

Kuraklık Stresine Karşı Borun Antioksidant Enzimlere Etkisi

Mahmut DOĞAN, Aslıhan AVU

Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa

Eser Bilgisi:

Araştırma makalesi

Sorumlu yazar: Mahmut DOĞAN, e-mail: dogan@harran.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada materyal olarak soya (*Glycine max. L.*, cv., "A3935") tohumları farklı bor bileşiklerinden oluşan, kontrollü koşullarda (25±2 °C) yetiştirilmiştir. Araştırmada kontrol grubuna herhangi bir bor uygulaması yapılmamıştır. Diğer uygulamalar sırasıyla; potasyum tetraborat tetrahidrattan 0.1 mg/l, amonyum tetraborat tetrahidrattan 1 mg/l, sodyum bor hidrürden 1 mg/l, lityum tetraborat tetrahidrattan 100 mg/l, sodyum tetraborat dekahidrattan 100 mg/l olmak üzere belirlenen uygun doz kullanılmıştır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmıştır. Soya fideleri zamana bağlı olarak farklı kuraklık (kontrol, 3, 6, 9, 12, 15 ve 18 gün) uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Yapraklarda katalaz (CAT; EC= 1.11.1.6), glutatyon redüktaz (GR; EC= 1.6.4.2), askorbat peroksidaz (APX; EC= 1.11.1.11) ve süperoksit dismutaz (SOD; EC= 1.15.1.1) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Analiz sonuçlarına göre Stres+potasyum tetraborat tetrahidrat ortamında CAT miktarı artmış, GR, APX ve SOD miktarı azalmıştır. Potasyum tetraboratın 0.1 mg/l doz uygulamasının en uygun eşik değeri olduğu ve kuraklığa karşı en önemli gösterge olan CAT enziminde en iyi sonucu verdiği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kuraklık stresi, soya, bor, antioksidant enzimler

Against Drought Stress Effect of Antioxidant Enzymes of Boron

Article Info:

Research article

Corresponding author: Mahmut DOĞAN, e-mail: dogan@harran.edu.tr

ABSTRACT

In this study, soybean seeds (*Glycine max. L.*, cv., "A3935") were grown under controlled conditions (25±2 °C) composed of different boron compounds. In the experiment, 5 groups were determined respectively as potassium tetraborate tetrahydrate (1 mg/l), ammonium tetraborate tetrahydrate (1 mg/l), sodium boron hydride (1 mg/l), lithium tetraborate tetrahydrate (100 mg/l), and sodium tetraborate decahydrate (100 mg/l). The doses used in this study were determined according to the results of a preliminary study. Soybean seeds were exposed to different amounts of drought stress based on time (control, 3, 6, 9, 12, 15, and 18 days). Activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD: EC 1.15.1.1), glutathione reductase (GR: EC 1.6.4.2), ascorbate peroxidase (APX: EC 1.11.1.11) and catalase (CAT: EC 1.11.1.6) measured. According to the results stress+potassium tetraborate tetrahydrate environment has increased the amount of CAT, decreased the amount GR, APX and SOD. Potassium tetraborate 0.1 mg / l dose administration is the most appropriate critical value, and the most important indicator of drought CAT enzyme found to give the best results.

Keywords: Drought stress, soybean, boron, antioxidative enzymes

GİRİŞ

Son yıllarda çevresel bir sorun olan küresel ısınmanın etkisiyle birlikte, tarımsal kuraklık ile suyun önemi hissedilmeye başlanmıştır. Suyun bütün canlılar için vazgeçilmez bir ihtiyaç olması, onu daha önemli hale getirmektedir (Khanna-Chopra ve Selote 2007). Kuraklık; iklim değişikliğine, bitki su tüketim değerlerinin değişmesine ve bitkisel üretimin azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle insanların beslenmesinde gerekli olan gıdaların temin edilmesinde sorunların yaşanılması kaçınılmazdır (Ashraf ve Iram 2005, Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005, Daşgan ve ark 2009b). Bitki büyümesini engelleyen her faktör stres olarak tanımlanmaktadır. Dünyanın birçok yerinde kuraklık, tuzluluk, aşırı sulama, yüksek ve düşük sıcaklık, pH ve ağır metallerin neden olduğu stresler yaygındır (Ashraf ve Ali 2007). Bu stresler özellikle gelişmekte olan ülkeler için sosyal ve ekonomik problemlere temel oluşturmaktadır. Dünya üzerinde tarımda kullanılabilir alanların sadece % 10' u herhangi bir çevresel stres etmeni ile karşı karşıya değildir. Geriye kalan % 90'lık kısmın, % 26'sı kuraklık stresi % 20'lik bir kısmı tuz stresidir (Lichtenhaler 1996).

Dünya nüfusunun hızlı artışıyla ortaya çıkan beslenme sorununa çözümler bulmak için yapılan araştırmalar, daha çok olumsuz çevre koşullarında tarımı yapılabilecek bitki türlerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Dünyada olduğu gibi, ülkemizde de tarım alanlarının sınırlı olması, üretimin artırılması amacıyla birim alandan daha fazla ürün almayı zorlamaktadır. Bunun için toleranslı bitki çeşitlerinin belirlenmesi ve ıslah edilmesi gerekmektedir. Araştırmacılar kuraklık ve tuzluluk stresi ile bitki arasındaki ilişkilerin farklı açılardan araştırılmasına büyük önem vermişlerdir (Ashraf ve Foolad 2007).

Oksidatif stres bitkilerin günlük olarak karşılaştıkları fizyolojik durumlardan birisidir. Aerobik canlılarda oksijen metabolizmada toksik etki gösteren bazı ara moleküllerin oluşumuna sebep olur. Oksijen radikalleri adı verilen bu ara moleküllerin neden olduğu zararların toplamı oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Dalal ve Khanna-Chopra 2001). Oksijen radikallerini zararsız hale getiren antioksidant enzimler oksidatif strese karşı canlıların gösterdiği en etkili savaş tipi olarak belirlenmiştir (Munne-Bosch ve Penuelas 2003). Antioksidant enzim aktivitesi çevre faktörlerine, stres tipine ve organizmanın yaşı gibi faktörlere bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Doğan ve ark 2010a). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolikler, karotenoidler ve vitaminler gibi antioksidanlar reaktif oksijen oluşumunu engelleyebilir veya oluşan aktif oksijen türlerini temizleyebilmektedir (Lahet ve ark 2003; Meloni ve ark 2003; Doğan ve ark 2010b).

Bor'un tarımda kullanımı ile ilgili bilgiler 8 nci yüzyıla kadar dayanmaktadır, ancak insanoğlu bilmeden bitkiler için büyük öneme sahip olan Bor'u tarımın alanlarında sürekli kullanmışlardır (Warrington 1923; Atalay ve ark 2003). Bor'un bitkilerdeki önemi bitkilerin iç beslenme koşullarının oluşturulmasında ortaya çıkmaktadır. Çok az miktardaki bor çiçeklenmenin kontrolünde, polen üretiminde, tohum ve meyve gelişiminde, yakıt pompası işlevinde, köklere şeker taşımada rol oynamaktadır (Akçam ve ark 2004). Bor doğal olarak toprakta bulunmasına rağmen bazı bölgelerdeki yoğun yağışlar, coğrafik koşullar ve tarım yöntemlerindeki farklı uygulamalar nedeniyle bitkilerin ihtiyacı olan fonksiyonları yerine getiremeyecek oranlara düşmüş olabilir (Bishnoi ve ark 2005). Böyle alanlarda Bor'lu gübrelerin kullanılması bitkilerin yetişmesinde

önemli katkı sağlamaktadır (Akçam ve ark 2006). Kullanılacak bor miktarı hektar başına 0.2 ila 4 kg arasında değişmektedir. Pamuk, mısır, soya fasulyesi gibi bazı bitkiler daha yüksek oranda Bor'a ihtiyaç duymaktadır (Choi ve ark 2007). Bu çalışmada ülkemiz tarımı ve ekonomisinde önemli yeri olan soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) bitkisine kuraklık stresiyle beraber farklı bor bileşiklerinin enzim aktiviteleri üzerindeki muhtemel rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırma materyali olarak soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) tohumları, farklı bor bileşiklerinden oluşan, potasyum tetraborat tetrahidrat ($K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$), amonyum tetraborat tetrahidrat ($(NH_4)_2 \cdot B_4O_7 \cdot 4H_2O$), sodyum bor hidrür ($NaBH_4$), lityum tetraborat tetrahidrat ($Li_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$), sodyum tetraborat dekahidrat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) içeren bileşikler kullanılmıştır. Çalışmada kontrol grubuna herhangi bir bor uygulaması yapılmamıştır. Diğer gruplara sırasıyla; potasyum tetraborat tetrahidrattan 0.1 mg/l, amonyum tetraborat tetrahidrattan 1 mg/l, sodyum bor hidrürden 1 mg/l, Lityum tetraborat tetrahidrattan 100 mg/l, sodyum tetraborat dekahidrattan 100 mg/l olmak üzere belirlenen uygun dozlar tesadüf parselleri deneme desenine göre kullanılmıştır. Seçim çalışmalarında önceden belirlenen en uygun eşik değerleri tespit edilip esas denemede kullanılmaya karar verilmiştir (Doğan, 2012). Soya fideleri kontrol grubu, kuraklık stresi uygulanan grup, kuraklık stresi+borun farklı bileşiklerinin uygulandığı toplam 7 grupta kontrollü koşullarda yetiştirilmiştir.

Çimlenme ve büyüme evresini kapsayan tüm denemeler iklim odasında 25 ± 2 °C sıcaklık ve % 65 ± 5 'e ayarlanmış bağıl nem deney süresince sabit tutulmuştur. Işık

şiddeti bitki yaprak yüzeyinden 13500 lüks ışık yoğunluğu olacak şekilde ayarlanmıştır. Sağlam ve benzer büyüklükte yeteri kadar seçilen tohumların yüzeysel sterilizasyonu Ellis ve ark (1988)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Çimlenmiş tohumları tespit etmek için inkübe edildiği günü izleyen 5. günde sayım yapılarak, çimlenme için radikulanın testadan çıkmış olması esas kabul edilmiştir. Çimlenen tohumlar perlit ortamında saksılara alınarak, ilk gerçek yapraklar çıkmaya başlayıncaya kadar (Hoagland ve Arnon 1938) kültür çözeltilisiyle büyütülmüşlerdir.

Son aşamada kontrol grubuna ve kuraklık stresi grubuna sadece hoagland besin çözeltilisi, kuraklık stresi + bor grubuna hoagland besin çözeltilisiyle beraber borun farklı bileşikleri uygulanmıştır. Deneme; çimlenme aşaması 6 gün, ilk gerçek yaprakların oluşum aşaması 14 gün, kültür çözeltilisiyle beraber bor uygulanmış olan aşama 11 gün olmak üzere toplam 31 günü bulmuştur. Bu aşamadan sonra tüm ortamlara kuraklık stresi uygulanmıştır. Stres aşamasının 6. gününden itibaren üçer gün arayla hasat yapılmıştır. Kontrol grubundan, kuraklık stresi ve kuraklık artı bor uygulanmış ortamlarda yetişen bitkilerden 5 defa örnek alınmıştır. Böylece 6 gün, 9 gün, 12 gün, 15 gün ve 18 gün kuraklık stresi ile kuraklık artı bor stresi uygulanmış ortamlardan alınan örnekler analizlere hazırlanmıştır.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve ekstraktların hazırlanması

Kontrol ve kuraklık ile kuraklık artı bor uygulanmış bitkilerin 2. yapraklarından ekstraktlar hazırlanmıştır. Buna göre yaklaşık, 0.5 gr taze yaprak örneği sıvı azotla beraber porselen havan içinde ezilmiştir. Daha sonra içinde 0.1 mM Na-EDTA bulunan 50 mM'lık (pH 7.6) fosfat (P) tampon çözeltilisi ile (10 ml)

homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 15 dk süre ile 15000 g ve +4 °C de santrifüj edildikten sonra, elde edilen süpernatantta enzim aktiviteleri yine Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak (1994)'in yöntemlerine göre belirlenmiştir.

CAT aktivitesi: Spektrofotometrede H₂O₂'nin 240 nm'de (E= 39.4 mM cm⁻¹) parçalanma oranı esas alınarak ölçülmüştür. Buna göre, son hacim 1 ml olan reaksiyon ortamını 0,1 mM EDTA içeren 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 100 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı oluşturmaktadır. Yukarıda hazırlanışı açıklanan ekstrakta 10'ar saniye ara ile 1 dakika süredeki H₂O₂ dekompozisyonu spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) okunmuş ve CAT enzim aktivitesi $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ T.A. olarak hesaplanmıştır.

GR enzim Aktivitesi: 340 nm'de (E= 6.2 mM cm⁻¹) NADPH' nın oksidasyonu esas alınarak ölçülmüştür. Buna göre, son hacim 1 ml olan reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfat tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 0.5 mM okside gulutasyon, 0.1 ml 0.12 mM NADPH ve enzim ekstraktı ilave edilerek NADPH oksidasyonu 340 nm'de 20 saniye ara ile 1 dakika süre ile okunmuş ve GR aktivitesi spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) okunmuş ve $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ T.A. olarak hesaplanmıştır.

APX aktivitesi: 290 nm'de (E= 2.8 mM cm⁻¹) askorbatın oksidasyon hızı ölçülerek saptanmıştır. Buna göre, son hacmi 1 ml olan reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfat tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 10 mM EDTA içeren 12 mM H₂O₂, 0.1 ml 0.25 mM L(+) askorbik asit ve enzim akstraktı ilave edilerek askorbat oksidasyonu 20 saniye ara ile 1 dakika süredeki askorbat oksidasyonu spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208)

okunmuş ve APX aktivitesi $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ T.A. olarak hesaplanmıştır.

SOD aktivitesi: Nitro blue tetrazolium kloridin (NBT) ışık altında O₂⁻ tarafından indirgenmesi yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntemine göre son hacim 5 ml olacak şekilde cam şişeler içinde oluşturulan reaksiyon ortamına önce 0.1 mM Na-EDTA içeren 50 mM'lık (pH 7.6) fosfat tamponundan konulduktan sonra üzerine sırasıyla enzim ekstraktı (25-100 μl), 0.5 ml 50 mM Na₂CO₃ (pH 10.2), 0.5 ml 12 mM L-methionine, 0.5 ml 75 μM p-NBT ve 0.5 ml 10 μM riboflavin eklenmiştir. NBT'in O₂⁻ tarafından indirgenmesi ise örneklerin 24 °C ve 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık intensitesi altında 10-15 dk tutulması ile sağlanmıştır. SOD aktivitesi spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) okunmuş ve U/g T.A. olarak hesaplanmıştır. Bir SOD aktivite ünitesi, (U) 560 nm'de ölçülen NBT'un indirgenme oranının % 50'sinin engellenmesi için gereken enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Araştırma 3 tekrarlı olarak düzenlenmiş, her bir tekrarda 20 adet tohum, tüm denemede ise 1200 adet tohum kullanılmıştır. Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde 3 tekrarlı varyans analizi bakımından faktörler incelenmiş uygulamalar arasındaki farklar anlamlı önemli fark (A.Ö.F.) çoklu karşılaştırma yöntemi ile incelenmiştir.

BULGULAR

Dünyada meydana gelen kuraklık problemiyle beraber bilim adamları kuraklık stresini ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için çalışmalar başlatmışlardır (Ashraf ve Iram 2005, Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005, Daşgan ve ark., 2009b). Ülkemizde bol miktarda bulunan bor bileşiklerinin kuraklık stresine karşı muhtemel etkilerini tespit

etmek amacıyla yapılan bu çalışmada enzimlerin bor bileşikleriyle olan ilişkisi araştırılarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

Yapılan analiz sonuçlarına göre CAT oranı kontrol grubunun 6. gününde 54 ± 0.1 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde 53 ± 0.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olurken, kuraklık stresi grubunun 6. gününde 156 ± 1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$

T.A. 18. gününde 160 ± 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olarak ölçülmüş, Stres+ Potasyum tetraborat tetrahidrat grubunda ise 255 ± 0.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde 265 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olduğu ölçülmüştür (Tablo 1). Değişik araştırmacılar tarafından kuraklık stresine bağlı olarak söz konusu CAT enzim miktarının arttığı rapor edilmiştir (EL-saht 1998; Kubo ve ark 1999; Oidaire ve ark 2000; Ahmadi ve ark 2010).

Tablo 1. Kuraklık stresine karşı bor uygulanan soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) fidelerinden elde edilen CAT ($\mu\text{mol}/\text{dak}/\text{mg}$ T.A) değerleri. (Değerler üç tekrarın ortalaması \pm standart hata olarak verilmiştir ($P < 0.05$)).

Uygulamalar/Gün	6 gün	9 gün	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	$54 \pm 0.1a$	$54 \pm 0.2a$	$52 \pm 0.3a$	$53 \pm 0.2a$	$53 \pm 0.2a$
Kuraklık Stresi	$156 \pm 1.2b$	$158 \pm 0.3b$	$155 \pm 0.2b$	$157 \pm 0.5b$	$160 \pm 0.3ab$
Stres+Pot. tet. thdr	$255 \pm 0.2c$	$255 \pm 0.4c$	$258 \pm 0.4c$	$260 \pm 0.4c$	$265 \pm 0.4c$
Stres+Amn. tet tihdr	$164 \pm 0.3ab$	$172 \pm 0.2ab$	$175 \pm 0.3ab$	$178 \pm 0.3ab$	$180 \pm 0.5ab$
Stres+Sod bor hdr	$155 \pm 0.5b$	$156 \pm 0.3b$	$161 \pm 0.2ab$	$162 \pm 0.4ab$	$166 \pm 0.6ab$
Stres+Lit tet. thdr.	$162 \pm 0.3ab$	$168 \pm 0.2ab$	$190 \pm 0.3ab$	$192 \pm 0.2ab$	$180 \pm 0.4ab$
Stres+Sod tet. dkhdr.	$126 \pm 0.4ab$	$145 \pm 0.4ab$	$146 \pm 0.2ab$	$178 \pm 0.3ab$	$189 \pm 0.3ab$

CAT (gün $P=0.024$, stres $P= 0.014$)

GR oranı kontrol grubunun 6. gününde 155 ± 0.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde 156 ± 0.8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olurken, kuraklık stresi grubunun 6. gününde 158 ± 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. 18. gününde 163 ± 0.7 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olarak ölçülmüş, Stres+ Potasyum tetraborat tetrahidrat grubunda ise 97 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde

108 ± 0.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olduğu ölçülmüştür (Tablo 2). Potasyum tetraborat tetrahidratlı ortamda yetişen soya yapraklarının GR enzim miktarının kontrole göre belirgin bir şekilde azalması, potasyumlu borun kuraklık stresinden kaynaklanan strese karşı olumlu bir etki yapmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Tablo 2. Kuraklık stresine karşı bor uygulanan soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) fidelerinden elde edilen GR ($\mu\text{mol}/\text{dak}/\text{mg}$ T.A) değerleri. (Değerler üç tekrarın ortalaması \pm standart hata olarak verilmiştir ($P < 0.05$)).

Uygulamalar/Gün	6 gün	9 gün	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	$155 \pm 0.2b$	$152 \pm 0.4b$	$152 \pm 0.4b$	$153 \pm 0.4b$	$156 \pm 0.8b$
Kuraklık Stresi	$158 \pm 0.3b$	$158 \pm 0.2b$	$155 \pm 0.2b$	$156 \pm 0.5b$	$163 \pm 0.7ab$
Stres+Pot. tet. thdr	$97 \pm 0.4a$	$87 \pm 0.3a$	$102 \pm 0.3a$	$103 \pm 0.6a$	$108 \pm 0.6ab$
Stres+Amn. tet tihdr	$181 \pm 0.6ab$	$182 \pm 0.4ab$	$172 \pm 0.4ab$	$181 \pm 0.4ab$	$189 \pm 0.4ab$
Stres+Sod bor hdr	$123 \pm 0.4b$	$145 \pm 0.4ab$	$151 \pm 0.3ab$	$155 \pm 0.3b$	$155 \pm 0.5b$
Stres+Lit tet. thdr.	$142 \pm 0.2b$	$145 \pm 0.3ab$	$154 \pm 0.4a$	$152 \pm 0.4b$	$159 \pm 0.6b$
Stres+Sod tet. dkhdr.	$133 \pm 0.3b$	$144 \pm 0.4ab$	$149 \pm 0.5ab$	$152 \pm 0.4b$	$151 \pm 0.7b$

GR (gün $P=0.020$, stres $P= 0.041$)

APX oranı kontrol grubunun 6. gününde 114 ± 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde 117 ± 0.7 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olurken, kuraklık stresi grubunun 6. gününde 256 ± 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. 18. gününde 260 ± 0.8

$\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olarak ölçülmüş, Stres+ Potasyum tetraborat tetrahidrat grubunda ise 148 ± 0.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. ve 18. gününde 135 ± 0.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ T.A. olduğu ölçülmüştür (Tablo 3). Potasyum

tetraborat tetrahidratlı ortamda yetişen soya yapraklarında APX enzim miktarının kuraklık stresi ortamına göre azalması,

potasyumlu borun kuraklık stresine olumlu etki yaptığı anlamında bir gelişme sayılabilir.

Tablo 3. Kuraklık stresine karşı bor uygulanan soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) fidelerinden elde edilen APX ($\mu\text{mol/dak/mg T.A}$) değerleri. (Değerler üç tekrarın ortalaması \pm standart hata olarak verilmiştir ($P<0.05$)).

Uygulamalar/Gün	6 gün	9 gün	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	114 \pm 0.3b	113 \pm 0.5b	112 \pm 0.3b	113 \pm 0.4a	117 \pm 0.7b
Kuraklık Stresi	256 \pm 0.3ab	258 \pm 0.2ab	255 \pm 0.2ab	257 \pm 0.5ab	260 \pm 0.8c
Stres+Pot. tet. thdr	148 \pm 0.5b	148 \pm 0.5b	132 \pm 0.3b	134 \pm 0.4b	135 \pm 0.6b
Stres+Amn. tet tihdr	283 \pm 0.4c	282 \pm 0.4c	276 \pm 0.4c	281 \pm 0.4c	284 \pm 0.4c
Stres+Sod bor hdr	224 \pm 0.5c	245 \pm 0.4c	251 \pm 0.4c	255 \pm 0.3c	261 \pm 0.4c
Stres+Lit tet. thdr.	245 \pm 0.3c	228 \pm 0.3c	250 \pm 0.4c	250 \pm 0.4c	259 \pm 0.5c
Stres+Sod tet. dkhdr.	236 \pm 0.3c	244 \pm 0.3c	249 \pm 0.3c	252 \pm 0.3c	255 \pm 0.6c

APX (gün P= 0.018, stres P= 0.013)

SOD oranı kontrol grubunun 6. gününde 150 \pm 0.2 $\mu\text{mol/mg T.A}$. ve 18. gününde 158 \pm 0.4 $\mu\text{mol/mg T.A}$. olurken, kuraklık stresi grubunun 6. gününde 266 \pm 0.1 $\mu\text{mol/mg T.A}$. 18. gününde 272 \pm 0.5 $\mu\text{mol/mg T.A}$. olarak ölçülmüş, Stres+Potasyum tetraborat tetrahidrat grubunda ise 149 \pm 0.4 $\mu\text{mol/mg T.A}$. ve 18. gününde 156 \pm 0.5 $\mu\text{mol/mg T.A}$. olduğu ölçülmüştür (Tablo 4). Potasyum

tetraborat tetrahidratlı ortamda yetişen soya yapraklarında SOD miktarının kuraklık stresi ortamına göre yüksek belirgin bir şekilde azalması, potasyumlu borun kuraklık stresine karşı bir direnç oluşturduğunu göstermektedir. Çeltik fideleriyle yapılan başka bir çalışmada ise, stres sonrası SOD aktivitesinin yavaş ve kademeli olarak azaldığı belirtilmiştir (Ronald ve Brown, 2003).

Tablo 4. Kuraklık stresine karşı bor uygulanan soya (*Glycine max. L., cv., "A3935"*) fidelerinden elde edilen SOD (U/dak/mg T.A.)değerleri. (Değerler üç tekrarın ortalaması \pm standart hata olarak verilmiştir ($P<0.05$)).

Uygulamalar/Gün	6 gün	9 gün	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	150 \pm 0.2b	150 \pm 0.4b	162 \pm 0.3b	153 \pm 0.5b	158 \pm 0.4b
Kuraklık Stresi	266 \pm 0.1c	264 \pm 0.2ab	261 \pm 0.2ab	265 \pm 0.4ab	272 \pm 0.5ab
Stres+Pot. tet. thdr	149 \pm 0.4b	136 \pm 0.3b	141 \pm 0.2b	147 \pm 0.5b	156 \pm 0.5b
Stres+Amn. tet tihdr	284 \pm 0.3c	282 \pm 0.4ab	272 \pm 0.4ab	281 \pm 0.4ab	298 \pm 0.4ab
Stres+Sod bor hdr	325 \pm 0.4cd	345 \pm 0.4cd	351 \pm 0.3cd	355 \pm 0.3cd	368 \pm 0.5cd
Stres+Lit tet. thdr.	244 \pm 0.3ab	248 \pm 0.4ab	253 \pm 0.4ab	250 \pm 0.4ab	278 \pm 0.6ab
Stres+Sod tet. dkhdr.	331 \pm 0.3cd	344 \pm 0.4cd	346 \pm 0.5cd	351 \pm 0.4cd	359 \pm 0.4cd

SOD (gün P= 0.022, stres P= 0.033)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Katalaz, Gulutatyon redüktaz, Askorbat peroksidaz ve Süperoksit dismutaz aktivitelerinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Enzim aktivitesi ile ilgili veriler incelendiğinde kuraklık ve bor etkenleri ile soya zaman etkileşiminin istatistik olarak ($p<0.05$) önemli olduğu görülmüştür. Enzimlerden, CAT aktivitesi belirgin şekilde artmış, GR, APX ve SOD

aktivitesi kuraklık stresiyle azalmıştır (Çizelge 1). Değişik araştırmacılar tarafından kuraklık stresine bağlı olarak söz konusu enzim oranlarının farklı şekilde etkilendiği bulunmuştur (Nader ve ark., 2006). Buna göre antioksidatif savunma sisteminde belirleyici rolü olan CAT enzim aktivitesinin *Arabidopsis thaliana'* da yükseldiği (Kubo ve ark., 1999), çeltik fidelerinde etkilenmediği (Oidaire ve ark., 2000), GR, APX ve SOD aktiviteleri

kuraklık stresiyle fasulyede azaldığı (EL-saht, 1998) rapor edilmiştir. Kuraklık stresinin CAT aktivitesi üzerinde etkisi birçok araştırmaya konu olmuştur (Bandeoglu ve ark., 2004). Strese bağlı hücre tahribatında CAT aktivitesindeki yükselmenin belirleyici rol oynadığı vurgulanmıştır. Prasad (1997)' a göre, mısır bitkisinde düşük sıcaklık stresine karşı korunmada CAT ın belirleyici bir rol oynamaktadır. Prasad (1997), çalıştığı enzimler içerisinde kuraklık stresine toleransta en iyi ilişkiyi CAT ın verdiğini tespit etmiştir. Benzer şekilde, kuraklık stresiyle ortaya çıkan hasarın CAT aktivitesindeki artışla yakından ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Kuraklık stresine bağlı hücre tahribatında CAT aktivitesindeki azalmanın belirleyici rol oynadığı vurgulanmıştır (Shalata ve ark., 2001; Jung, 2004) Sonuçlar, CAT aktivitesindeki değişimlerin soya için belirgin olduğunu göstermektedir. CAT aktivitesine bakılarak potasyumlu bor uygulaması kuraklık stresine karşı toleransın önemli ölçüde arttığını söyleyebiliriz (Çizelge 1).

GR aktivitesinde azalma olduğu birçok çalışmayla desteklenmektedir (Kubo ve ark. 1999; Chattopadhyay ve ark., 2002). Hıyarda yapılan bir çalışmada GR aktivitesinin stres uygulamasından sonra bitkilerde dereceli olarak azalma gösterdiği, fakat buradaki enzim aktivitesinin oranının bilinen enzim düzeyinin altında olmadığı görülmüştür (Lee ve Lee, 2000). Kuraklık stresiyle birlikte GR düzeyinin domates ve soya yapraklarında değişmediği (Walker ve McKersie, 1993, Doğan, 2011), çeltikte düştüğü (Fadzillah ve ark., 1996, Chattopadhyay ve ark., 2002, Daşgan ve Koç 2009a) bildirilmiştir. Kuraklık uygulamasıyla GR'daki azalma bakarak, sistemin, savunma mekanizmasını aktif hale getirdiğini söyleyebiliriz. Kuraklık stresi koşullarında GR düzeyinde görülen

azalma uygulamaya bağlı olarak önemli ölçüde azalmış olması, SOD'da olduğu gibi, tespit edilemeyen bazı mekanizmaların GR'ın detoksifikasyon kapasitesini azaltmış olabileceğini göstermektedir.

Askorbat peroksidaz aktivitesinin ise kuraklık uygulamasından sonra çeltik fidelerinde arttığı bulunmuştur. (Oidaire ve ark, 2000). Askorbik asit için daha az spesifik olup kloroplastik olmayan ve başlıca hücre duvarlarında ve sitoplazmada lokalize olan askorbat peroksidaz (APX) (Asada, 1992, Hernandez ve Almonsa 2002), denemede stresle birlikte önemli ölçüde azalmıştır. Çalışmada, soya yapraklarındaki APX aktivitesinin kuraklık stresine bağlı olarak giderek arttığı saptanmıştır (Scebba ve ark., 1998; Nader ve ark., 2006). Askorbat peroksidaz aktivitesinin stresle birlikte önemli ölçüde azalması ve kuraklığın ortadan kalkmasıyla artması, strese karşı toleransın olumlu yönde etkilendiğini gösteren bir başka sonuç olmuştur (Çizelge 1). Gaspar ve ark. (1985), Mittova ve ark., (2004)' na göre, yüksek askorbat peroksidaz aktivitesi, lokalize olduğu, hücre duvarlarında ve/veya sitosolde yüksek düzeyde H₂O₂ üretiminin olduğunu gösterebilir. Bu nedenle APX aktivitesindeki düşümlere bağlı olarak bu enzimin lokalize olduğu yerlerde H₂O₂ düzeyinin düşük olabileceğini söyleyebiliriz. Bir başka açıklama ise şu olabilir; APX aktivitesinin stresle birlikte düşmesi, bu enzimin detoksifikasyon (indirgenme) kapasitesinin H₂O₂'nin oksidasyon kapasitesinin altında kalmasıyla ilişkili olabilir (Ramachandra ve ark., 2004, Pinheiro ve ark., 2004; Jaleel, 2009). Lee ve Lee (2000)'nin hıyar bitkisi yapraklarında yaptığı çalışmada SOD aktivitesinin kuraklık stresinde arttığı, stres sonrası 12. saatte kontrol bitkileriyle aynı olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada strese iyi adapte olmuş yabancı domates türünün (*Lycopersicon*

perivianum), kültürü yapılan domates türüne (*Lycopersicon esculentum*) göre, strese karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Bruggemann ve ark., 1999). Yabani türün aktif oksijen radikal oluşumunu etkin şekilde engellediği rapor edilmiştir (Mittova ve ark., 2002). Süperoksit dismutazın (SOD), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyerek (Bowler ve ark., 1992; Karabal ve ark., 2003), SOD miktarının düşük bir durumda kalmasını sağladığı ve bu nedenle Haber-Weiss reaksiyonu üzerinden hidroksil radikal oluşumunu minimize ettiği (Elstner, 1982) bildirilmiştir. Bazı hassas genotiplerde SOD miktarının azalma nedeni fotosentetik olayların yaprak kloroplastlarında meydana geldiği, süperoksit dismutazın kloroplastlarda yer aldığı (Jackson ve ark., 1978) göz önüne alınırsa bu çalışmadaki enzim aktivitesinin de buna bağlı olarak azaldığı düşünülmektedir (Çizelge 1).

GR aktivitesinin dereceli olarak artış gösterdiği, fakat buradaki enzim aktivitesinin oranı stres uygulaması sırasındaki enzim düzeyinin altında olduğu ölçülmüştür (Lee ve Lee, 2000). Kuraklık stresıyla birlikte GR düzeyinin soya yapraklarında değişmediği (Walker ve McKersie, 1993), çeltikte düştüğü (Fadzillah ve ark., 1996, Chattopadhyay ve ark., 2002) bildirilmiştir (Çizelge 1). Kuraklık stresinde GR düzeylerinin farklı şekilde etkilendiğini ortaya koyan önemli çalışmalar bulunmaktadır (Shalata ve ark., 2001; Mittova ve ark., 2002). Potasyum tetraborat tetrahidratlı bor bileşiğinin kullanılması sonucunda, CAT aktivitesinde görülen artışın, oksijen radikallerine karşı koruyucu rol oynadığını göstermektedir. Bulgular oksidatif hasarla enzim aktivitesi arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, kuraklığa karşı bor bileşiklerinin uygulanması amacıyla

yapılan araştırmada, soya bitkisinin bor bileşiklerine karşı tolerans aralığının çok dar olduğu anlaşılmaktadır. Çünkü belirlenen eşik (0.1 mg/l) değerinin altında veya üstünde ki uygulamalar istenen sonucu vermemektedir. Potasyum tetraboratın 0.1 mg/l doz uygulamasının en uygun eşik değeri olduğu ve kuraklık stresine karşı CAT enzim aktivitesinde en iyi sonucu verdiği anlaşılmıştır. Potasyumlu bor bileşiklerinin kuraklık stresine karşı kullanılmasının olumlu sonuç vereceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akçam Oluk E, Demiray H (2004) Bor elementinin sambro no: 3 Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Çeşidinin Büyümesi Üzerine Etkileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41(1),181-190.
- Akçam Oluk E, Demiray H, Yardım D (2006) Bor Fazlalığının Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv.Sambro No.5) Bitkisinin İn Vitro Koşullarda Kök Gelişimi ve Anatomisi Üzerine Etkileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 43(2), 145-152.
- Ahmadi A, Emam Y, Pesarakli M (2010) Biochemical Changes in Maize Seedlings Exposed to Drought Stress Conditions at Different Nitrogen Levels. Journal of Plant Nutrition, 33 (4), 541-556.
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. Physiology Plantarum, 85, 235-241.
- Ashraf M, Iram A (2005) Drought Stress Induced Changes in Some Organic Substances in Nodules and Other Plant Parts of Two Potential Legumes Differing in Salt Tolerance. Flora, 200, 535-546.
- Ashraf M, Ali Q (2007) Relative Membrane Permeability and Activities of Some Antioxidant Enzymes as the Key Determinants of Salt Tolerance in Canola (*Brassica Napus* L.). Environmental and Experimental Botany, 63, 266-273.
- Atalay E, Gezgin S, Babaoğlu M (2003) Buğday (*Triticum durum* Desf.) ve Arpa (*Hordeum Vulgare* L.) İn Vitro Fidelerinin Bor Alımının ICP-AES ile Tespiti. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 17 (32), 47 -52.
- Bandeoglu E, Eyidogan F, Yucel M, Oktem HA (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stres. Plant Growth Regulation 42, 69-77.

- Bowler C, Van montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stres tolerance. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 43, 83-116.
- Bruggemann W, Beyel V, Brodka N, Poth H Weil M, Stockhaus J (1999) Antioxidative and antioksidative enzymes in wild-type and transgenic Lycopersicon genotypes of different chilling tolerance. Plant Science, 140(2), 145-154.
- Bishnoi SK, Kumar BN, Rani C, Data S, Kumari P, Sheoran S, Angrish R (2005) Changes in Protein Profile of Pigeonpea Genotypes in Response to NaCl and Boron Stres. Biologia Plantarum, 50(1), 135-137.
- Choi E, Kolesik P, McNeill A, Collins H, Zhang Q, Huynhi B, Graham R, Stangoulis J (2007) The Mechanism of Boron Tolerance for Maintenance of Root Growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell and Environment, 30, 984-993.
- Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta DN, Ghosh B (2002) Protect role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*). Plants, 116, 192-199.
- Çakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and highlight intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology, 98, 1222-1226.
- Çakmak I (1994) Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. Journal of Experimental Botany, 45, 1259-1266.
- Daşgan HY, Koç S (2009a) Evaluation of Salt Tolerance in Common Bean Genotypes by Ion Regulation and Searching for Screening Parameters. Journal of Food Agriculture Environment, 7(2), 363-372.
- Daşgan HY, Kuşvuran Ş, Abak K, Leport L, Larher F, Bouchereau A (2009b) The Relationship Between Citrulline Accumulation and Salt Tolerance During the Vegetative Growth of Melon (*Cucumis melo* L.). Plant Soil Environment, 55 (2), 51-57.
- Dalal M, Khanna-Chopra R (2001) Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents. Physiologia Plantarum, 111, 297-304.
- Doğan M, Tıprıdamaz R, Demir Y (2010a) Effective salt criteria in callus- cultured tomato genotypes. A Journal of Bioscience Contents, 65, 613- 618.
- Doğan M, Tıprıdamaz R, Demir Y (2010b) Salt resistance of tomato species grown in sand culture, Plant Soil Environ, 56, 499-507.
- Doğan M (2011) Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stres. Africa Journal of Biotechnology, 10(32), 5972-5978.
- Doğan M (2012) Farklı Bor Uygulamalarının *Capparis* L. spp. ve *Carthamus* L. spp. Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 16-2, 154-161
- El-saht HM (1998) Responses to chilling stres in frech bean seedlings: Antioxidant compounds. Biologia Plantarum, 41(3), 395-402.
- Eltner EF (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. Annual Review of Plant Physiology Plant, 33, 73-96.
- Fadzillah NM, Gilli V, Finch RP, Burdon RH (1996) Chilling oxidative stres and antioxidant responses in shoot culture of rice, Planta, 199, 552-556.
- Gaspar T, Penel C, Castillo JF, Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Physiologia Plantarum, 64, 418-423.
- Hernandez JA, Almansa MS (2002) Short-term effects salt stres on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. Physiologia Plantarum, 115, 251-257.
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without Soil. Circ. Calif. Agr. Exp. Sta., 347-461,
- Jaleel CA (2009) Non-Enzymatic Antioxidant Changes in *Withania Somnifera* With Varying Drought Stress Levels. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 4(2), 64-67.
- Jung S (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. Plant Science, 166, 459-466.
- Jackson C, Dench J, Morore AL, Halliwell B, Foyer CH, Hall DO (1978) Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. European Journal of Biochemistry, 91, 339-344.
- Kalefetoğlu T, Ekmekçi Y (2005) The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 18(4), 723-740.
- Karabal E, Yücel M, Hüseyin AÖ (2003) Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. Plant Science 164, 925-933.
- Khanna-Chopra R, Selote DS (2007) Acclimation to Drought Stres Generates Oxidative Stres Tolerance in Drought Resistant than-Susceptible Wheat Cultivar Under Field Conditions. Environmental and Experimental Botany, 60, 276-283.

- Kubo A, Aono M, Nakajima N, Saji H, Tanaka K, Kondo N (1999) Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 112(3), 279-290.
- Lahet JJ, Lenfant F, Courderot-Masuyer C, Ecartot-Laubriet E, Vergely C, Durnet-Archeray MJ, Freysz M, Rochette L (2003) *In vivo* and *in vitro* antioxidant properties of furosemide. *Life Sciences*, 73(8), 1075-1082.
- Lichtenhaler HK (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14
- Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. *Plant sciences*, 159, 75-85.
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environmet of Experimental Botany*, 49, 69-76.
- Mittova V, Tal M, Volokitta M, Guy M (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 115, 393-400.
- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1105-1113.
- Munne-Bosch S, Penuelas J (2003) Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. Grown under mediterranean field conditions. *Annals of Botany*, 92, 385-391.
- Nader B, Jimenez A, Megdiche W, Lundqvist M, Sevilla F, Abdely C (2006) Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum*, 126, 446-457.
- Oidaire H, Sano S, Koshiha T, Ushimaru T (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156, 811-813.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought, *Plant Science*, 167, 1307-1314.
- Prasad TK (1997) Role of catalase in inducing chilling tolerance in preemergent maize seedlings. *Plant Physiology*, 114, 1369-1376.
- Ramachandra Reddy A, Chaitanya KV, Jutur PP, Sumithra K (2004) Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars, *Environmet of Experimental Botany*, 52, 33-42.
- Ronald PC, Brown PH (2003) Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem-boron mobility in rice, *Physiology Plantarum*, 117, 79-84.
- Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiology Plantarum*, 104: 747-752.
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system, *Physiologia Plantarum*, 112, 487-494.
- Walker MA, Mckersie BD (1993) Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology*, 14, 234-239.
- Warington K (1923) The Effects of Boric Acid and Borax on The Broad Bean And Certain Other Plants, *Annual of Botany*, 37, 457-466.