (Lushchak, 2014).

DNA, protein, lipid ve karbonhidratların yapısına reaktif oksijenler girerek reaksiyon oluşturmaktadırlar ve bunların amacı bu yapılardan elektron almaktır. Bu reaksiyonlar gerçekleştiğinde ortaya çıkan oksidanların fazla miktarda olması halinde lipidlerin yapısının bozulmasına yol açarak zar yapısındaki geçirgenliğe zarar verir ve

DNA, RNA ve proteinlerin yapısına zarar vererek hasarlar oluşturmaktadırlar (Brieger ve ark., 2012).

Bitkilerde reaktif oksijen türleri endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonları, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde, NADPH oksidaz; plastid ve peroksizomlarda hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etki etmesiyle fazlaca oluşan serbest radikallerdir. Reaktif oksijen türleri bitkilerde bilinen gelişme sürecinde de oluşmaktadırlar fakat antioksidan mekanizma ile olağan bir denge sağlandığı için zarar verici bir etki oluşturmazlar (Pitzschke ve ark., 2006).

Bitkilerde reaktif oksijen türleri genellikle çevresel streslerin oluşması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Abiyotik ve biyotik streslere dayalı olarak üretilmekte olan reaktif oksijen türleri, hücrelere zarar vermekte olan en önemli unsurlardır (Joseph ve Jini, 2010).

Standartların normal olması halinde reaktif oksijen türleri bitki hücrelerinin metabolizmasının yan ürünü olarak üretilmektedirler. Ancak oluşan bu ürünlerin ölçüleri oldukça azdır ve bazı reaktif oksijen temizleme mekanizmaları ile zarar veren etkileri bertaraf edilir. Kuraklık, ağır metal, ekstrem sıcaklık, besin yetersizliği, patojen saldırılar, hava kirliliği, tuzluluk, UV radyasyonu ve herbisitler gibi çeşitli biyotik ve abiyotik stresler nedeniyle reaktif oksijen üretimi ile temizlenmesi arasındaki denge bozulabilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010).

### **2.2.1. Süperoksit radikali**

Oksijen molekülünün en dış yörüngesinde ortaklaşmamış bir çift elektron bulundurmaktadır. Dış orbitallerdeki bu elektronların paylaşılmaması, aynı yörüngede bulunması ve dönme yönlerinin aynı olması halinde enerji seviyeleri minimumdur. Son yörüngede bulunan orbitaller birer elektron daha alma kapasitesine sahiptir. Bir elektron daha alması durumunda süperoksit radikali oluşmaktadır (Fridovich, 1983).

Serbest radikallerin arasında olmasına rağmen süperoksit radikalinin reaktiflik seviyesi çok fazla değildir. Süperoksitler, yağların hücre zarlarındaki geçirgenlik durumunu azaltmaktadır ve bu sebepten dolayı üretildikleri bölgenin etrafında kalırlar. Süperoksit radikali hücreyi tek başına olumsuz yönde etkilemez. Süperoksit radikalinin asıl önemi hidrojen peroksidin indirgeyicisi olmasından kaynaklanmaktadır. Bu iki radikalın reaksiyona girmesi halinde biri okside olurken diğeri indirgenmektedir. Bu reaksiyonların sonucunda  $O_2$  ve  $H_2O_2$  oluşmaktadır (Pervaiz, 2001).

Biyomoleküllerin indirgeyici özellikleri vardır ve kendileri oksitlenirken oksijene bir elektron vererek süperoksit radikali oluşur. Ferrodoksinler, tiyoller, flavonlar, kateşolaminler, indirgenmiş nükleotidler ve hidrokinonlar gibi moleküller oksijenli ortamlarda oksitlenirler ve bunun sonucunda süperoksit yapımına neden olurlar. Mitokondrilerde enerji metabolizması anında oksijen kullanılmaktadır. Kullanılan bu oksijenin %1-5 arasındaki kısmı süperoksit yapımı içindir. Bu olaydaki oluşum dehidrojenaz, koenzim-Q ve NADPH gibi taşıyıcılardan oksijene elektron aktarılması ile olmaktadır (Murphy, 2009).

### 2.2.2. Hidrojen peroksit

Serbest radikallerden olmayan hidrojen peroksit önemli bileşiklerden biridir. Geçiş metallerinin oksidasyona uğraması sonucunda OH<sup>•</sup> oluşmasını ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesine katkı sağlarlar. Hidrojen peroksitin önemli görevlerinden biri hücre içi sinyal elemanı olmasıdır (Rhee, 1999).

Hidrojen peroksitin hem indirgeme hem de yükseltgeme özelliği vardır. Yükü olmayan hidrojen peroksit molekülü bu nedenden dolayı sulu ve lipid ortamlarda difüzyon yapabilme özelliğine sahiptir ve süperoksit radikali ile karşılaştırılacak olursa yarılanma ömrü daha uzundur. Hidrojen peroksit süperoksit radikaline göre daha güçlü bir sinyal molekülüdür (Desikan ve ark., 2004).

Hidrojen peroksidin özelliklerinden birisi de oksitleyici olmasıdır; bunun nedeni demir gibi geçiş metallerinin olması durumunda OH<sup>•</sup> radikalinin öncülü olarak görev yapmasıdır. Hidrojen peroksit, proteinlerde bulunan Fe<sup>+2</sup> ile reaksiyona girer ve yüksek oksidasyona sahip demir formları oluşturur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan demir formları güçlü oksitleme özelliğine sahiptir ve hücre membranlarında lipidlerin yükseltgemesi sonucunda bozulması gibi reaksiyonlar başlatabilirler. Hidrojen peroksitin oksitleyici özelliği sebebiyle hücreden hemen uzaklaştırılması gerekir (Winterbourn, 1995).

### 2.2.3. Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>)

Hidroksil radikali biyolojik sistemler için oldukça güçlü bir oksidandır. Radikaller içinde toksisitesi en yüksektir. Bunun yanında nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi birçok molekülü okside etme özelliğine sahiptir (Fantel, 1996). Hidroksil radikalının çok güçlü bir aktivitesi vardır ve bu aktivite sonucunda diğer radikallere göre biyolojik sistemlere daha fazla zarar verir (Betteridge, 2000).

Hidroksil radikali, hidrojen peroksidin geçiş metalleri sayesinde indirgenmesi ve hidrojen peroksidin süperoksit ile tepkimeye girmesi sonucunda oluşmaktadır (Cheeseman ve Slater, 1993).

### 2.2.4. Singlet oksijen

Ortaklanmamış elektronları olan singlet oksijen, reaktif oksijen türleri arasındadır. Singlet oksijen, yüksek enerjili oksijen formundadır. Eşlenmemiş elektronların bir tanesinin verdiği enerji sayesinde orbitaller arasında yer değiştirmesi sonucu oluşurlar (Gorman ve Rodgers, 1981).

Singlet oksijenler, biyolojik moleküllerin birçoğuyla yapısı gereği reaksiyona girerler. Serbest radikallerin oluşturduğu reaksiyonlardan meydana gelebilirler ya da singlet oksijenler reaksiyona girerek serbest radikal oluşturabilirler (Bast ve ark., 1991).

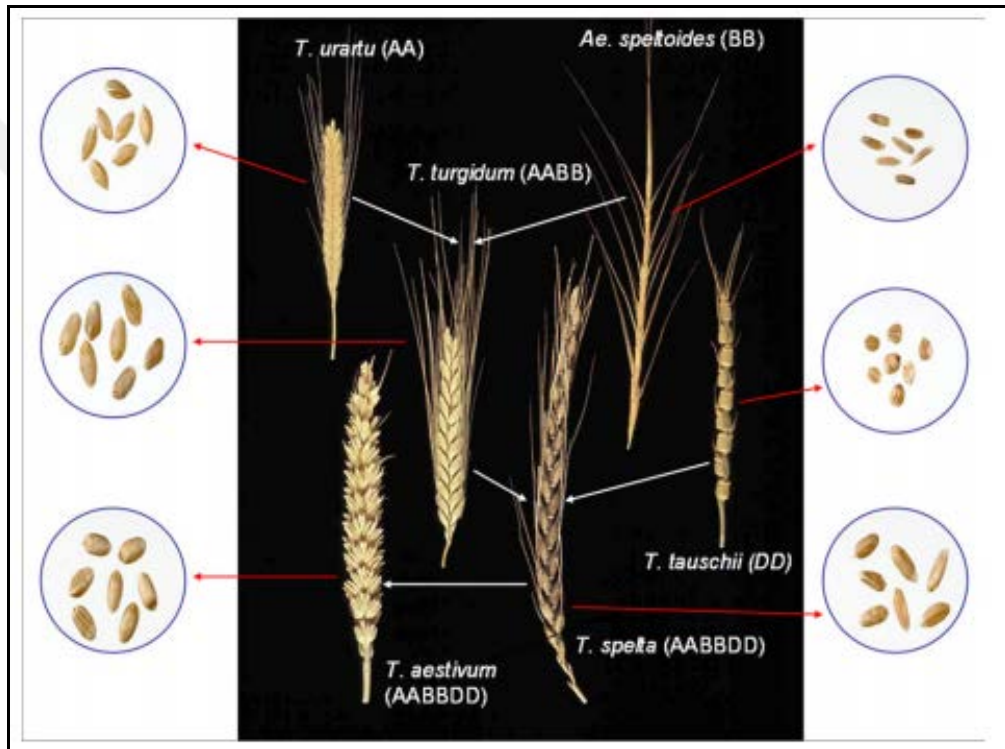
Karbon-karbon bağları özellikle singlet oksijen ile tepkimeye girmektedirler. Histidin, triptofan, sistein, trozin ve metionin, yapılarında çift bağlar bulundurmalarından dolayı yüksek elektrona sahiplerdir ve kükürt bulundururlar. Bu sebeple singlet oksijen ile oksidasyona uğrama durumları çok yüksektir (Stadtman ve Berlett, 1997).

## 2.3. Buğday Bitkisinin Genel Özellikleri ve Buğdayda Bor Stresi

Buğday, insan gıdası ve gıda stoku olarak ılıman ülkelerde en fazla tercih edilen ekindir. Fazlaca tercih edilmesinin nedeni buğday bitkisinin adapte olabilme ve yüksek verimli ürün verebilme yeteneğidir. Ayrıca buğdayın, gluten protein fraksiyonu ve bu sayede sahip olduğu viskoelastik özellikler sayesinde birçok farklı gıda besininin hammaddesi olarak kullanılabilmesi bu bitkiyi değerli kılmaktadır. Buğday ayrıca

esansiyel amino asitler, mineraller, vitaminler ve fitokimyasallar açısından da oldukça zengindir (Shewry, 2009).

Buğdayın ilk kültürlenme tarihi bundan 10.000 yıl öncesine, avcı toplayıcılıktan tarımsal döneme geçilen Neolitik Devrim'e kadar gitmektedir. İlk kültürlenmiş buğday türlerinin diploid (genom AA; einkorn) ve tetraploid (AABB; emmer) olduğu ve bu türlerin Türkiye'nin güney doğusundan kökenlendiği bildirilmiştir (Heun ve ark., 1997; Nesbitt ve Samuel, 1998). Kültürleme işlemi 9.000 yıl öncesinde Yakın Doğu'ya doğru ve heksaploid genetik yapıyla devam etmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kültürlenmiş buğday türlerinin evrimsel değişimi ve genetik etkileşimleri (Shewry, 2009).

Yakın zamanda dünya üzerinde yetiştirilen buğdayların yaklaşık %95'i heksaploid ekmek buğdayı ve kalan %5'i ise tetraploid durum buğdayıdır. Tetraploid durum buğdayı Akdeniz iklimine uyum sağlayan ve makarna buğdayı olarak bu bölgelerde yetiştirilen bir buğday türüdür (Fossati ve Ingold, 2001).

### 2.3.1. Buğdayda bor toksisitesi

Borun yukarıda belirtilen etkileri doğrultusunda buğday dahil olmak üzere farklı bitkilerde stres koşulları yarattığı ve toksisiteye neden olduğu literatürde sıkça

belirtilmiştir. Bu başlık altında, buğday türlerinde bor toksisitesinin altını çizen birkaç çalışma özetlenecektir.

Gezgin ve ark. (2002), Orta Güney Anadolu tarım bölgesinden toplanan 898 toprak örneğini analiz etmiştir. Sonuçlara göre elverişli bor miktarı, toprakların %26.6'sında  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ 'den düşük; %24.9'unda  $0.5-1 \text{ mg kg}^{-1}$  arasında; %30.5'inde  $1-3 \text{ mg kg}^{-1}$  arasında; %8.1'inde  $3-5 \text{ mg kg}^{-1}$  arasında; %6.3'ünde  $5-10 \text{ mg kg}^{-1}$  arasında; ve %3.6'sında ise  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ 'den fazladır. Bu oranlar dikkate alındığında, bölgedeki tarım arazilerinin yaklaşık %18'i tahıllar açısından yüksek bor içeriğine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bor toksisitesinin bitkilerin kök ve yeşil aksam büyümesini engelleyen ve tane verimini ciddi bir şekilde sınırlayan bir mikro element problemi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bor toksisitesinin buğdayda özellikle bitki boyunun uzamasını ve yeşil aksam gelişimini durduran, büyümeyi geciktiren ve kök gelişimini azaltan bir problem olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Huang ve Graham, 1990; Paull ve ark., 1990). Tahıllar toprakta ve dokulardaki B'un fazlalığına aşırı bir duyarlılık göstermektedir (Bergmann, 1992). Dokularındaki fazla B'a karşı oldukça duyarlı olan tahıl türleri ve çeşitlerinde, bor fazlalığından dolayı bitkisel üretimde önemli verim kayıpları saptanmıştır (Cartwright ve ark., 1984). Torun ve ark. (1999), Konya koşullarında yetiştirilen 22 buğday çeşidinin bor toksisitesine duyarlılığını sera ve tarla koşullarında araştırmışlardır. Diğer bitki türleriyle karşılaştırıldığında bor toksisitesinden kaynaklanan verim kayıplarının tahıllarda daha büyük boyutlarda olduğu bildirilmiştir. Verilere göre bor kaynaklı verim kaybı makarnalık buğdayda, ekmeklik buğdaya kıyasla daha fazla olduğu; ancak kuru madde verimlerinde bir farklılık olmadığı belirtilmiştir. Topraktaki bor stresine, türler arası farklı cevapların oluşturulduğu gösterilmiştir. Bu farklı cevaplar türler arasında, dokularda biriken bor miktarının farklılığından ve gösterilen tolerans oranlarından kaynaklanmaktadır. Buğday çeşitlerinin bora farklı dayanım göstermelerinin yeşil aksamdaki bor konsantrasyonu veya yeşil aksamdaki toplam bor miktarı ile doğrudan ilişkili olmadığı görülmüştür. Deneme sonuçlarından ayrıca, bor toksisitesine karşı çeşitlerin dayanıklılık sıralamasına sera ve tarla koşullarında hemen hemen benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Bu da çok sayıda çeşidin bora karşı reaksiyonlarının tarla koşullarında test edilmeden önce sera koşullarında test edilebileceğini göstermektedir. Yüksek B uygulamaları altında veya B toksisitesine sahip bir toprakta yetiştirilen genotiplerin B toksisitesine duyarlılığı

hakkında ön bilgi edinmede, B toksisitesinin yaprakta neden olduğu belirtilerin derecesinin belirlenmesi oldukça güvenilir bir parametre olduğu bulunmuştur.

Bergmann (1992), bitki bünyesinde kritik bor noksanlık seviyelerini buğdaygillerde (örneğin arpa, buğday vb.) 5-10 mg kg<sup>-1</sup>, çift çeneklilerde (örneğin üçgül) 20-70 mg kg<sup>-1</sup> ve haşhaşta 80-100 mg kg<sup>-1</sup> olarak bildirmiştir.

Taban ve Erdal (2000), bor uygulamasının buğday çeşitlerinin gelişimi ve toprak üstü aksamda bor dağılımının belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, killi tın tekstürlü, %12 kireç içeren, pH'ı 7.91 ve bitkiye yarayışlı bor miktarı 1.52 mg kg<sup>-1</sup> olan toprak örneğini materyal olarak kullanmışlardır. Serada 4 ekmeklik (*Triticum aestivum* L. cv: *Bobal-2973*, *Bezostaja*, *Kıraç*, *Gerek-79*) ve makarnalık (*Triticum durum* L. cv: *Çakmak-79* ve *Kızıltan-91*) buğday çeşitleri ile yürüttükleri denemede, topraklara boru 0.1 ve 10 mg kg<sup>-1</sup> olacak şekilde borik asit olarak uygulamışlardır. Makarnalık çeşitlerin ekmeklik çeşitlere göre bordan daha fazla etkilenmiş olduğunu ve bor uygulamasının *Bobal-2973* ve *Gerek-79* çeşitlerinde kuru ağırlık artışına, *Çakmak-79* ve *Kızıltan-91* çeşitlerinde ise kuru ağırlık azalışına neden olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırmada bor uygulandığında ve uygulanmadığında, buğday çeşitlerinin tümünde en fazla bor birikiminin yaprak ucunda olduğunu belirlemişlerdir. Toprağa bor uygulanmadığında, çeşitlerin toprak üstü bitki genelinde, yaprak genelinde ve ucu alınan yaprağın kalan kısmında belirlenen bor konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık belirlememişlerdir. Toprağa bor uygulandığında, çeşitlerin bora tepkilerinin ayrımlı olmasından dolayı, toprak üstü bitki genelinde, yaprak genelinde ve ucu alınan yaprağın kalan kısmında belirlenen bor konsantrasyonları birbirlerinden farklı olduğunu bulmuşlardır.

Soylu ve ark. (2004), tahıllar için düşük bor ihtiva eden (0.19 mg kg<sup>-1</sup>) topraklarda, tarla koşullarında yaptıkları çalışmada altı makarnalık buğday çeşidine (*Kızıltan-91*, *Ç-1252*, *Selçuklu-97*, *Kunduru-1149*, *Yılmaz-98* ve *Çakmak-79*) dört farklı bor dozu (0, 1, 3 ve 9 kg ha<sup>-1</sup>) uygulamışlardır. İki yıl süren araştırma sonucunda, makarnalık buğday çeşitlerinin bor dozlarına önemli derecede genotipik farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hektara 3 kg bor uygulaması ile *Kızıltan-91* çeşidinde %38'lik oranla en yüksek verim artışı sağlanırken, *Çakmak-79* çeşidinde aynı dozda %11'lik verim artışı kaydedilmiştir. Altı çeşidin ortalama tane verimi incelendiğinde verimde 1 kg ha<sup>-1</sup> bor uygulaması ile %11.3 kg ha<sup>-1</sup> ile %9 ve 9 kg ha<sup>-1</sup> ile %7 artış olduğu görülmüştür. Çeşitlerin bayrak yapraklarındaki bor miktarları, bor dozlarının artışı ile ritmik bir artış göstermiş, kontrol parsellerinde 11.1 mg kg<sup>-1</sup> olan bor

konsantrasyonu 1, 3, 9 kg ha<sup>-1</sup> bor uygulamalarında sırasıyla 14.67, 17.33 ve 24.28 mg kg<sup>-1</sup> olmuştur. Sonuç olarak makarnalık buğdayların bor eksikliğine karşı hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Bora tepki yönünden buğday çeşitleri arasında önemli genotipik farklılıkların ortaya çıkması bor eksikliğine hassas veya toleranslı genotiplerin belirlenerek bölge topraklarına uygun çeşitlerin tespit edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Rerkasem ve Jamjod (2004), buğdayda bor eksikliğinin 1960 yılından beri bilindiğini ve buğdayın bor eksikliğine dikotiledon bitkilerden daha fazla eğilimli olduğunu belirtmişlerdir. Bor fazlalığının buğdayda büyüme ve gelişmeyi etkilediği bilinmekte, eksikliği ise ticari açıdan önemli derecede verim kayıplarına neden olmaktadır. Buğday genotiplerinin bora karşı tepkileri bakımından farklılık gösterdiği, bazı genotiplerin düşük borlu topraklarda yetiştirilirken verimlerinin değişmediği fakat bazı genotiplerin de bu topraklarda bor eksikliğinden etkilenerek bu durumun verim kayıplarına neden olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar bor eksikliğine tepkilerin belirlenmesinde, en ani tepkinin kök uzamasının durması olarak nitelendirmişler, fakat bu etkinin buğdayda nadir görüldüğünü ifade etmişlerdir.

#### **2.4. Ferulik Asit**

Saf ferulik asit (3-metoksi-4-hidroksisinamik asit) sarı renkli bir kimyasaldır. Hidroksisinnamik asit ailesine mensuptur. Kimyasal yapısı kurkumine benzer. Ferulik asit kahvede, elma, yer fıstığı, portakal, ananas, enginar gibi birçok bitkinin yaprak ve tohumlarında bulunur, en çok tahıllarda özellikle kahverengi pirinç, buğday ve yulafta bulunur. Ferulik asit bir hücre duvarına ve DNA'ya zarar veren süperoksit, nitrik oksit ve hidroksil radikal gibi serbest radikalleri etkisiz hale getiren bir antioksidandır. Ultraviyole ışınlarının hücreye zarar vermesini engeller. Ultraviyole ışınlar ferulik asitin antioksidan etkisini artırır. Ferulik asit yaşlanmayı engelleyen ürünlerin içeriğinde yer alır. Araştırmalar ferulik asitin kanda şeker seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Ferulik asit kanser, kemik erimesi ve menopozal semptomlardan korur. Diğer antioksidanlar gibi kötü kolesterolü ve trigliserit seviyesini dolayısıyla kalp krizi riskini düşürür. Ferulik asit mide, kolon, göğüs, prostat, karaciğer, akciğer ve dil kanseri gibi birçok kanser türü riskinden korur (Kikuzaki ve ark., 2002).

Kikuzaki ve ark. (2002), 24 ferulik asit türü ile birlikte 6 gallik asit türünün antioksidan sistemle ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Ferulik asit, fenolik asitler

arasında en etkili türdür. Bitkilerdeki oksidasyon ve lipid metabolizması üzerine etkileri vardır. Ayrıca ferulik asit, bitkilerdeki antioksidan enzim metabolizmaları üzerinde de etkilidir.

Silici ve ark., (2013), Japon bildircını yemlerine ferulik asit ilavesinin ne gibi değişikliklere sebep olacağını araştırmışlardır. Yapılan çalışmada ferulik asit ilavesinin canlı ağırlık, yemden yararlanma ve karkas ağırlığı gibi parametreleri değiştirmediği tespit edilmiştir. Ferulik asitin serum glikoz, ürik asit ve trigliserit düzeylerini düşürücü, HDL-kolesterol düzeyini ise arttırıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyalinin Temini ve Saklanması

Proje çalışmasında kullandığımız buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) tohumları Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden Eylül 2017'de temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen tohumlar denemenin kurulması aşamasına kadar +4 °C' de saklanmıştır.

#### 3.2. Deneme Serilerinin Hazırlanması

Buğday fideleri kontrollü koşullara sahip iklim odasında su kültürü ortamında yetiştirilmiştir. Gerekli ısı, ışık, nem ve ayrıca sterilizasyon kontrolleri yapılmıştır. Buğday tohumlarının çimlendirilmesi ve çimlenme sonrası fidelerin uygulama boyutuna getirilmesi %70 nem, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±1 °C sıcaklık ile 350 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık intensitesi olacak şekilde iklim kabini içerisinde sağlanmıştır.

##### 3.2.1. Fidelere uygun ferulik asit ve bor konsantrasyonlarının belirlenmesi

Fidelere uygun konsantrasyonda ferulik asit (FA) ve bor (B) dozlarını belirlemek için ön deneme kurulmuştur. Dolgun görünüşlü sağlam ve birbirine benzer büyüklükte olan buğday tohumları seçilerek kullanılmadan önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyon için tohumlar %5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 15 dakika tutulduktan sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Tohumlar 15'er adet gruplandırılarak içerisinde deiyonize su bulunan petri kutularında kurutma kağıdı üzerinde 24±1 °C'de, karanlık ortamda iklim odasında çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlendirilen tohumlar, su kültürü ortamına aktarılmıştır. Fideler 21 gün süresince su kültürü ortamında kontrollü şartlar altında (16 saat ışık/8 saat karanlık, 24± °C sıcaklık, %70 nem, 350 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğu) büyütülmüş FA ve B uygulamasına geçilmeden önce fideler gruplandırılmıştır. Gruplandırılan fidelere 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mM B dozları ile 25, 50, 75, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarda FA uygulanmıştır ve uygulama süresinin 1 hafta olmasına karar verilmiştir. Süre sonunda fideler hasat edilerek malondialdehit içerikleri (TBARS) belirlenmiştir. Fidelerin lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi ile en uygun FA ve B dozları tespit edilmiştir.

### 3.2.2. Denemenin kurulması

Sağlam, düzgün görünüşlü ve az çok birbirine benzer büyüklükte olan buğday tohumları seçilip % 5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 15 dakika tutulduktan sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Çimlendirilen tohumlar, su kültürü ortamına aktarılmıştır. Fideler uygulama süresine kadar 16 saat ışık/8 saat karanlık,  $24\pm 1$  °C sıcaklık, %70 nem,  $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda büyütülmüş ve bor uygulamasına geçilmeden önce fideler gruplandırılarak 9 farklı bitki grubu oluşturulmuştur. B uygulaması için  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Sigma Aldrich), 1 hafta süresince Hoagland çözeltisine 2 ve 4 mM oranında, FA ise yine aynı süresince 25 ve 75  $\mu\text{M}$  dozlarında karıştırılarak uygulanmıştır. Eksojen B ve FA uygulamalarının 1 hafta sonrasında bitkiler hasat edilmiştir. Hasat edilen örnekler yapılacak analizlere uygun şekilde  $-80$  °C' de saklanmıştır.

### 3.3. Analiz Yöntemleri

Bor uygulamalarının bitki türlerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileşimlerini belirlemek amacıyla bitkilerde aşağıda belirtilen analizler yapılmıştır;

- Yaprakların bağıl su içeriklerinin (RWC) belirlenmesi,
- Yaprakların ozmotik potansiyellerinin belirlenmesi,
- Yaprakların prolin içeriklerinin belirlenmesi,
- Yaprakların ROS içeriklerinin belirlenmesi,
  - Süperoksit ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ) içeriklerinin belirlenmesi,
  - Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) içeriklerinin belirlenmesi,
  - Hidroksil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi,
- Yaprakların lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinin belirlenmesi,
- Enzimatik antioksidanların aktivite değişimlerin belirlenmesi,
  - Enzim ekstraktlarının hazırlanması,
  - Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi,
  - Katalaz aktivitesinin belirlenmesi,
  - Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi,
  - Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi,
  - Glutasyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi,

- NADPH oksidaz aktivitesinin belirlenmesi,
- Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivite tayini,
- Dehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
- Enzimatik olmayan antioksidan içeriklerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi,
  - Dehidroaskorbat içeriklerinin belirlenmesi,
  - Total askorbat içeriklerinin belirlenmesi,
  - GSH içeriklerinin belirlenmesi,
  - GSSG içeriklerinin belirlenmesi.

### 3.3.1. Büyüme parametreleri

#### 3.3.1.1. Yaprakların bağıl su içerikleri (RWC)

Yaprakların bağıl su içeriklerini belirlemek için her bir gruptan 6 yaprak örneği alınarak yaş ağırlıkları (YA) belirlenmiştir. Yaş ağırlıkları belirlenen yapraklar düşük ışık altında deiyonize su içinde petrilerde 6 saat boyunca bekletilerek turgorlu ağırlıkları (TA) tespit edilmiştir. Turgorlu yapraklar 72 saat boyunca 70 °C'de bekletilerek kuru ağırlıkları (KA) ölçülmüştür. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağıl su içerikleri aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır (Smart ve Bingham, 1974).

$$\text{Bağıl Su İçeriği} = [(YA-KA) / (TA-KA)] \times 100$$

#### 3.3.1.2. Yaprakların ozmotik potansiyellerinin belirlenmesi

Yaprakların ozmotik potansiyelleri, Wescor 5600 marka ozmotik potansiyel cihazı ile  $\text{mmolkg}^{-1}$  olarak ölçülmüştür. Ölçümler her bir gruptan beşer tekrarlı olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar, Santa-Cruz ve ark., (2002)'a göre  $2.408 \times 10^{-3}$  katsayısıyla çarpılarak MPa'ya çevrilmiştir.

#### 3.3.1.3. Yapraklarda prolin içeriklerinin belirlenmesi

Yaprakların prolin miktarının belirlenmesi Bates ve ark., (1973)'ün metoduna göre yapılmıştır. Prolin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmış ve  $\mu\text{mol prolin g}^{-1}$  YA olarak belirtilmiştir.

### 3.3.2. Yaprakların ROS içeriklerinin belirlenmesi

#### 3.3.2.1. Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) içeriklerinin belirlenmesi

Yaprakların  $O_2^{\cdot-}$  radikali seviyeleri, Xu ve ark., (2006)'larının belirttiği yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. 50 mM fosfat tampon (pH 7.8) içerisinde homojenize edilen 0.5 ml süpernatant üzerine 1 ml 1 mM'lık hidroksil amonyum klorid pipetlendi ve 25 °C'de 1 saat inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda süpernatant üzerine 1 ml 17 mM 4-amino benzen sülfonik asit ve 1 ml 7 mM  $\alpha$ -naftilamin pipetlendi ve renk değişimi için 25 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. 530 nm'de okuma yapılmıştır.  $O_2^{\cdot-}$  radikali seviyeleri sodyum nitritten hazırlanan standart eğriye göre hesaplanmıştır.

#### 3.3.2.2. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) içeriklerinin belirlenmesi

$H_2O_2$  tayini Liu ve ark., (2010)'na göre yapılmıştır. Örnekleme sonrasında yapraklar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. 0.5 g yaprak örnekleri sıvı azotta öğütüldükten sonra -20 °C' de bekletilmiş asetonun 3 ml'si homojenize edilecek ve 3000 g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. 1 ml süpernatanta 0.1 ml titanyum karışımı (%20 (v/v) titanyum tetraklorid içeren ve hidroklorik asit ile hazırlanan) eklenmiştir. Sonrasında 0.2 ml amonyum hidroksit titanyum-peroksit kompleksiyle karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı 16000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet kısmı -20 °C'ye soğutulmuş aseton ile yıkanmıştır. Sonrasında pellet 1 M  $H_2SO_4$ 'ün 2 ml'si ile çözülmüştür. Solüsyonun absorbansı 410 nm'de suya karşı okunmuştur. Örneklerdeki  $H_2O_2$  konsantrasyonları, bilinen  $H_2O_2$  miktarlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

#### 3.3.2.3. Hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi

Yaprakların  $OH^{\cdot}$  radikali süpürülme aktiviteleri, Kim ve Minamikawa (1997)'larının belirttiği yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir.  $OH^{\cdot}$  süpürülme yeteneği hidroksil radikali tarafından 2-deoksiriboz oksidasyonunun inhibisyon oranı olarak aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$$\text{Hidroksil radikali süpürülme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100$$

$A_0$  = Körün Absorbansı,  $A_1$  = Örnek Absorbansı

### 3.3.3. Yaprakların lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyon içeriklerinin belirlenmesi için, zincir reaksiyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçülmüştür. MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplanmış ve  $\text{nmol g}^{-1}$  YA olarak ifade edilmiştir.

### 3.3.4. Enzimatik antioksidanların aktivitelerindeki değişimlerin belirlenmesi

#### 3.3.4.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Hasat edilen yaprak örnekleri sıvı azotla dondurularak, biyokimyasal analizlere kadar  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. SOD, CAT, POX, GR, NOX, MDHAR ve DHAR enzimlerinin ekstraksiyonu için 0.5 g yaprak, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, % 2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 50 mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.8) homojenize edilmiştir. APX ekstraksiyonu için 2 mM askorbat içeren homojenizasyon tamponu kullanılmıştır (pH 7.8). Homojenat  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant, enzim aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü  $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 ile yapılmıştır.

#### 3.3.4.2. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre, SOD'un fotokimyasal olarak nitro blue tetrazolium (NBT)'un indirgenmesini inhibe etme yeteneğinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir.

Elektroforetik SOD izozimlerinin ayrımı Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve NBT boyamasıyla yapılmıştır. Eşit miktarda protein içeren örnekler, denatüre olmayan (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezi'ne tabi tutulmuştur (Laemmli, 1970).

### 3.3.4.3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, Bergmeyer (1970)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir.  $H_2O_2$ 'in miktarında oluşan azalma, 240 nm'de gösterdiği maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir.

### 3.3.4.4. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

POX aktivitesi Herzog (1973)'a göre belirlenmiştir. Aktivite 465 nm'de 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid'in (DAB) oksidasyonu ile, absorbansta meydana gelen artış takip edilerek hesaplanmıştır.

Peroksidaz izozimlerinin elektroforetik ayrımı; Seevers ve ark. (1971)'na göre yapılmıştır. Eşit miktarda protein içeren örnekler %10'luk denatüre olmayan akrilamid jelde sabit akım altında (120 mA) yürütülmüştür.

### 3.3.4.5. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

APX aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre yapılmıştır. Askorbat okside oldukça, spektrofotometredeki 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ( $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) yapılmıştır.

APX izozimleri, Mittler ve Zilinskas (1993)'in yöntemine göre belirlenmiştir. Örnekler yüklenmeden önce jeller 2 mM askorbat içeren tamponda  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra 40  $\mu\text{g}$  protein içeren örnekler jellere yüklenerek sabit akım altında (50 mA) yürütülmüştür.

### 3.3.4.6. Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi

GR aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976)'in yöntemine göre, 340 nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak belirlenmiştir. NADPH varlığında, okside glutatyon miktarındaki azalma, kuvarz küvette, köre karşı 180 sn boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar, glutatyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı

kullanılarak ( $\epsilon=6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen  $1 \text{ mmol ml}^{-1}$  okside glutatyon (GSSG) miktarı olarak ifade edilmektedir.

#### **3.3.4.7. NADPH oksidaz aktivitesinin belirlenmesi**

Total NOX aktivitesi, Jiang ve Zhang (2002)'in yöntemine göre XTT'nin  $470 \text{ nm}$ 'de indirgenmesi gözlenerek gerçekleştirilmiştir. NOX izozimleri Sagi ve Fluhr (2001)'un metoduna göre yapılmıştır. Jellere  $40 \mu\text{g}$  protein içeren örnekler yüklenmiştir.

#### **3.3.4.8. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini**

MDHAR (EC: 1.6.5.4) aktivitesi Hossain ve ark. (1984)'nın metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımında;  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl tamponu ( $\text{pH } 7.5$ ),  $0.2 \text{ mM}$  NADPH,  $2.5 \text{ mM}$  AsA,  $0.5$  ünite askorbat oksidaz (AO) içermektedir. Reaksiyon AO'nun eklenmesiyle başlamıştır. Aktivite  $340 \text{ nm}$ 'de  $1$  dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre  $6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **3.3.4.9. Dehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini**

DHAR (EC: 1.8.5.1) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'nin protokolüne göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı;  $50 \text{ mM}$  K-P tamponu ( $\text{pH } 7.0$ ),  $2.5 \text{ mM}$  GSH ve  $0.1 \text{ mM}$  DHA içermektedir. Aktivite örnek solüsyonuna reaksiyon karışımının eklenmesiyle başlamıştır. Aktivite  $265 \text{ nm}$ 'de  $1$  dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre  $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.3.5. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi**

#### **3.3.5.1. Askorbat ve glutatyon içeriklerinin belirlenmesi**

0.5 g yaprak örneği 3 ml soğutulmuş ekstraksiyon tamponu (1 mM EDTA içeren %5'lik metafosforik asit) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 11.500 x g'de 15 dakika 4 °C'de santrifüjlenmiş ve süpernatantlar askorbat ve glutatyon içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Askorbat içeriği (tAsA ve DHA) Huang ve ark. (2005)'lerinin metotlarında bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Süpernatant 0.5 M potasyum fosfat (K-P) pH 7.0 tamponu ile nötrale edilmiştir. Total askorbat içeriği 265 nm dalga boyunda örnekler 0.5 ünite askorbat oksidaz içeren 100 mM K-P (pH 5.6) tamponunun eklenmesiyle belirlenmiştir. Askorbat içeriğinin hesaplanmasında askorbattan hazırlanan standart eğri kullanılmıştır.

Yaprakların glutatyon içerikleri (GSH ve GSSG) Paradiso ve ark. (2008)'nin yöntemine göre 0.6 ml 0.5 M K-P (pH 7.0) ile nötrale edilen süpernatant kullanılarak belirlenmiştir. Enzimatik geri döngüye bağlı olarak glutatyon 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) ile oksitlenmiş ve glutatyon redüktaz enziminin varlığında NADPH tarafından indirgenmiştir. Glutatyon içerikleri DTNB'nin indirgenmesinden üretilen NTB'nin 412 nm dalga boyundaki absorbanstaki değişim oranlarına bakılarak tespit edilmiştir. Oksitlenmiş glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyonun (GSH)'ın 2-vinylpridin ile uzaklaştırılmasıyla belirlenmiştir. Standart eğri bilinen konsantrasyonlarda GSH ve GSSG kullanılarak hazırlanmıştır.

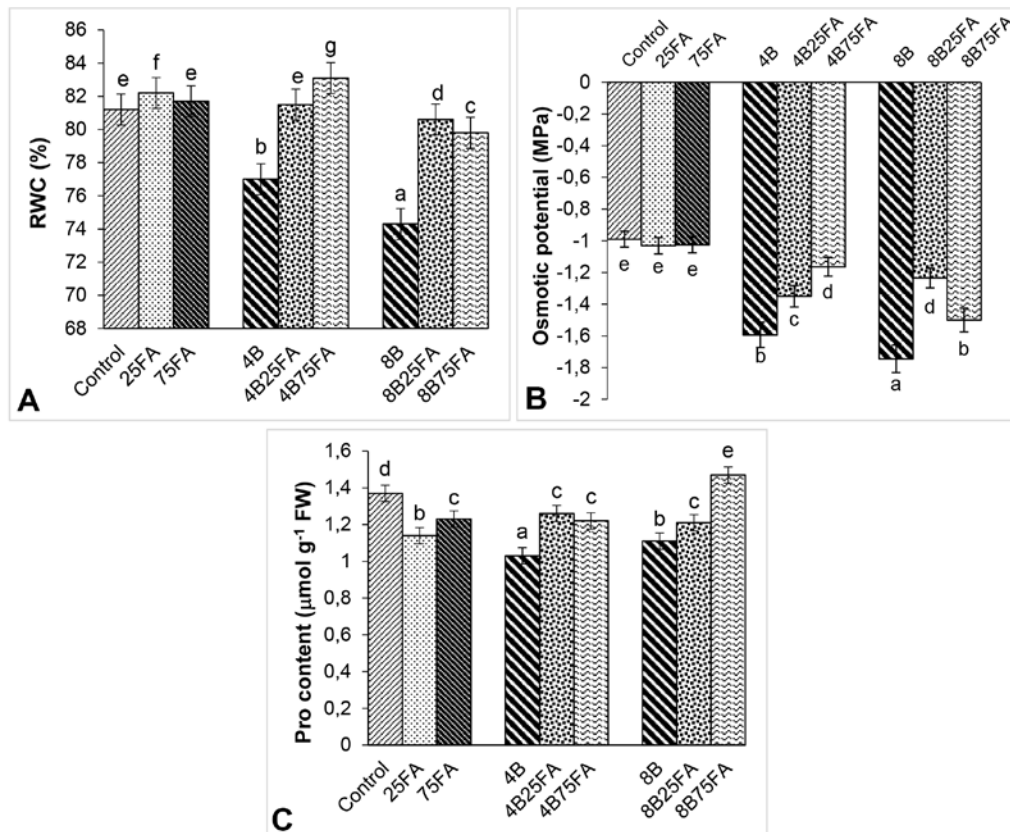
### **3.4. İstatistiksel Analizler**

Tüm uygulamalar birbirinden bağımsız olarak en az 3 kez tekrar edilmiştir ve her bir bulgu, büyüme parametreleri dışında (n=10) 2 tekrardan oluşmaktadır (n=6). Elde edilen sonuçlar tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standart Deviations (LSD) testi ile karşılaştırılmıştır. Analizlerde P< 0.05 olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (standart versiyon 13.0) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama standart hatayı göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama şeklinde verilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Yaprakların Su İlişkileri

Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin yaprak bağıl su içerikleri (RWC), ozmotik potansiyel ve prolin (Pro) içerikleri üzerine meydana getirdiği değişimler Şekil 4.1’de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdaz-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in yaprak bağıl su içerikleri (RWC), ozmotik potansiyel ve prolin (Pro) içeriklerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

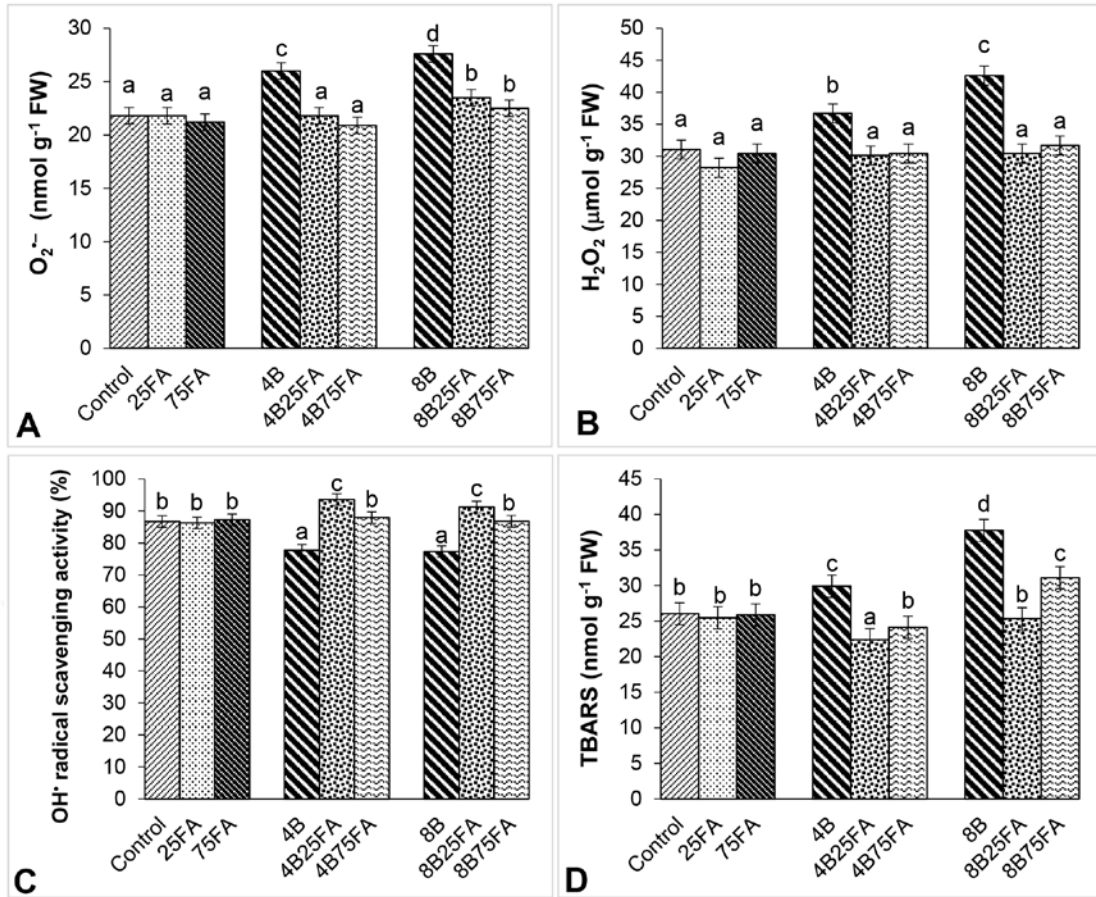
Bora (B) maruz kalan bitkilerin yaprak RWC'lerinin kontrolle kıyaslandığında %5 ve %9 oranında düştüğünü Şekil 4.1A'da görülmektedir. Bununla birlikte B ve FA ile muamele edilen bitkiler B veya FA ile ayrı ayrı muamele edilen bitkilerle karşılaştırıldığında yaprak RWC'lerinin %80-%85'ini koruyabilmişlerdir. Sadece 75 µM FA'nın tek başına ilavesi RWC üzerinde etkili olmamıştır. B uygulamasından sonra kontrol ile karşılaştırıldığında ozmotik potansiyel ( $\Psi_{\pi}$ ) düşmüştür (Şekil 4.1B). Tek başına FA kontrol ile karşılaştırıldığında ozmotik potansiyeli etkilememiştir. Tek başına

B uygulaması ile karşılaştırıldığında FA ile B'un birlikte uygulanması ozmotik potansiyeli artırmıştır. 4 ve 8 mM B uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında prolin içeriğinde %25-%23 düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.1C). FA uygulaması kontrolle karşılaştırıldığında Pro içeriğinde önemli bir değişim göstermemiştir. Sadece B uygulamasına kıyasla B+FA uygulaması Pro içeriğini önemli ölçüde artırmıştır.

Aşırı borun bitkilerin fizyolojisi, biyokimyası ve hücre yapısı üzerindeki etkileri iyi bir şekilde belgelenmiştir (Shah ve ark., 2017). Bitkilerde B toksisitesinin göstergelerinden biri su içeriğinin azalmasıdır (Simón ve ark., 2013). Bu çalışmada, RWC'nin azalması 8 mM B stresi altındaki yapraklarda daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir. Shi ve ark. (2005) tarafından da benzer sonuçlar bildirilmiştir. B'nin indüklediği RWC'deki düşüş, bozulmuş plazma membran geçirgenliği ve aşırı su kaybı ile ilişkilidir. Öte yandan, Li ve ark. (2013b) dışardan uygulanan FA ile su emiliminin artmasıyla buğday yapraklarının RWC'lerinde pozitif etki yaptığını rapor etmişlerdir. Bulgularımıza göre bor stresiyle birlikte ozmotik potansiyelde ( $\Psi_{II}$ ) önemli oranda düşüş gözlenmiştir. Bor stresiyle birlikte FA uygulamaları  $\Psi_{II}$ 'deki bu düşüşü engellemiştir. Bir ozmoprotektan olan Pro, ROS'ların ortadan kaldırılmasında ve membranların lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Hong ve ark., 2000). B toksisitesi domates ve biberde Pro içeriğini artırmıştır (Eraslan ve ark., 2007). Buna karşın çalışmamızda, aşırı B uygulamasında buğday yapraklarında Pro seviyelerinde düşüş tespit edilmiştir. B+FA uygulamalarında ise buğday yapraklarının Pro içerikleri önemli oranda artış göstermiştir. Çalışmamızda stres uygulanmış buğday yapraklarında Pro ve TBARS seviyeleri arasında ters bir ilişki vardır. FA ile B'a maruz kalan buğday yapraklarındaki Pro içeriğinin artmasına bakılırsa, FA, buğdaydaki membran stabilitesinin (düşük TBARS içeriği) ve su durumunun (artan RWC) korunmasında rol oynamış olabilir. Ayrıca El-Soud ve ark. (2013), FA'ye bağlı Pro birikimi ile antioksidan enzimler arasında bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir.

#### 4.2. Yaprakların ROS ve TBARS İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler

Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ),  $OH^{\bullet}$  radikali süpürülme aktivitesi ve lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in yaprak süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ),  $OH^{\cdot}$  radikali süpürülme aktivitesi ve lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

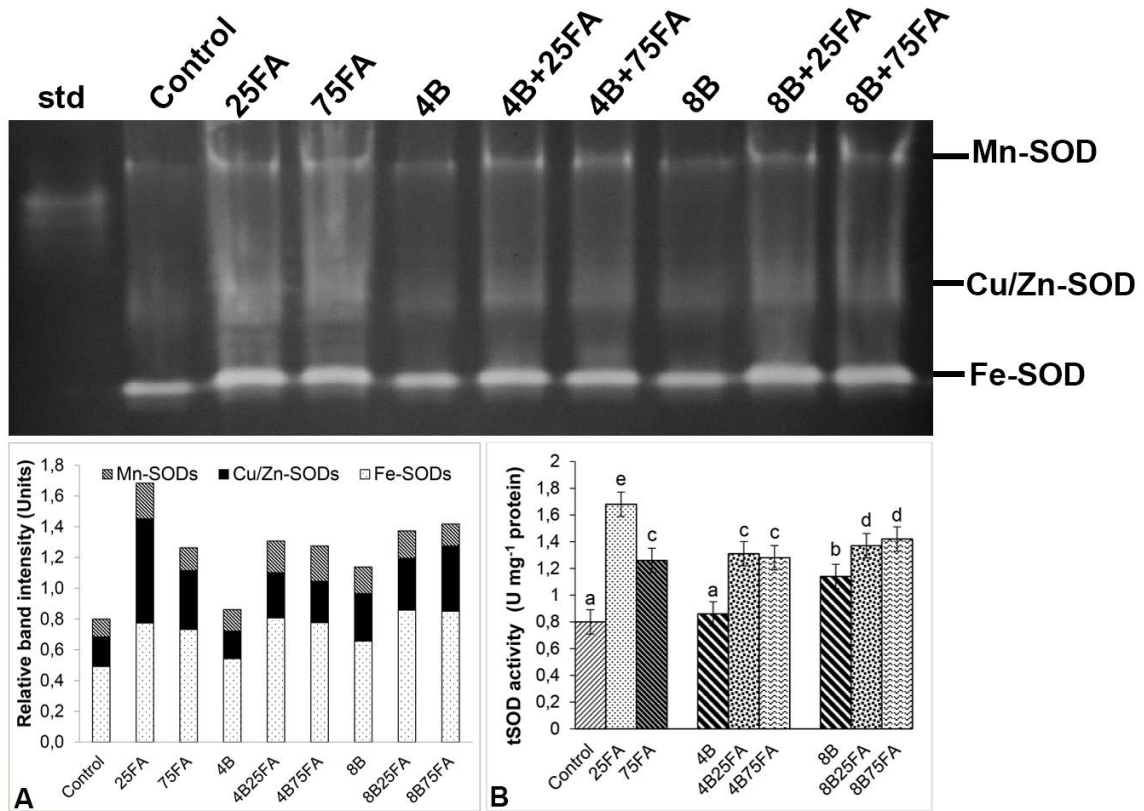
B toksisitesi altında  $O_2^{\cdot-}$  seviyeleri artarak 7 gün boyunca 8 mM B (% 21) bulunan bitkilerde maksimum seviyelere ulaşmıştır (Şekil 4.2A). B stresi ve FA  $O_2^{\cdot-}$  içeriğinde önemli düşüşe neden olurken sadece FA ile muamelede bir değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 4.2B'de gösterildiği gibi her iki B konsantrasyonu da  $H_2O_2$  içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur. 8 mM B'a maruz bırakılan buğday yapraklarında kontrole göre 1.4 katlık artış tespit edilmiştir. Öte yandan eksojen FA ile muamele edilmiş yapraklarda  $H_2O_2$  birikimi yalnız B ile muamele edilmiş bitkilerde olduğundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Yalnız FA ile muamele edilmiş yaprakların  $H_2O_2$  içeriğinde kontrole göre bir artış gözlemlenmemiştir. B ile FA uygulanan buğday yapraklarının yalnız stres uygulanan fidelerle kıyaslandığında  $OH^{\cdot}$  radikali süpürülme aktivitesinde artışa neden olurken tek başına FA bu aktivite üzerinde önemli bir etki göstermemiştir (Şekil 4.2C). B uygulamasına bağlı olarak  $OH^{\cdot}$  radikali süpürülme aktivitesinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile

karşılaştırıldığında, fazla B ile işlem gören buğday yapraklarında, lipid peroksidasyon seviyeleri (TBARS) artış göstermiştir (Şekil 4.2D). Öte yandan, 25 ve 75  $\mu\text{M}$  FA, her iki B uygulanmış bitkilerin TBARS içeriğindeki artışı hafifletmiştir.

Bor (B) fazlalığı, azalmış  $\text{CO}_2$  asimilasyonu ve azalan klorofil etkinliği ile bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olur (Han ve ark., 2009). Stresle biriken ROS'ların akümülyasyonlarının azalmasının ilk adımı, süperoksit anyon radikalini  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştüren SOD'un aktivasyonudur (Hossain ve ark., 2015). En reaktif radikal olarak bilinen  $\text{OH}^\bullet$  membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırır ve stres koşullarından kaynaklanan lipid peroksidasyonunu uyarır (Liu ve ark., 2014). B, bitki hücrelerine plazma membranının lipit çift tabakasından ve proteinli su kanallarından pasif difüzyon yoluyla girer (Dordas ve Brown, 2000). B stresi altında  $\text{OH}^\bullet$  radikal süpürülme aktivitesinin kaybı nedeniyle, buğdayda TBARS içeriği artmıştır. Sonuçlarımız Ardic ve ark. (2009)'nın ve Liu ve ark. (2017)'nin bor stresi altındaki nohut ve buğday bitkilerinde yüksek düzeyde lipid peroksidasyonu ile ilgili gözlemleriyle korelasyon göstermektedir. Öte yandan, B + FA'lı buğday yapraklarında, Li ve ark. (2013c)'nin sadece strese kıyasla daha düşük TBARS içerikleri gözlemlemesi bulgularımızı desteklemektedir.

#### **4.3. Enzimatik Antioksidanların Aktivitelerindeki Değişimler**

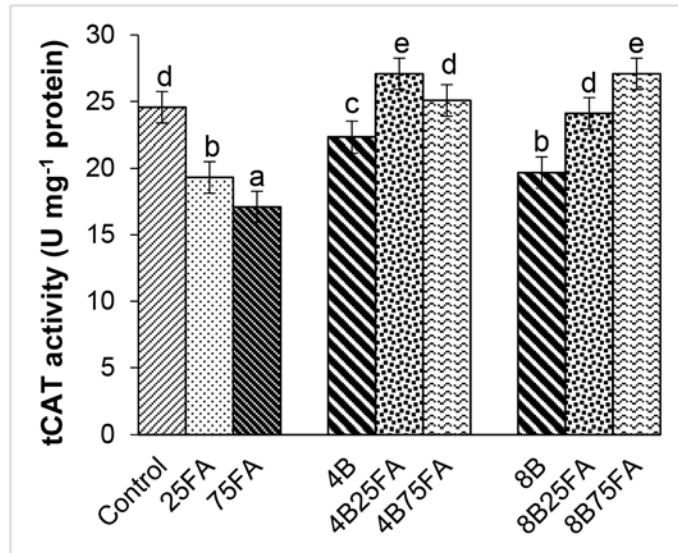
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.3'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerinde dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) SOD izozimleri ve (B) total SOD aktivite (Units  $\text{mg}^{-1}$  protein) değişimleri. Jele  $40 \mu\text{g}$ 'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

NativePAGE ile elektroforetik ayırım sonucunda yapraklardaki SOD enzimine ait üç izozim tespit edilmiştir (Mn-SOD, Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD) (Şekil 4.3A). Bant yoğunluklarındaki miktarın ölçülmesi, toplam SOD aktivitesinin ölçüleriyle gösterildiği gibi yapraklarda SOD aktivitesinde (özellikle Fe- ve Cu / Zn-SOD) önemli oranda bir artışın olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3B). Ayrıca, tüm FA konsantrasyonları hem tek başına hem de B ile birlikte SOD aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Tüm gruplarda, en yoğun olan Fe-SOD bandı bu değişikliğin ana sebebidir.

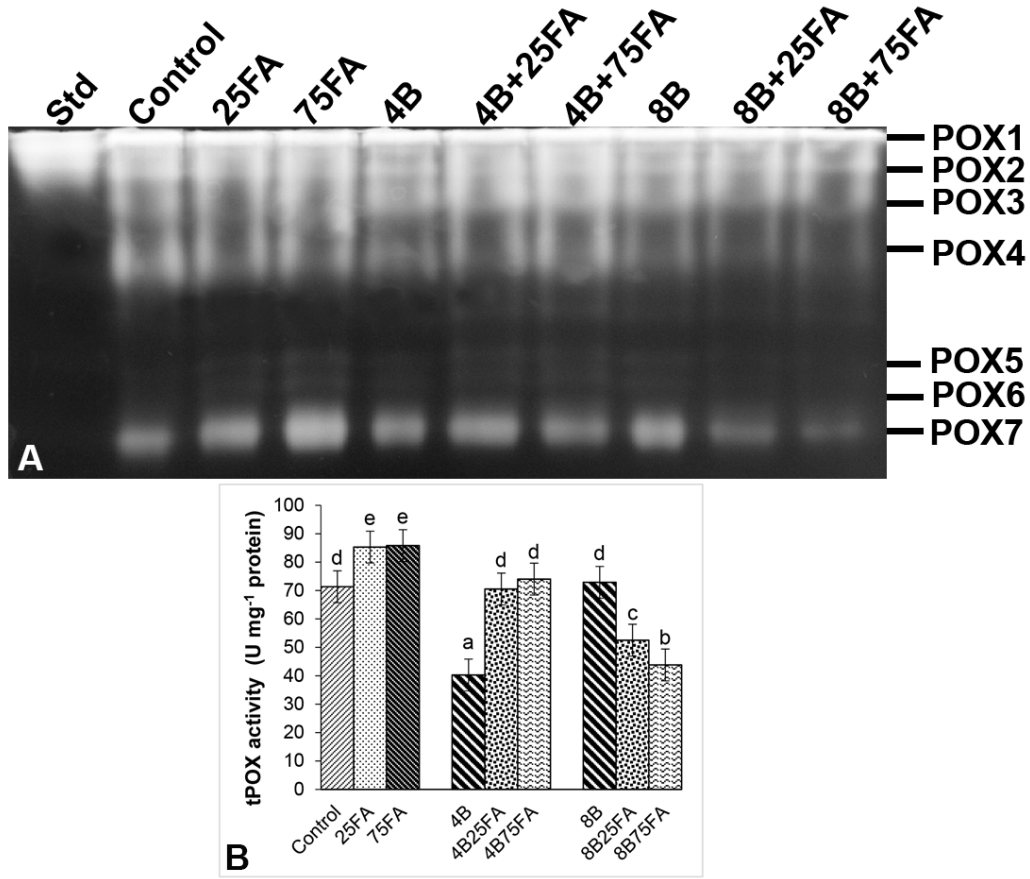
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin katalaz enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.4'de verilmiştir.



**Şekil 4.4.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in total katalaz (tCAT) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

Yalnız B uygulanan buğday yapraklarının CAT aktiviteleri kontrole göre önemli oranda azalmıştır (Şekil 4.4). Benzer şekilde, yalnız FA uygulamaları da yapraklardaki toplam CAT aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, FA ile birlikte B'nin uygulanması, yalnız B ile muamele edilmiş bitkilerle kıyaslandığında, CAT aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur.

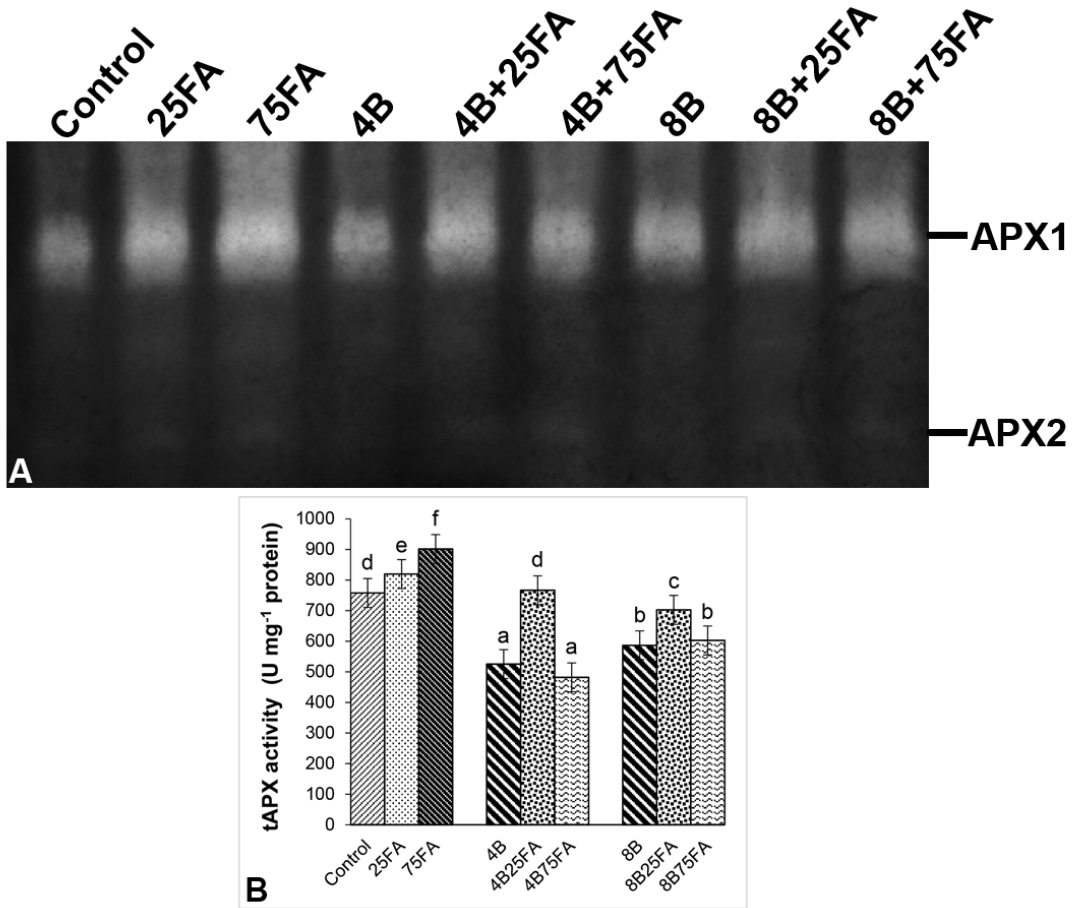
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin peroksidaz (POX) enzim ve izozim aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in peroksidaz (POX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) POX izozimleri ve (B) total POX aktivite (Units mg<sup>-1</sup> protein) değişimleri. Jele 40 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).

Elektroforetik analiz sonucunda 7 farklı POX izozimi tespit edilmiştir (Şekil 4.5A). 7 gün süresince aşırı B'a (8 mM) maruz kalan yaprakların toplam aktivitesinde bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5B). Tüm deneme süresince en düşük POX aktivitesine yalnız 4 mM B'a maruz bırakılan buğday yapraklarında rastlanmıştır. Fidelere yalnız FA uygulamaları POX aktivitesini kontrole göre önemli oranda artırmıştır. B stresi + FA uygulamaları düşük ve yüksek konsantrasyonda farklı tepkilere sahiptir. 4 mM + FA uygulamalarında POX aktivitesi önemli oranda artıyorken 8 mM B ile birlikte FA uygulamalarında azalmaların olduğu tespit edilmiştir.

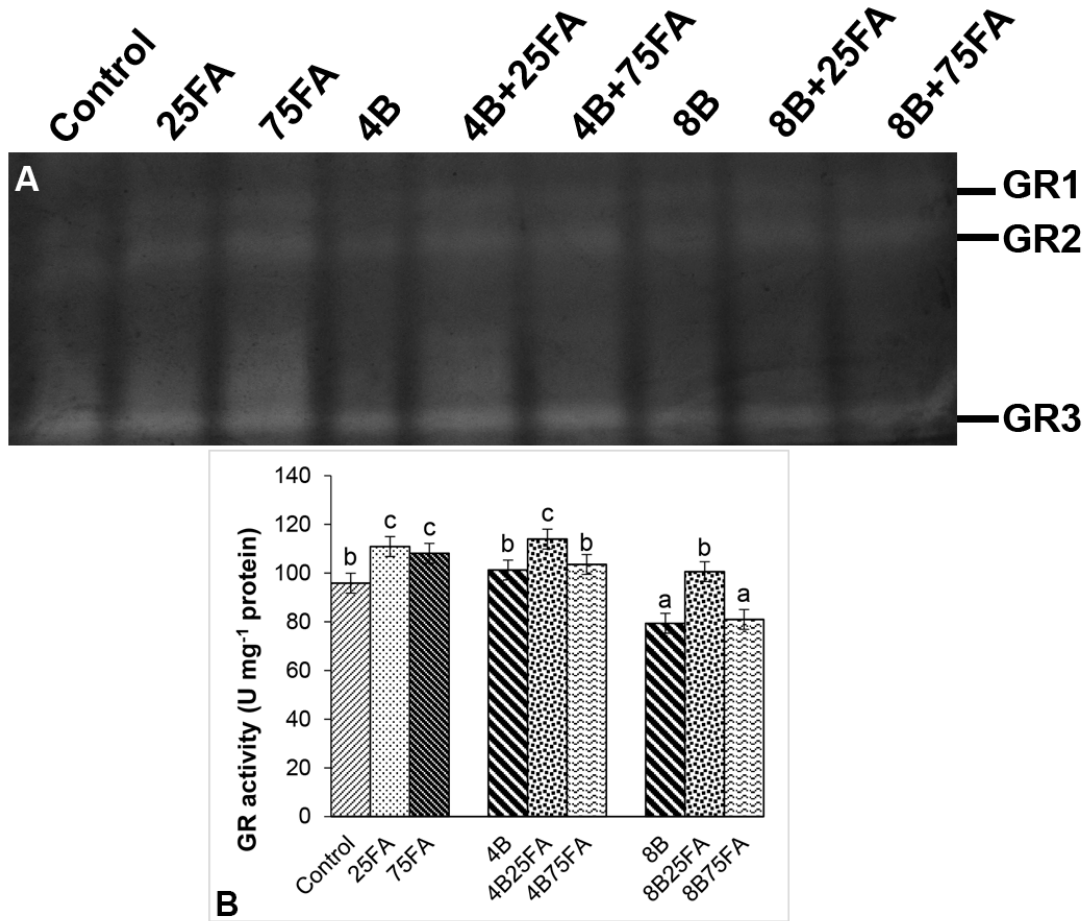
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin askorbat peroksidaz (APX) enzim ve izozim aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.6'da verilmiştir.



**Şekil 4.6.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdaz-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in askorbat peroksidaz (APX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) APX izozimleri ve (B) total APX aktivite (Units mg<sup>-1</sup> protein) değişimleri. Jele 40 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).

Elektroforetik ayırım ile toplam iki APX izoenzimi belirlenmiştir (Şekil 4.6A). B'a maruz bırakılan bitkilerin toplam APX aktiviteleri azalmış olup en yüksek düşüş % 31'le yalnız 4 mM B'a maruz bırakılan buğday yapraklarında gözlemlenmiştir (Şekil 4.6B). APX1 ve APX2 izoenzimlerinin yoğunluğu, sadece stres uygulaması ile karşılaştırıldığında, B + 25 µM FA uygulaması ile indüklenmiştir. Yalnız FA uygulamalarında APX aktivitesi sırasıyla % 8 ve% 19 oranında artış göstermiştir.

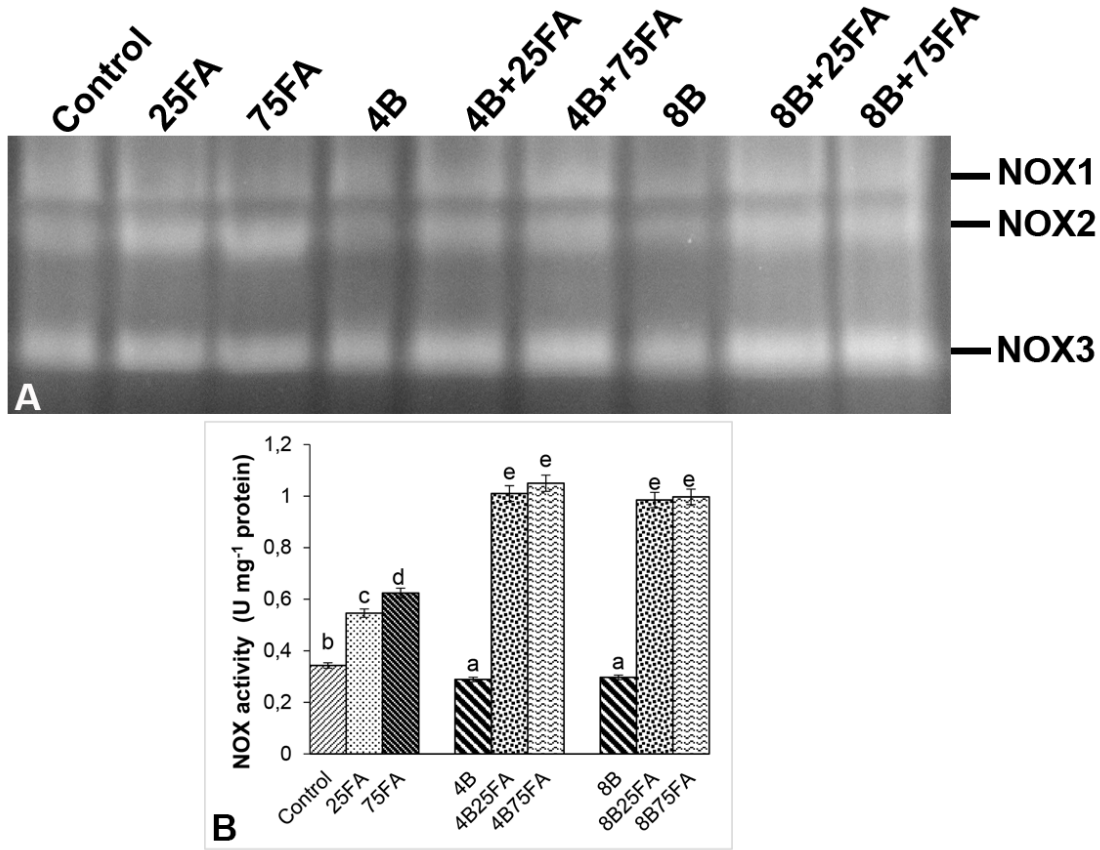
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin glutasyon redüktaz (GR) enzim ve izozim aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.7'de verilmiştir.



**Şekil 4.7.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdaz-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) GR izozimleri ve (B) total GR aktivite (Units mg<sup>-1</sup> protein) değişimleri. Jele 40 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).

Bu çalışmada NativePAGE elektroforezi sonucunda üç GR izoenzimi (GR1-2-3) tespit edilmiştir. (Şekil 4.7A). B stresinde GR aktivitesi ya değişmeden kalmış yada hafif bir azalma göstermiştir. APX aktivitesine benzer şekilde, B ile muamele edilmiş bitkilere sadece düşük FA konsantrasyonu (25 µM FA) uygulandığında, toplam GR aktivitesinde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7B). Fidelere yalnız FA uygulamaları GR aktivitesi üzerine pozitif etki göstermiştir.

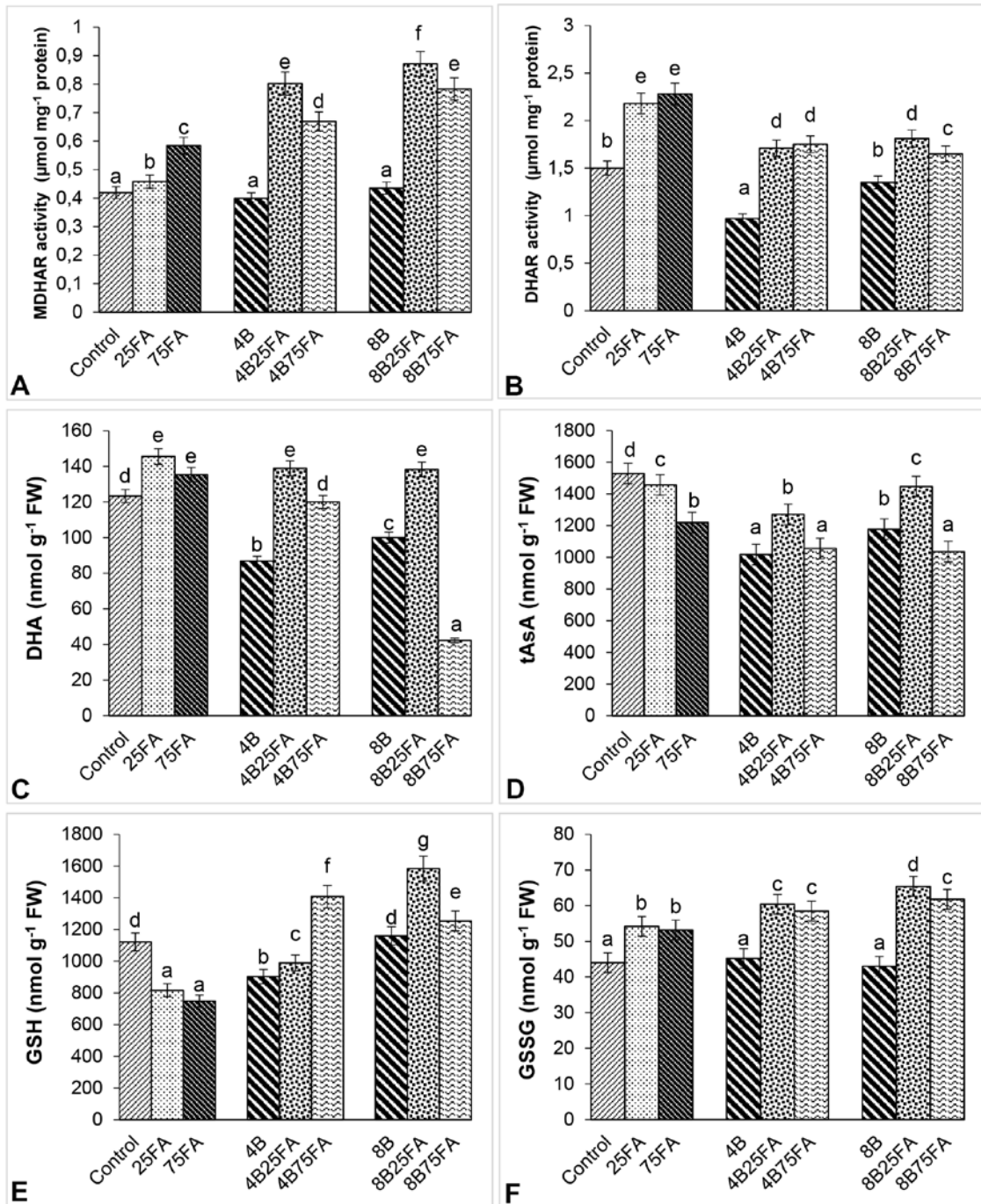
Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin NADPH oksidaz (NOX) enzim ve izozim aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdaz-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in NADPH oksidaz (NOX) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. (A) NOX izozimleri ve (B) total NOX aktivite (Units mg<sup>-1</sup> protein) değişimleri. Jele 40 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).

Buğday fidelerine bor uygulamalarının ardından elektroforetik ayırım ile üç NOX izozimi tanımlanmıştır (Şekil 4.8A). Fideler bor stresine maruz bırakıldıktan sonra kontrole göre NOX izozimlerinin her biri (NOX1-2-3) azalırken, B + FA uygulamalarında önemli oranda artışların olduğu tespit edilmiştir. Densitometrik analiz sonucunda, toplam NOX aktivitesinde gözlenen artışın, NOX2 ve NOX3 izozimlerinin ekspresyonlarındaki artıştan kaynaklandığı söylenebilir. Total NOX aktivitesinde meydana gelen artış ve azalışların (Şekil 4.8B) izozimlerin bant yoğunluklarındaki değişimlerle birebir uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Bor stresi altındaki buğday fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asidin monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzim aktiviteleri ile dehidroaskorbat (DHA), total askorbat (tAsA), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) içeriklerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.** Bor stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Dagdas-94*) fidelerine dışarıdan uygulanan ferulik asit (FA)'in monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR-A), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR-B) enzim aktiviteleri ile dehidroaskorbat (DHA-C), total askorbat (tAsA-D), indirgenmiş glutatyon (GSH-E) ve okside glutatyon (GSSG-F) içeriklerinde meydana getirdiği ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

Bor stresi altındaki buğday yapraklarının MDHAR aktivitelerinin kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9A). Stresle muamele edilmiş yapraklara FA uygulamaları MDHAR aktivitelerini artırmıştır. Her iki konsantrasyondaki B uygulamalarında da en yüksek MDHAR aktivite artışlarına düşük

dozdaki (25  $\mu\text{M}$  FA) FA'ya maruz bırakılan buğday yapraklarında rastlanmıştır. Fidelere tek başına FA uygulaması ile MDHAR aktivitelerinde kontrole göre önemli artışların olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9A).

Bor toksisitesi altında yetişen buğday yapraklarında DHAR aktivitesi kontrole göre ya azalmış veya değişmemiştir (Şekil 4.9B). Bununla birlikte, B ve FA birlikte uygulandığında, DHAR aktivite değişimleri yalnız stresli fidelerle kıyaslandığında daha fazla indüklenmiştir. Tüm deneme süresince en yüksek DHAR aktivite artışlarına yalnız FA uygulanan yapraklarda tespit edilmiştir.

Bor (B) fazlalığı, azalmış  $\text{CO}_2$  asimilasyonu ve azalan klorofil etkinliği ile bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olur (Han ve ark., 2009). Stresle biriken ROS'ların akümülyasyonlarının azalmasının ilk adımı, süperoksit anyon radikalini  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştüren SOD'un aktivasyonudur (Hossain ve ark., 2015). B toksisitesi altında genel bir SOD indüksiyonu daha önce Hamurcu ve ark., (2013) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, 4 mM B stresi altındaki yaprakların SOD aktivitesi kontrol seviyesindeyken, SOD aktivitesinde gözlenen artış sadece 8 mM B'de tespit edilmiştir.

Buğday yapraklarındaki  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriği deney süresince artmıştır. 4 mM B'daki SOD aktivitesi değişmemesine rağmen  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriğindeki artış,  $\text{H}_2\text{O}_2$  akümülyasyonuna neden olan diğer bir kaynağa bağlı olabilir. Asada, (1999), glikolat oksidazlar, glukoz oksidazlar, aminoasit oksidazlar ve sülfid oksidazlar gibi diğer enzimlerin SOD'un yanısıra  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in üretiminde görev aldığını bildirmişlerdir. Bor stresi altındaki buğday yapraklarına FA uygulanması SOD aktivitesinin indüklenmesine yol açarak  $\text{O}_2^{\cdot-}$  içeriğinde düşüşe yol açmıştır. Ferulik asidin antioksidan aktivitesi, yan zincir konjugasyonu ile ilgilidir (Marcia, 2009). Graf (1992) daha önce FA'in SOD'a benzer şekilde ROS'ları süpürücü bir aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Bu nedenle buğday yapraklarında FA, SOD benzeri bir aktivite ile radikal süperoksit anyon miktarını azaltabilir. Diğer yandan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CAT, POX, APX ve GR aktiviteleri ile  $\text{H}_2\text{O}$  ve oksijen gibi toksik olmayan moleküllere dönüştürülebilir (Hossain ve ark., 2015). Bununla birlikte, bu çalışmada stres uygulanmış buğdaydaki CAT, POX, APX ve GR aktivitelerinde bir artış görülmemiştir. Sonuçlarımız Shah ve ark. (2017)'nin elde ettiği bulgular ile uyumludur. Buğdaydaki  $\text{H}_2\text{O}_2$  birikimi bu antioksidanların aktifleştirilmemesi ile ilişkili olabilir. Stres altında  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriği ile TBARS içeriği arasında pozitif bir korelasyon vardır. Farag ve ark. (2017) yapraklarda daha yüksek B birikiminin, lipid membranların peroksidasyonunun başlıca nedenlerinden biri

olabileceğini (TBARS içeriğinde gözlemlendiği gibi) öne sürmüşlerdir. FA 4 mM B ile birlikte uygulandığında, hem CAT hem de POX aktivitesi artmıştır. POX, lignin biyosentezine doğrudan katılır ve hücre duvarındaki fenoksi radikallerini enzimatik olarak dehidrojenasyon yapan lignin öncülüdür (Lee ve ark., 2007). Buğday yaprakları düşük konsantrasyonda B'a maruz bırakılırsa, FA, POX aktivitesini indükleyerek lignin senteziyle bağlantılı olabilir. Aynı zamanda, B, FA'nın hücre büyümesini organize etmede önemli bir role sahip olarak (Ghanati ve ark., 2002) hücre duvarı fenolik bileşiklerin içeriğini belirgin şekilde artırır (Lindsay ve Fry, 2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i ortadan kaldırmak için APX, AsA'nın oksidasyonunu katalizler. AsA'nın yenilenmesi GSH'a bağlı DHAR ve GR (GSH rejenerasyon döngüsünde) veya DHA veya MDHA içerikleri aracılığıyla NADH'a bağımlı MDHAR (Luster ve Donaldson, 1987) faaliyetleri tarafından katalize edilir. Bu çalışmada bor stresi, APX, GR, MDHAR ve DHAR aktiviteleri ile AsA ve DHA içeriklerinin indüksiyonunu tetiklememiş olmasına rağmen, buğday yapraklarında FA (özellikle 25 µM FA) bu indüklemeleri başarı ile yapmıştır. Stresle birlikte 25 µM FA uygulaması askorbat glutatyon döngüsü aracılığıyla stres indüklü hasarın elimine edilmesini sağlamıştır. Stresle +25 µM FA uygulamasında MDHAR, DHAR ve GR aktivitelerindeki artış ile AsA ve GSH yeterince yeniden üretilebilir. Bulgularımız Li ve ark. (2013a)'nın hıyar fidelerine eksojen olarak uygulanan FA'in, bu enzimlerin faaliyetlerini uyardığını bildirdiği çalışmaları ile uyum içerisindedir. AsA ve GSH, apoplastta bir redoks tamponlayıcı olarak, ROS'un neden olduğu hasarın detoksifikasyonunda rol oynar (Schonhof ve ark., 2007). Böylece FA, B stresi altındaki buğday yapraklarında askorbat ve glutatyonun yeniden üretilmesiyle askorbat ve glutatyonun havuzunu koruyabilir. Bu sonuçlar, buğday yapraklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğindeki izlenen düşüşle uyumludur. Li ve ark. (2011)'nin salatalık yapraklarında PEG stres uygulamasına kıyasla 5-aminolevulinik asidin, GSH ve AsA içeriklerini indüklediğini belirten çalışmalarıyla sonuçlarımız örtüşmektedir.

#### **4.4. Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler**

4 ve 8 mM B stresi altındaki buğday yapraklarında DHA içeriğinde göze çarpan düşüş kontrole göre sırasıyla 1.4 ve 1.2 kat olmuştur (Şekil 4.9C). 8B+75 µM FA uygulaması haricinde diğer tüm FA uygulamalarında DHA içeriği artış göstermiştir. Tüm deneme süresince en yüksek DHA içeriğine 25 µM FA uygulamalarında

rastlanmıştır. Sadece FA uygulanan bitkilerde DHA içerikleri (25 ve 75  $\mu\text{M}$ ), kontrol grubuna göre sırasıyla % 18 ve % 10 oranında artmıştır.

Bor stresi, sırasıyla tAsA akümüleyonunu kontrole göre sırasıyla % 36 ve % 23 oranında düşüğe neden olmuştur (Şekil 4.9D). Her iki bor konsantrasyonundaki fidelere 25  $\mu\text{M}$  FA uygulanması buğday yapraklarının tAsA içeriğini önemli oranda indüklemiştir. Stres yokluğunda yapılan FA uygulaması, tAsA içeriğinde bir artışa neden olmamıştır.

GSH içeriği, stres koşulları altında azalmış veya değişmemiştir (Şekil 4.9E). Bununla birlikte, tek başına FA uygulamasından farklı olarak, stres koşulları altında FA uygulaması GSH içeriğinde belirgin bir artışa neden olmuştur.

Şekil 4.9F’de görüldüğü üzere B stresi altındaki buğday fidelerinde tüm deneme süresince GSSG seviyelerinde hiçbir değişikliğin olmadığı görülmektedir. Öte yandan, bor stresli veya stressiz buğday fidelerine FA uygulamaları GSSG içeriğinde belirgin bir artışa neden olmuştur.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bu çalışma buğday yapraklarında bor indüklü strese karşı dışarıdan ferulik asit (FA) uygulamalarının borun zararlı etkilerini azaltıcı özelliklerinin olup olmadığını araştırmak için gerçekleştirilmiştir. Hidroponik olarak yetiştirilen buğday fidelerine 2 ve 4 mM konsantrasyonlarında bor uygulamaları yalnız veya 25 ve 75  $\mu\text{M}$  FA kombinasyonlarıyla birlikte 1 hafta süresince ilave edilmiştir. Stres büyüme, su içeriğini (RWC), yaprak su potansiyelini ( $\Psi_{\text{II}}$ ) azaltmış ve bu azalma oranı 8 mM konsantrasyonlarındaki bor uygulamalarında daha şiddetli olmuştur. B stresi buğday yapraklarında RWC,  $\Psi_{\text{II}}$  ve Pro içeriğini azaltmıştır. Bununla birlikte, FA uygulaması bu parametreler üzerindeki inhibisyonu önlemiştir. Stres koşullarında SOD enziminin aktivasyonu sadece 8 mM B'da gözlemlenmiştir. Deney süresince buğday yapraklarında  $\text{O}_2^{\cdot-}$  içeriği tetiklenmiştir. B stresine maruz kalan buğdayda CAT, POX APX ve GR aktiviteleri değişmemiştir. Bu nedenle  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriğinin yüksek birikimi meydana gelmiştir. Stres altındaki buğday fidelerine FA uygulamasıyla SOD aktivitesinin artması  $\text{O}_2^{\cdot-}$  içeriğini başarıyla azaltmıştır. Ayrıca, 4 mM B stresi altında eksojen olarak uygulanan FA, CAT ve POX aktivitelerini artırmıştır. B stresi APX, GR MDHAR ve DHAR aktiviteleriyle AsA ve DHA içeriklerinin akümülyasyonlarını tetiklememesine rağmen, buğdayda FA bu aktivite ve içerikleri artırmıştır. B stresi altındaki 25  $\mu\text{M}$  FA, indüklenen CAT aktivitesinin yanı sıra askorbat-glutasyon döngüsü dahil olmak üzere tAsA ve GSH'ın yenilenmesini ve indüklenmesini korumuştur. Bu nedenle antioksidan enzimlerin bu aktivasyonu sayesinde strese bağlı  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriği ve  $\text{OH}^{\cdot}$ 'ın süpürülme aktivitesi FA uygulamasında buğdayda önemli ölçüde azalmıştır. FA radikalleri süpürme aktivitesi nedeniyle stresin neden olduğu lipit peroksidasyonunu (TBARS içeriğiyle azalmış) önlemiştir. Bu çalışma ile hidroponik olarak gelişen buğday yapraklarında bor indüklü oksidatif hasarın azaltılmasında ferulik asit uygulamalarının etkileşimi ile ilgili yeni görüşler sağlanabilir.

## 5.2. Öneriler

Dünyada ve ülkemizde bor gibi mikro besin elementlerinin fazlalığının oluşturduğu stres koşulları bitkilerde gelişimi ve verimliliği kısıtlayan önemli etmenler arasındadır. Günümüzde giderek artan insan nüfusu tarım alanlarından daha fazla üretim için faydalanma ihtiyacı doğurmaktadır. Zirai alanlardan daha fazla verim almak için kullanılan inorganik gübreler toprakların çoraklaşmasına yol açmaktadır. Anadolu'nun bazı kesimleri bor yönünden oldukça zengin olup bu alanlarda zirai bitkilerin yetiştirilmesi hususunda büyük sorun teşkil etmektedir. Bu gibi alanlardan daha fazla faydalanmanın yolu, stres koşullarına dayanıklı bireylerin seçilmesi veya ıslahıdır. Bunun için de bitkilerin strese tolerans mekanizmalarının bilinmesi gereklidir. Stres koşullarında bütün bitkilerde oksidatif zararlar meydana gelmekte ve stres koşullarına dayanmak veya stresten kaçmak için bitki türlerinin ve çeşitlerinin geliştirmiş oldukları mekanizmalar, birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Bu nedenle kimi bitkiler stres koşullarından daha şiddetli etkilenirken kimileri de direnç göstermektedir. Bu tolerans mekanizmalarının anlaşılması stres koşullarına daha dayanıklı bitkiler yetiştirmemizde bize yardımcı olacaktır.

Çalışmamız için seçmiş olduğumuz buğday en fazla tarımı yapılan bitkiler arasında en ön sıralarda yer almaktadır. Ferulik asit uygulamalarının bor stresinin etkilerini azaltmada önemi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri açıkça ortaya konulmuştur. Ayrıca elde ettiğimiz bulgularla bor koşullarına dayanıklılıkla ferulik asit uygulamaları arasındaki ilişki belirlenerek biyoteknolojik çalışmalara da öncülük edecektir.

Çalışmalarımızdan üretilecek bilimsel veriler, başta uluslararası saygın dergilerde yayınlanmak kaydı ile bilimsel makale haline getirilmiştir ve tüm insanlığın hizmetine sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Allakhverdiev, S. I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y. ve Murata, N., 2000, Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*. contribution of water channels, *Plant Physiology*, 122 (4), 1201-1208.
- Aller, A. J., Bernal, J. L., Nozal, M. J. D. ve Deban, L., 1990, Effects of selected trace elements on plant growth, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51 (4), 447-479.
- Ardic, M., Sekmen, A., Turkan, I., Tokur, S. ve Ozdemir, F., 2009, The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, *Plant and Soil*, 314 (1-2), 99-108.
- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Review of Plant Biology*, 50 (1), 601-639.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99 (1), 191-203.
- Bast, A., Haenen, G. R. ve Doelman, C. J., 1991, Oxidants and antioxidants: state of the art, *The American Journal of Medicine*, 91 (3), 2-13.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. ve Teare, I., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39 (1), 205-207.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276-287.
- Bergmann, W., 1992, Nutritional disorders of plants: visual and analytical diagnosis (English, French, Spanish).
- Bergmeyer, H., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd. 1, S. 439–440, Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie.
- Betteridge, D. J., 2000, What is oxidative stress?, *Metabolism*, 49 (2), 3-8.
- Blevins, D. G. ve Lukaszewski, K. M., 1994, Proposed physiologic functions of boron in plants pertinent to animal and human metabolism, *Environmental Health Perspectives*, 102 (suppl 7), 31-33.
- Blevins, D. G. ve Lukaszewski, K. M., 1998, Boron in plant structure and function, *Annual Review of Plant Biology*, 49 (1), 481-500.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J. ve Krause, K.-H., 2012, Reactive oxygen species: from health to disease, *Swiss Medical Weekly*, 142, w13659.
- Brown, P., Bellaloui, N., Wimmer, M., Bassil, E., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. ve Römheld, V., 2002, Boron in plant biology, *Plant Biology*, 4 (2), 205-223.
- Camacho-Cristóbal, J. J. ve González-Fontes, A., 2007, Boron deficiency decreases plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots, *Planta*, 226 (2), 443-451.
- Cartwright, B., Zarcinas, B. ve Mayfield, A., 1984, Toxic concentrations of boron in a red-brown earth at Gladstone, South Australia, *Soil Research*, 22 (3), 261-272.
- Cheeseman, K. ve Slater, T., 1993, An introduction to free radical biochemistry, *British Medical Bulletin*, 49 (3), 481-493.
- Clifford, M. N., 1999, Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (3), 362-372.

- Dannel, F., Pfeffer, H. ve Römheld, V., 2000, Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$ , *Functional Plant Biology*, 27 (5), 397-405.
- Desikan, R., Cheung, M. K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. T. ve Neill, S. J., 2004, ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells, *Journal of Experimental Botany*, 55 (395), 205-212.
- Diplock, A., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W. ve Vina-Ribes, J., 1998, Functional food science and defence against reactive oxidative species, *British Journal of Nutrition*, 80 (S1), 77-112.
- Dordas, C. ve Brown, P. H., 2000, Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it, *Journal of Membrane Biology*, 175 (2), 95-105.
- El-Soud, W. A., Hegab, M. M., AbdElgawad, H., Zinta, G. ve Asard, H., 2013, Ability of ellagic acid to alleviate osmotic stress on chickpea seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 173-183.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. ve Alpaslan, M., 2007, Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants, *Journal of Plant Nutrition*, 30 (6), 981-994.
- Eraydın, E., 2000, Topraklarda bor adsorpsiyonu üzerine bazı anyonların etkisi, *Yüksek Lisans Tezi, AÜ, Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- Fantel, A. G., 1996, Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis, *Teratology*, 53 (3), 196-217.
- Farag, M., Najeeb, U., Yang, J., Hu, Z. ve Fang, Z. M., 2017, Nitric oxide protects carbon assimilation process of watermelon from boron-induced oxidative injury, *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 166-173.
- Fazary, A. E. ve Ju, Y. H., 2007, Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (11), 811-828.
- Fleischer, A., O'Neill, M. A. ve Ehwald, R., 1999, The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II, *Plant Physiology*, 121 (3), 829-838.
- Fossati, D. ve Ingold, M., 2001, Mountain wheat pool, *The World Wheat Book, A History of Wheat Breeding*, 311-332.
- Foyer, C. H. ve Halliwell, B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133 (1), 21-25.
- Fridovich, I., 1983, Superoxide radical: an endogenous toxicant, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23 (1), 239-257.
- Fridovich, I., 1997, Superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (30), 18515-18517.
- Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmanakaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N. ve Yorgancilar, M., 2002, Boron content of cultivated soils in central-southern Anatolia and its relationship with soil properties and irrigation water quality, In: *Boron in Plant and Animal Nutrition*, Eds: Springer, p. 391-400.
- Ghanati, F., Morita, A. ve Yokota, H., 2002, Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells, *Soil Science and Plant Nutrition*, 48 (3), 357-364.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930.

- Goldbach, H. E. ve Wimmer, M. A., 2007, Boron in plants and animals: is there a role beyond cell *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170 (1), 39-48.
- Goldberg, S., 1997, Reactions of boron with soils, *Plant and Soil*, 193 (1-2), 35-48.
- Gorman, A. ve Rodgers, M., 1981, Singlet molecular oxygen, *Chemical Society Reviews*, 10 (2), 205-231.
- Graf, E., 1992, Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 13 (4), 435-448.
- Graham, R. D. ve Welch, R. M., 1996, Breeding for staple food crops with high micronutrient density, Intl Food Policy Res Inst, p.
- Gupta, U. C., Jame, Y., Campbell, C., Leyshon, A. ve Nicholaichuk, W., 1985, Boron toxicity and deficiency: a review, *Canadian Journal of Soil Science*, 65 (3), 381-409.
- Hamurcu, M., Sekmen, A. H., Turkan, I., Gezgin, S., Demiral, T. ve Bell, R. W., 2013, Induced anti-oxidant activity in soybean alleviates oxidative stress under moderate boron toxicity, *Plant Growth Regulation*, 70 (3), 217-226.
- Han, S., Tang, N., Jiang, H.-X., Yang, L.-T., Li, Y. ve Chen, L.-S., 2009, CO<sub>2</sub> assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress, *Plant Science*, 176 (1), 143-153.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. ve Ferreira, I. C., 2015, Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review, *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Herzog, V., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Anal Biochem*, 55, 554-562.
- Heun, M., Schäfer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B. ve Salamini, F., 1997, Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting, *Science*, 278 (5341), 1312-1314.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. ve Verma, D. P. S., 2000, Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress, *Plant Physiology*, 122 (4), 1129-1136.
- Hossain, M. A., Nakano, Y. ve Asada, K., 1984, Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant and Cell Physiology*, 25 (3), 385-395.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S.-M., Qian, P., Xin, W., Li, H.-Y., Burritt, D. J., Fujita, M. ve Tran, L.-S. P., 2015, Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging, *Frontiers in Plant Science*, 6, 420.
- Huang, C. ve Graham, R. D., 1990, Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at the cellular level, *Plant and Soil*, 126 (2), 295-300.
- Huang, D.-J., Chen, H.-J. ve Lin, Y.-H., 2005, Isolation and expression of protein disulfide isomerase cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage roots, *Plant Science*, 169 (4), 776-784.
- Ishii, T., Matsunaga, T. ve Hayashi, N., 2001, Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue, *Plant Physiology*, 126 (4), 1698-1705.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2002, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215 (6), 1022-1030.

- Joseph, B. ve Jini, D., 2010, Insight into the role of antioxidant enzymes for salt tolerance in plants, *International Journal of Botany*, 6 (4), 456-464.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. ve Taniguchi, H., 2002, Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7), 2161-2168.
- Kim, J. W. ve Minamikawa, T., 1997, Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (1), 118-123.
- Kobayashi, M., Matoh, T. ve Azuma, J., 1996, Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls, *Plant Physiology*, 110 (3), 1017-1020.
- Kocyigit, A., Armutcu, F., Gurel, A. ve Ermis, B., 2004, Alterations in plasma essential trace elements selenium, manganese, zinc, copper, and iron concentrations and the possible role of these elements on oxidative status in patients with childhood asthma, *Biological Trace Element Research*, 97 (1), 31-41.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259), 680.
- Lee, B.-R., Kim, K.-Y., Jung, W.-J., Avicé, J.-C., Ourry, A. ve Kim, T.-H., 2007, Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.), *Journal of Experimental Botany*, 58 (6), 1271-1279.
- Lemarchand, D., Gaillardet, J., Lewin, E. ve Allegre, C., 2000, The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH, *Nature*, 408 (6815), 951.
- Lewis, D., 1980, Are there inter-relations between the metabolic role of boron synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen?, *New Phytologist*, 84 (2), 261-270.
- Li, D.-M., Nie, Y.-X., Zhang, J., Yin, J.-S., Li, Q., Wang, X.-J. ve Bai, J.-G., 2013a, Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings, *Biologia Plantarum*, 57 (4), 711-717.
- Li, J.-T., Qiu, Z.-B., Zhang, X.-W. ve Wang, L.-S., 2011, Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (3), 835-842.
- Li, J., Besseau, S., Törönen, P., Sipari, N., Kollist, H., Holm, L. ve Palva, E. T., 2013b, Defense - related transcription factors WRKY 70 and WRKY 54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, 200 (2), 457-472.
- Li, Z.-G., Ding, X.-J. ve Du, P.-F., 2013c, Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline, *Journal of Plant Physiology*, 170 (8), 741-747.
- Lichtenthaler, H. K., 1996, Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants, *Journal of Plant Physiology*, 148 (1-2), 4-14.
- Lindsay, S. E. ve Fry, S. C., 2008, Control of diferulate formation in dicotyledonous and gramineous cell-suspension cultures, *Planta*, 227 (2), 439-452.
- Liu, L. L., He, J. H., Xie, H. B., Yang, Y. S., Li, J. C. ve Zou, Y., 2014, Resveratrol induces antioxidant and heat shock protein mRNA expression in response to heat stress in black-boned chickens, *Poultry Science*, 93 (1), 54-62.
- Liu, Z.-J., Guo, Y.-K. ve Bai, J.-G., 2010, Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two

- cucumber ecotypes under osmotic stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 29 (2), 171-183.
- Liu, Z., Wang, L., Wang, C. Y., Sun, S. J., Qin, L., An, Y., Xing, Y. S. ve Sun, H. W., 2017, Effect of corrosion inhibitor benzotriazole on the uptake and translocation of Cd in rice (*Oryza sativa* L.) under different exposure conditions, *Chemosphere*, 186, 24-30.
- Loomis, W. D. ve Durst, R., 1992, Chemistry and biology of boron, *BioFactors (Oxford, England)*, 3 (4), 229-239.
- Lovatt, C. J., 1985, Evolution of xylem resulted in a requirement for boron in the apical meristems of vascular plants, *New Phytologist*, 99 (4), 509-522.
- Lushchak, V. I., 2014, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico- Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Luster, D. G. ve Donaldson, R. P., 1987, Orientation of electron-transport activities in the membrane of intact glyoxysomes isolated from castor bean endosperm, *Plant Physiology*, 85 (3), 796-800.
- Mahajan, S. ve Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 139-158.
- Mahboobi, H., Yucel, M. ve Avni Öktem, H., 2000, Changes in total protein profiles of barley cultivars in response to toxic boron concentration, *Journal of Plant Nutrition*, 23 (3), 391-399.
- Marcia, M. D. O., 2009, Feruloylation in grasses: current and future perspectives, *Molecular Plant*, 2 (5), 861-872.
- Marschner, H., 1995, Boron, *Mineral nutrition of Higher Plants*, 379-396.
- Matoh, T., 1997, Boron in plant cell walls, *Plant and Soil*, 193 (1-2), 59-70.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B. A., 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.
- Murphy, M. P., 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochemical Journal*, 417 (1), 1-13.
- Nable, R. O., Lance, R. C. ve Cartwright, B., 1990, Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity, *Annals of Botany*, 66 (1), 83-90.
- Nable, R. O., Bañuelos, G. S. ve Paull, J. G., 1997, Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193 (1-2), 181-198.
- Nakagawa, Y., Hanaoka, H., Kobayashi, M., Miyoshi, K., Miwa, K. ve Fujiwara, T., 2007, Cell-type specificity of the expression of Os BOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading, *The Plant Cell*, 19 (8), 2624-2635.
- Nakano, Y. ve Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.
- Nesbitt, M. ve Samuel, D., 1998, Wheat domestication: archaeobotanical evidence, *Science*, 279 (5356), 1431-1431.
- Noguchi, K., Ishii, T., Matsunaga, T., Kakegawa, K., Hayashi, H. ve Fujiwara, T., 2003, Biochemical properties of the cell wall in the *Arabidopsis* mutant bor1 - 1 in relation to boron nutrition, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166 (2), 175-178.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P. ve Darvill, A. G., 2004, Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide, *Annu Rev Plant Biol*, 55, 109-139.

- Paradiso, A., Berardino, R., de Pinto, M., di Toppi, L., Storelli, M., Tommasi, F. ve De Gara, L., 2008, Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat [*Triticum durum*] plants, *Plant and Cell Physiology (Japan)*.
- Paull, J., Rathjen, A., Cartwright, B. ve Nable, R., 1990, Selection parameters for assessing the tolerance of wheat to high concentrations of boron, In: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, Eds: Springer, p. 361-369.
- Pervaiz, S., 2001, Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents, *The FASEB Journal*, 15 (3), 612-617.
- Pfeffer, H., Dannel, F. ve Römheld, V., 1999, Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower?, *Journal of Plant Physiology*, 155 (1), 34-40.
- Pitzschke, A., Forzani, C. ve Hirt, H., 2006, Reactive oxygen species signaling in plants, *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (9-10), 1757-1764.
- Power, P. P. ve Woods, W. G., 1997, The chemistry of boron and its speciation in plants, *Plant and Soil*, 193 (1-2), 1-13.
- Reid, R., 2007, Update on boron toxicity and tolerance in plants, *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, 83-90.
- Reid, R. J., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. C. R. ve Graham, R. D., 2004, A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant, Cell & Environment*, 27 (11), 1405-1414.
- Rerkasem, B. ve Jamjod, S., 2004, Boron deficiency in wheat: a review, *Field Crops Research*, 89 (2-3), 173-186.
- Rhee, S. G., 1999, Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger, *Experimental & Molecular Medicine*, 31 (2), 53.
- Robertson, G. ve Loughman, B., 1974, Response to boron deficiency: a comparison with responses produced by chemical methods of retarding root elongation, *New Phytologist*, 73 (5), 821-832.
- Roessner, U., Patterson, J. H., Forbes, M. G., Fincher, G. B., Langridge, P. ve Bacic, A., 2006, An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics, *Plant Physiology*, 142 (3), 1087-1101.
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W.-D. ve McCann, M. C., 2003, Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes, *Plant Physiology*, 132 (2), 1033-1040.
- Sagi, M. ve Fluhr, R., 2001, Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection, *Plant Physiology*, 126 (3), 1281-1290.
- Santa-Cruz, A., Martinez-Rodriguez, M. M., Perez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R. ve Bolarin, M. C., 2002, The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype, *Plant Science*, 162 (5), 825-831.
- Schönhof, I., Klaring, H. P., Krumbein, A., Claussen, W. ve Schreiner, M., 2007, Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli, *Agriculture Ecosystems & Environment*, 119 (1-2), 103-111.
- Seevers, P., Daly, J. ve Cathedral, F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiology*, 48 (3), 353-360.
- Shah, A. H., Shah, S. H., Ahmad, H., Durrani, I. S. ve Shah, S. H., 2017, Cross adaptation; an alternate approach of genetic engineering for salinity tolerance in rice cell line, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 39-48.
- Shewry, P. R., 2009, Wheat, *Journal of Experimental Botany*, 60 (6), 1537-1553.

- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., He, Y., Qian, Q. ve Yu, J., 2005, Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, *Phytochemistry*, 66 (13), 1551-1559.
- Shireen, F., Nawaz, M., Chen, C., Zhang, Q., Zheng, Z., Sohail, H., Sun, J., Cao, H., Huang, Y. ve Bie, Z., 2018, Boron: functions and approaches to enhance its availability in plants for sustainable agriculture, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (7), 1856.
- Shorrocks, V. M., 1997, The occurrence and correction of boron deficiency, *Plant and Soil*, 193 (1-2), 121-148.
- Silici, S., Özkan, M., Kara, K. ve Güçlü, B., 2013, Japon bıldırcını (*Coturnix Coturnix Japonica*) yemlerine propolis, kafeik asit ve ferulik asit ilavesinin performans, karkas kalitesi ve bazı biyokimyasal parametrelere etkileri, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10 (3).
- Simón, I., Díaz - López, L., Gimeno, V., Nieves, M., Pereira, W. E., Martínez, V., Lidon, V. ve García - Sánchez, F., 2013, Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176 (2), 165-174.
- Smart, R. E. ve Bingham, G. E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53 (2), 258-260.
- Soylu, S., Topal, A., Sade, B., Akgün, N., Gezgin, S. ve Babaoglu, M., 2004, Yield and yield attributes of durum wheat genotypes as affected by boron application in boron-deficient calcareous soils: an evaluation of major Turkish genotypes for boron efficiency, *Journal of Plant Nutrition*, 27 (6), 1077-1106.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R. ve Menon, V. P., 2007, Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40 (2), 92-100.
- Stadtman, E. R. ve Berlett, B. S., 1997, Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease, *Chemical Research in Toxicology*, 10 (5), 485-494.
- Taban, S. ve Erdal, İ., 2000, Bor uygulamasının değişik buğday çeşitlerinde gelişme ve toprak üstü aksamda bor dağılımı üzerine etkisi, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24, 255-262.
- Tanaka, M. ve Fujiwara, T., 2008, Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants, *Pflügers Archive-European Journal of Physiology*, 456 (4), 671-677.
- Torun, A., Yılmaz, A., Kalaycı, M., Gültekin, İ., Torun, B., Eker, S. ve Çakmak, İ., 1999, Konya koşullarında yetiştirilen farklı buğday çeşitlerinin bor toksitesine duyarlılığının sera ve tarla koşullarında araştırılması, *Hububat Sempozyumu, Altıncı oturum: Hububat Yetiştirme*, 317-327.
- Unakıtan, G. ve Aydın, B., 2018, A comparison of energy use efficiency and economic analysis of wheat and sunflower production in Turkey: A case study in Thrace Region, *Energy*, 149, 279-285.
- Velioğlu, S., Saylı, B. S. ve Altunsoy, S., 1999, Bor madeni havzalarında üretilen bazı gıdalarda bor miktarlarının belirlenmesi üzerine bir araştırma, *GIDA*, 24 (1).
- Warington, K., 1923, The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants, *Annals of Botany*, 37 (148), 629-672.
- Winterbourn, C. C., 1995, Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction, *Toxicology Letters*, 82, 969-974.
- Xu, J., Liu, Y., Cui, S. ve Miao, X., 2006, Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision, *Aquacultural Engineering*, 35 (3), 207-217.

Yan, X., Li, W., Goto, T. ve Chen, M., 2006, Raman spectroscopy of pressure-induced amorphous boron carbide, *Applied Physics Letters*, 88 (13), 131905.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Hüseyin KARAHAN  
**Uyruğu** : TC  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : İZMİR/ 30.01.1990  
**Telefon** : 05392876891  
**Faks** :  
**e-mail** : biologisthuseyin@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Selçuklu Atatürk Lisesi Selçuklu/ KONYA	2008
Üniversite	: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi/ KARAMAN	2014
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi Selçuklu/ KONYA	2019

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2017-2019	Engin Tıbbi Ürünler ve Lab. Mlz.	Biyolog/ GENETİK
2019-	Genoks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi	Biyolog/ GENETİK

### UZMANLIK ALANI

Bitki Biyoteknolojisi, Genetik

### YABANCI DİLLER

İngilizce

### YAYINLAR

Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C., Karahan, H., Kucukoduk, M., & Turkan, I. (2019). Ferulic acid confers tolerance against excess boron by regulating ROS levels and inducing antioxidant system in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Environmental and Experimental Botany*, 161, 193-202.