MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) KÖKLERİNDE ALÜMİNYUM TOKSİSİTESİNE KARŞI PUTRESİN UYGULAMASININ ETKİLERİ

ÖZGE AKGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) KÖKLERİNDE ALÜMİNYUM TOKSİSİTESİNE KARŞI PUTRESİN UYGULAMASININ ETKİLERİ

ÖZGE AKGÜN

520116013

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Özge AKGÜN'ün "**Buğday (*Triticum aestivum* L.) Köklerinde Alüminyum Toksisitesine Karşı Putresin Uygulamasının Etkileri**" başlıklı tez çalışması, 02 Nisan 2019 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Filiz VARDAR (Danışman)
Marmara Üniversitesi .....

Doç.Dr. Yıldız AYDIN (Üye)
Marmara Üniversitesi .....

Dr. Öğr. Üyesi Özlem AYTÜRK (Üye)
Maltepe Üniversitesi .....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08../05../2019 tarih ve 2019/10-02 sayılı kararı ile Özge AKGÜN'ün Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Bülent EKİCİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana ilgisini, hoş görüsünü esirgemeyen, yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Filiz Vardar'a; yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle laboratuvar çalışmalarımın her basamağında emeği geçen Sayın Arş. Gör. Dr. Aslıhan Çetinbaş Genç'e, tezimin deneysel sürecinde bilgi ve becerilerini benimle paylaşan, bana destek olan Sayın Fatma Yanık'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğumda değerli zamanını ayırarak bana yardımcı olan arkadaşım Gamze Kurtuluş'a, literatür tarama sürecinde çeviri metinlerinde her türlü sabrı ve desteği benden esirgemeyen, bana değerli vaktini ayıran öğretmen arkadaşım başta Ayşegül Hıdır olmak üzere okulumdaki İngilizce zümresine, okul müdürümüze ve değerli öğretmen arkadaşlarıma teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın yazım sürecinde eleştiri ve fikirleriyle tezime katkı sağlayan kardeşim Gözde Akgün'e; hayatımın her dönemine ışık tutan, maddi ve manevi destek olan, benim başarımlarımla gurur duyan, başarısızlıklarım ve üzüntülerim olduğunda benimle birlikte hüzünlenen, karşılaştığım zorlukları koşulsuz göğüsleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2019 **Özge AKGÜN**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i
ÖZET iii
ABSTRACT iv
SEMBOL v
KISALTMALAR vi
ŞEKİL LİSTESİ viii
TABLO LİSTESİ ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Al Toksisitesi 5
1.2. Al Toksisitesinin İyileştirilmesi 16
1.3 Poliaminler 20
2. MATERYAL VE YÖNTEM 25
2.1. Bitki Materyali 25
2.1.1. Buğday (*Triticum aestivum* L.)'ın Genel Özellikleri ve Sistematiği 25
2.1.2 Buğday Tohumlarının Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi 27
2.1.3 Putresin ve Alüminyum Çözeltisi Uygulama İşlemi 27
2.2 Araştırma Yöntemleri 28
2.2.1. Morfolojik Yöntemler 28
2.2.2 Sitokimyasal Yöntemler 29
2.2.3. Biyokimyasal Yöntemler 32
2.2.4 İstatistiksel Analizler 36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
3.1 Morfolojik Yöntemler 36
3.1.1 Buğday Kök Uzunluğu: 36
3.2. Sitokimyasal Yöntemler 38
3.2.1 Buğday Köklerinde Al^{+3} İyon Miktar Tayini 38
3.2.2 Buğday Köklerinde Plazma Membranı (Zarı) Bütünlüğünün Tespiti 40
3.2.3 Mitotiks İndeks ve Kromozom Anormallikleri 42
3.3. Biyokimyasal Yöntemler 46

3.3.1. Buğday Köklerinde Peroksidaz (POD) Aktivite Tayini..... 46

3.3.2 Buğday Köklerinde Süperoksit Dismutaz Aktivite (SOD) Tayini..... 48

3.3.3 Buğday Köklerinde Katalaz (CAT) Aktivite Tayini:..... 49

3.3.4 Buğday Köklerinde Lipit Peroksidasyonu Tayini: 52

4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....54

KAYNAKLAR.....56

ÖZGEÇMİŞ.....77

ÖZET

Buğday (*Triticum aestivum* L.) Köklerinde Al Toksisitesinin İyileştirilmesine Yönelik Dışsal Putresin Uygulamaları

Alüminyum (Al) toprakta bulunan elementler arasında üçüncü sıradadır. Asitli toprakta (pH≤4.5) çözünerek fitotoksik forma (Al^{+3}) dönüşür. Al^{+3} toksisitesi sonucu özellikle tarım arazilerinde ürün veriminde ve kalitesinde kayıplara sebep olmaktadır. Bu çalışmada buğday köklerinde 100µM $AlCl_3$ toksisitesine 0.5mM ve 1mM dışsal putresin uygulamasının iyileştirici özelliği araştırıldı. Buğday köklerine 96 saat boyunca distile su, 0.5mM Put, 1mM Put, 100µM $AlCl_3$, 0.5mM Put+100µM $AlCl_3$, 1mM Put+100µM $AlCl_3$ uygulaması yapıldı. Kontrol grubu ile pozitif kontrol grupları karşılaştırıldığında 1mM Put uygulaması 0.5mM Put'a göre kök büyüme uzunluğu ve mitotik aktivitede artış gösterdi. 0.5mM Put uygulaması 1mM Put'a göre Al^{+3} iyon birikimi, plazma membranında bozulmaya bağlı hücre ölümü, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerinde olumlu etki gösterdi. Kontrol grubu ile 100µM $AlCl_3$ uygulaması karşılaştırıldığında; kök büyüme inhibisyonu, plazma membran bütünlüğünde bozulma, mitotik indekste azalma, lipid peroksidasyonu, Al^{+3} iyon birikimi ve antioksidan enzim miktarında artış belirlendi. Toksisite belirtilerini iyileştirmek için Put ve Al'nin birlikte uygulanmış; (1mM Put+$AlCl_3$) grubu, (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre kök büyüme inhibisyonu, Al^{+3} iyon birikimi, hücre ölümü, mitotik indeks, lipit peroksidasyonu ve peroksidaz aktivitesini iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür. (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubu, (1mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre serbest radikal oluşumunun azalmasıyla süperoksit dismutaz, katalaz aktivitesi düşüş gösterdi. Elde edilen çalışma sonuçlarına göre buğday köklerinde 100µM $AlCl_3$'ün toksisisitesinin iyileştirilmesinde 1mM Put uygulaması daha etkili oldu. Buğdayda Al-Put uygulamasının mitotik indeks üzerine etkisi ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar ilk olma özelliğindedir. Yapılan çalışma aynı zamanda tarımsal önemi olan bitkilerde Al kaynaklı toksisitenin alternatif olarak dışsal poliamin uygulamasıyla önlenerek mahsul miktarı ve kalitesinde sağlanan artışla gelecekte insanoğlunu bekleyen besin kıtlığı sorununun çözümüne odaklanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Al toksisitesi, buğday, kök, mitotik indeks, antioksidan enzim aktivitesi, putresin.

Nisan, 2019 **Özge AKGÜN**

ABSTRACT

The Effects of Putrescine Application Against Aluminum Toxicity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Roots

Aluminum (Al) is the third most found element in the earth. Al transforms into a phytotoxic form in acidic soil by dissolving. Al^{+3} toxicity causes productivity and quality loss especially in the farm land. Alternative characteristic of 0.5mM and 1mM putrescine application on 100µM $AlCl_3$ toxicity in wheat root is carried out. In this study distilled water, 0.5mM Put, 1mM Put, 100µM $AlCl_3$, 0.5mM Put+100µM $AlCl_3$, 1mM Put+100µM $AlCl_3$ is applied to the wheat roots for 96 hours. When the negative and positive control groupare compared, 1mM Put application increased root elongation and mitotic activity as regards to 0.5mM Put. 0.5mM Put application produced positive effects on Al^{+3} ion accumulation, cell death because of deformation in plasma membrane, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in contrast to 1mM Put. When the control group and 100µM $AlCl_3$ application is compared; an increase in root elongation inhibition, deformation in plasma membrane integrity, lipid peroxidation, Al^{+3} ion accumulation, the amount of antioxidative enzyme and mitotic index reduction is recognised. To improve toxicity symptoms, Put and Al is applied together; (1mM Put+$AlCl_3$) is observed being more effective in improving root elongation inhibition, Al^{+3} ion accumulation, cell death, mitotic index, lipid peroxidation, peroxidase activity when compared to (0.5mM Put+$AlCl_3$). In (0.5mM Put+$AlCl_3$) group superoxide dismutase and catalase activity decreased with the effect of the reduction in the formation of free radicals. According to the results, it is shown that 1mM Put application is more effective at the improving the toxicity of 100µM $AlCl_3$ in wheat root. The results of the influence of Al-Put application on wheat on mitotic index has the characteristic to be the first. The survey not only suggested that Al toxicity has dangerous affects but also different concentrations of putrescine, as a polyamine has healing affects on plant growing. The results are intended to contribute to studies on the improvement of aluminum induced toxicity, especially in plants of agricultural importance.

Key words: Aluminum toxicity, mitotic index, antioxidant enzyme activity, putrescine, root, wheat.

April, 2019 **Özge AKGÜN**

SEMBOL

µM **:** Mikromolar

mM **:** Milimolar

gr **:** Gram

cm **:** Santimetre

ml **:** Mililitre

N **:** Normal

g **:** Gravite

nm **:** Nanometre

M **:** Molar

rpm **:** Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)

µl **:** Mikrolitre

kDa **:** Kilodalton

KISALTMALAR

ABC : ATP bağlayıcı kutu

ACS : ACC sentaz

ADC : Arjinin dekarboksilaz

ALMT : Alüminyumla aktive edilmiş malat taşıyıcılar

APX : Askorbat peroksidaz

ATP : Adenozin trifosfat

CAT : Katalaz

DNA : Deoksiribonükleikasit

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

FAO : Food and Agriculture Organization-Gıda ve Tarım Örgütü

G proteinleri : Guanin nükleotid bağlama proteinleri

GPX : Glutatyon peroksidaz

HNE : Hidroksinonenal

IP3 : İnositol-1,4,5-trifosfat

MATE : Çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon

MDA : Melondialdehit

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

OA : Organik asit

ODC : Ornithin dekarboksilaz

OsPin2 : Oksin akışlı taşıyıcı

PA : Poliamin

PIP2 : Fosfatidilinositol-4, 5- difosfat

POD : Peroksidaz

PUT : Putresin

ROT : Reaktif oksijen türleri

RNA : Ribonükleikasit

SA : Salisilik asit

SAM : S-adenozil metiyonin

SAMDC :S-adenozil metiyonin dekarboksilaz

SDS : Sodyum dodesil sülfat

SOD : Süperoksit dismutaz

SNP **:** Sodyum nitroprussid

SPD **:** Spermidin

SPM **:** Spermin

TBA **:** Tiobarbitürik asit

TCA **:** Trikloroasetik asit

UV **:** Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. ROT'lara karşı temel antioksidan savunma sistemi. 5
Şekil 1.2. Yerkabuğunda alüminyum bolluğu ve türleşme. 6
Şekil 1.3.Bitki kökünün enine ve boyuna kesiti 8
Şekil 1.4. Bitkinin Al stresine karşı oluşturduğu yanıtlara genel bir bakış 13
Şekil 1.5. Bitkide alüminyum toksisitesine yanıt ve tolerans mekanizmasının şematik gösterimi. 15
Şekil 1.6. Al stresli bitkilerin kök uçlarından Al tarafından aktive edilen organik asit (malat, sitrat, oksalat) salgılanması 18
Şekil 1.7. Bitkilerde poliaminlerin biyosentez şeması 22
Şekil 2.1. *Triticum aestivum* L. (buğday)'ın sistematikteki yeri. 25
Şekil 3.1. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde % kök uzunluklarına ait grafik. 37
Şekil 3.2. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde Al^{+3} iyonu birikiminin grafiği 39
Şekil 3.3. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde plazma membranı bütünlüğünün bozulması ve Evans mavisinin hücre içine alınımı. 41
Şekil 3.4. Negatif kontrol grubuna ait buğday kök uçlarında normal mitoz bölünme evreleri. **a.** Profaz, **b**. Metafaz, **c.** Anafaz, **d.** Telofaz. Bar: 5 µm. 45
Şekil 3.5. Put, Al ve Al-Put uygulanan gruplarda görülen c mitoz ve kromozom anormallikleri. **a**. PK1, **b.** PK2, **c.** Al, **d.** Al+0.5 Put, **e.** Al+1 Put. Bar: 5 µm. 45
Şekil 3.6. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde peroksidaz aktivite tayini. 47
Şekil 3.7. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde süperoksit dismutaz aktivite tayini. 49
Şekil 3.8. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde katalaz aktivite tayini. 51
Şekil 3.9. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde lipid peroksidasyon tayini. 53

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. *Triticum aestivum* L. Demir 2000 (buğday) varyetesinin tarımsal özellikleri (TBMAE-Ankara). 26
Tablo 2.2. Çalışma gruplarının hazırlanması. 27
Tablo 2.3. Uygulamada kullanılacak stok ve solüsyonların elde edilmesi. 28
Tablo 2.4. Hematoksilen ve KIO_3 bulunan çözeltinin hazırlanışı. 30
Tablo 2.5. Evans blue (Evans mavisi) çözeltisinin hazırlanışı. 30
Tablo 2.6. Aseto-orsein ve bazik fuksin çözeltilerinin hazırlanışı..... 31
Tablo 2.7. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan fosfat ve ölçüm tamponlarının hazırlanışı. 32
Tablo 2.8. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan ekstraksiyon tamponunun hazırlanışı. 34
Tablo 2.9. Süperoksit dismutaz aktivitesi için ölçüm tamponu hazırlanışı. 34
Tablo 2.10. Katalaz ölçüm tamponunun hazırlanışı. 35
Tablo 3.1. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde mitotik indeks ve kromozom anormallikleri. 44
Tablo 4.1. 100µM Al toksisitesini iyileştirmede 0.5 mM ve 1 mM Put uygulamasının negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması……....55

1. GİRİŞ

Endüstriyel ve teknolojik ilerlemenin yanı sıra, dünyanın tüm ülkeleri kirlilikten kaynaklanan çevresel sorunlarla başa çıkmada büyük zorluklarla karşılaşmaktadır. Değişen miktar ve toksisite derecesindeki organik ve inorganik bileşenler toprağın pH'sını düşürerek asitleşmesine yol açmaktadır. Toprağın asitleşmesi son yıllarda ekonomik açıdan önemli bir çevre sorunu olup, ticari açıdan ürün verimliliğini sınırlandırmaktadır (Gupta ve ark., 2013).

Alüminyum (Al), yer kabuğunda oksijen ve silisyumdan sonra en bol ve yaygın olarak bulunan üçüncü elementtir. Toprağın ayrılmaz bir bileşeni olan Al minerali bitki gelişimi için gerekli elementlerden biri değildir. Toprak pH'sının nötr ya da zayıf asidik olduğu toprakta çökelmiş oksit veya alüminosilikatlar halinde bulunur (Kochian, 1995; Rengel, 2004; Kacar ve Katkat, 2007). Toprak pH'sı çeşitli çevresel faktörlerin (elektrik dağıtım santralleri, yoğun endüstriyel işlemlere ait faaliyetler, egzoz gazı salınımı, asit yağmurları, yoğun amonyumlu suni gübreleme, organik madde yoğunlaşması vb.) etkisiyle 5'in altına düştüğünde kompleks Al çözünerek $Al(H_2O)_6^{+3}$ $Al(OH)^{+2}$ ve $Al(OH)_2^{+}$ gibi fitotoksik bileşenlere dönüşür. Bitkiler tarafından alınan toksik Al^{+3} iyonu büyüme ve gelişmede gerilemeye dolayısıyla verim düşüklüğüne yol açar (Matsumoto, 2000; Vitorello, 2005; Wang, 2006; Vardar ve Ünal, 2007). Asitli topraklardaki Al toksisitesi dünya çapında ürün verimini sınırlandıran başlıca etmenlerdendir (Ryan ve Kochian, 1993; Kochian, 1995; Ma, 2000; Poschenrieder, 2008; Nunes-Nesi ve ark., 2014).

Bitkilerde Al toksistesi çok yönlü zararlı etkilerin oluşmasını etki etmektedir. Bu zararlı etkilerin bazıları saniyeler ve dakikalar arasında ortaya çıkarken; bazıları ise daha uzun vadede fark edilebilir. Bunun yanında çeşitli bitki türleri Al'nin mikromolar konsantrasyonlarına bile duyarlıdır (Kochian ve ark., 2005).

Al toksisitesi pek çok hücrenin fonksiyonunu bozarak bitki büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkiler. Kök büyümesinin inhibisyonu bitkilerde Al toksisitesinin en kolay tanımlanabilen özelliği olup, yaygın olarak Al toksisitesinin bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (Ciamporová, 2002; Gupta ve ark., 2013; Schmitt ve ark., 2016). Al toksisitesinin en belirgin göstergesi olan kök uzamasının hızla

engellenmesi; hücre uzamasının durması, hücre çeperinin polisakkarit içeriğinde değişiklikler ve ligninleşmenin artışı ile meydana gelmektedir (Kenzhebaeva ve ark., 2001). Bunun yanında hücre döngüsünün bozulması sonucu azalan mitotik aktivite de kök büyümesinin hızlı bir şekilde azalmasına neden olur. Azalan mitotik aktivite buğday, (Silva, 2012), mısır (Marienfeld ve ark., 2000; Doncheva ve ark., 2005), arpa (Budikova ve Durcekova, 2004), fasulye (Marienfeld ve ark., 2000) gibi bazı tarımsal ürünlerin kök uçlarında Al toksisitesi sonucunda gözlemlenmiştir.

Ayrıntılı çalışmalarda da Al'nin kök uzamasının yanında morfolojik olarak kök uçlarının şişmesi, emici tüy gelişiminin indirgenmesi gibi semptomlarında geliştiği belirtilmektedir (Zelinova ve ark., 2011). Al'ye uzun süre maruz kalınması sonucu oluşan yaygın kök hasarları sonrasında su ve mineral alımındaki bozulmalar bitki büyümesi ve verimliliğini etkiler (Barceló ve Poschenrieder, 2002).

Al'nin potansiyel toksisitesi alüminyumun apoplastik (hücre çeperi), plazma membranı ve simplastik (sitosol) hedefler ile kompleks etkileşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Kochian ve ark., 2005). Al'nin en önemli hücresel etkileşimlerinden bazıları; nukleus, kromozomlar, DNA, plazma zarı ve hücre iskeletidir. Bu yapılarla etkileşimleri sonucunda hücre homeostazisindeki değişimler soucu ortaya oksidatif stresin çıkmaktadır (Vardar ve ark., 2015, 2016).

Bazı bitkiler ise Al'nin toksik etkileri ile mücadele etmek için, başta sitrat, oksalat ve malat gibi organik asitler (OA) yanında fosfat (P) ve fenolik bileşikler gibi Al-şelatlayıcı maddelerin köklerinden salgılanmasını içeren mekanizmalar geliştirmişlerdir (Yang ve ark., 2012; Brunner ve Sperisen, 2013; Nunes-Nesi ve ark., 2014). İçsel detoksfikasyon mekanizması ise çoğunlukla organik asitlerle Al kompleksleri oluşturmayı ve bitki sitozolünde serbest Al'nin düşük seviyede tutulması için vakuollerin içine hapsedilmesini içerir (Baluška ve ark., 2003).

Al direnç mekanizmalarını düzenleyen genler, öncelikle çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenen ALMT (Alüminyumla aktive edilmiş malat taşıyıcılar), MATE (Çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon), ABC (ATP bağlayıcı kutu) taşıyıcı, Nramp ve aquaporin familyalarının üyeleridir (Ma ve ark., 2014; Arenhart ve ark., 2016). Bu genlerin, plazma membranı boyunca organik asit anyonlarının akışını aşamalı olarak kolaylaştıran membran taşıyıcı proteinleri kodladığı ayrıntılı bir şekilde

belgelenmiştir (Gupta ve ark., 2013; Fan ve ark., 2016). Al araştırmasının son odak noktası, Al toleransında rol oynayan çeşitli genleri düzenleyebilecek çeşitli fitohormonların etkileşimleri üzerinedir (Kopittke, 2016). Bu nedenle, Al toksisite ve tolerans mekanizmalarına dahil olan genlerin detaylı karakterizasyonu, moleküler düzeyde Al toksisite ve tolerans mekanizmalarının çözülmesi için gereklidir.

Moleküler hasar mekanizması tam olarak aydınlatılamayan Al toksisitesi çalışmalarının bir kısmı da toksisite sonucunda ortaya çıkan hasarların iyileştirilmesi yönündedir. İyileştirme için kullanılan bileşiklerden en çok öne çıkanlar çeşitli organik (malik asit, sitrik asit vb.) ve inorganik bileşiklerdir (Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg) vb.) Bunun yanında salisik asit ve poliaminler kullanılmıştır.

Poliaminler; küçük, pozitif yüklü, değişken hidrokarbon zincirlerine ve iki veya daha fazla birincil amino grubuna sahip olan organik polikatyonlardır. Yüksek yapılı organizmalarda diamine putresin (Put), triamin spermidin (Spd) ve tetramin spermin (Spm) yaygın olarak rastlanan poliaminlerdir (Pegg ve Michael, 2010). Poliaminlerin hücre bölünmesi, farklılaşması, gen ekspresyonu, DNA replikasyonu, protein sentezi ve apoptozu da içeren temel hücresel süreçleri düzenleyici rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Alcázar ve ark., 2010). Aktif olarak büyüyen dokularda ve stres koşulları altında tespit edilen bitki poliaminleri; hücre bölünmesi, embriyogenez, kök oluşumu, meyve gelişimi ve olgunlaşmasının kontrolü, biyotik ve abiyotik streslere karşı cevap oluşturulmasında rol oynarlar (Kumar ve ark., 1997). Hücre içerisinde stres koşullarında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROT) dengelenerek oksidatif hasarında önlenmesinde rol oynar. Fakat hücre içerisindeki ROT'ların artışı ve poliaminlerin miktarında meydana gelen değişiklik sonucunda hücrenin fonksiyonu bozularak hücre ölümü ortaya çıkabilir (Büyük ve ark., 2012).

ROT olarak adlandırılan serbest radikaller en dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron ayrılmasıyla ya da eklenmesiyle oluşurlar. Meydana gelen radikaller çok reaktif ve kararsızdır. Başka moleküller ile kolayca elektron alış verişinde bulunurlar. ROT'lar başka moleküllere elektron verip bunlardan elektron alabilme özellikler nedeniyle vücutta indirgeyici ve yükseltgeyici olarak rol oynarlar (Flora, 2007). Canlı organizmaların hücrelerinde görülen singlet oksijen ($_1O^2$), süperoksit anyonu (O^{2-}),

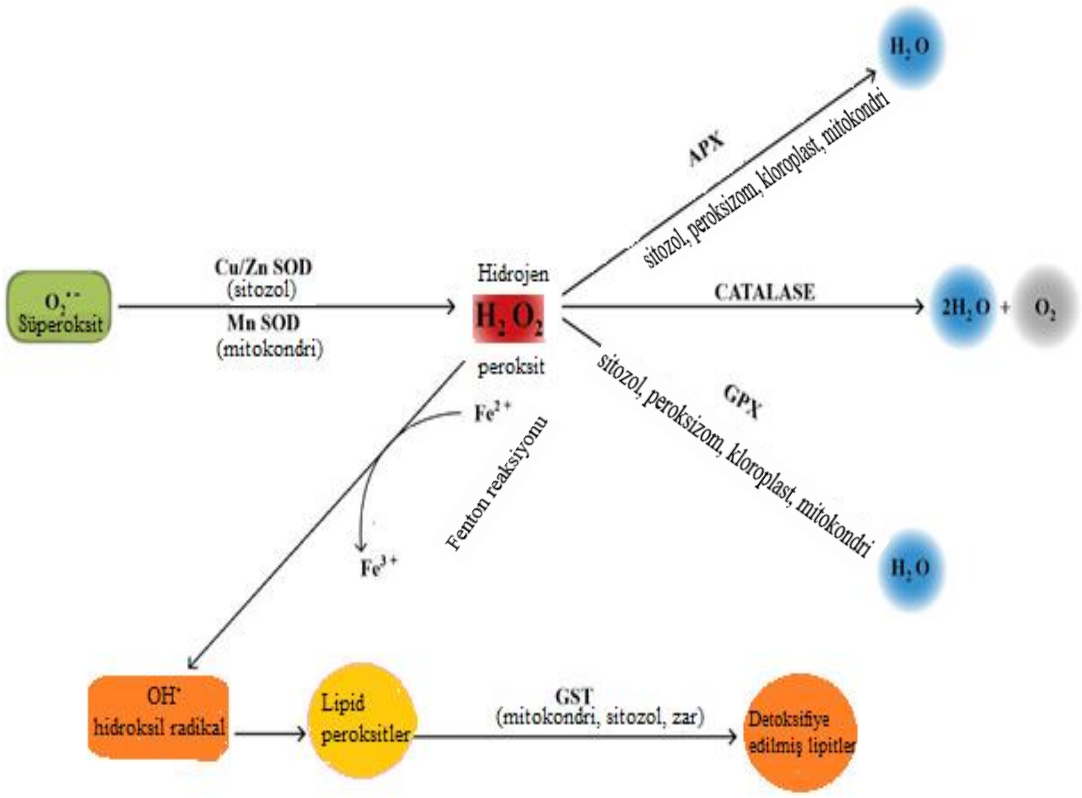
hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) en sık görülen reaktif oksijen türleridir (Şekil 3.6) (Babior, 2000).

Bitkinin normal gelişim sürecinde metabolik olaylar sırasında üretilen ROT'lar ancak, antioksidan savunma sistemi ile aralarındaki denge sayesinde zararlı etki oluşturmazlar (Edreva, 2005). Buna rağmen antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması ve ROT üretiminin artması nedeniyle, serbest radikallerle antioksidan aktivitesi arasındaki denge bozulmakta ve oksidatif hasarlar meydana gelmektedir (Poontariga ve ark., 2003).

Bitkilerde ROT'lar normal metabolik aktiviteler sırasında, kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşabildikleri gibi (Van Breusegem ve Dat,2006) kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, ağır metaller, UV ışık, mekanik yaralanma, patojen infeksiyonu, hava kirliliği, ağır metal, yüksek derecede tuzlu ortam, yüksek ışık stresi ve hipoksi gibi biyotik ve abiyotik stres koşullarında da oluşabilir (Gechev ve ark., 2003). Bitkilerde ROT'ların üretimi sonucunda enzimlerin direk olarak inhibisyonu sonucunda proteinlerin oksidasyonu, membranlarda lipit peroksidasyonu ile toksik bileşiklerin ortaya çıkması, protein denatürasyonu, programlı hücre ölümü (apoptozis), DNA ve RNA'da oksidatif hasarlar meydana gelmektedir (Mojović ve ark.,2004;).

Stres koşulları altında bitkiler yaşamlarını sürdürebilmek ve ROT düzeylerini kontrol altında tutabilmek için çeşitli antioksidanlara sahiptir. Bunlar enzimatik antioksidantlar ve enzimatik olmayan antioksidantlar olmak üzere ikiye ayrılır. Bitki dokularında ROT'ları ortadan kaldıran süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve gayakol peroksidaz enzimatik antioksidantlardır (Şekil 3.6). Düşük moleküler ağırlığa sahip olan askorbat, glutatyon, fenolik bileşikler, karotenoitler ve tokoferoller enzimatik olmayan antioksidantlardır (Smirnoff, 2005).

Antioksidan savunma mekanizmasının aktivitesi abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin etkisiyle ROT'ları yok etmek için artış sağlar. Bitkinin ROT'ları süpürmek için yüksek antioksidan kapasitesini koruması, bitkinin stres faktörlerini tolere etmesine bağlı olarak değişir (Chen ve ark., 2010).



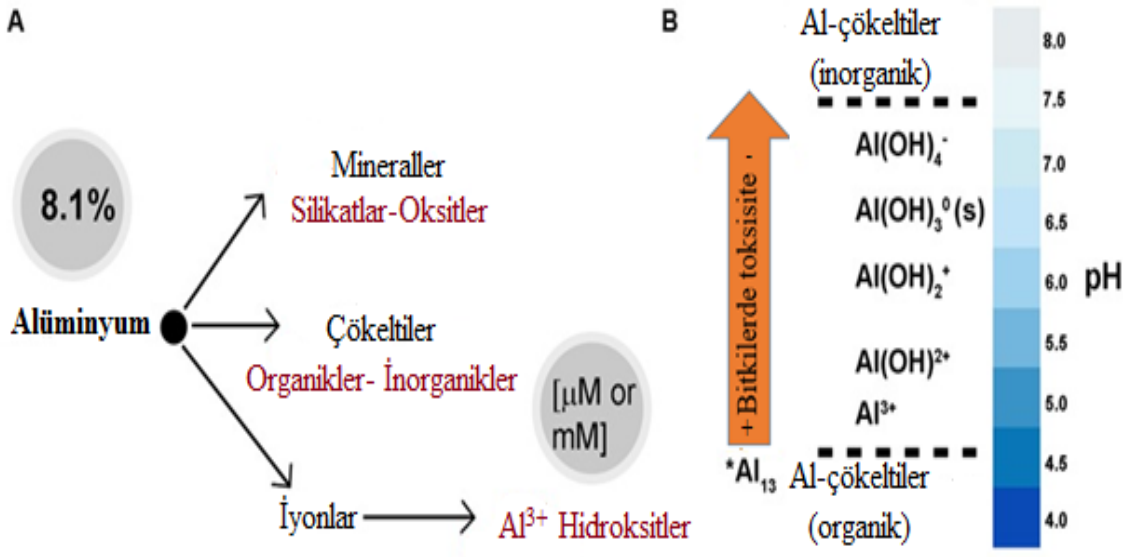
Şekil 1.1. ROT'lara karşı temel antioksidan savunma sistemi. SOD: Süperoksit dismutaz APX: Askorbat peroksidaz, GPX: Glutatyon peroksidaz, GST: Glutatyon S-transferaz.

Çevresel stresler dünya genelindeki ürün kayıplarının arkasındaki temel nedenlerdendir ve dünya tarım ekonomisine zarar vermektedir. Dolayısıyla tüm dünyanın temel odağı hem abiyotik hem de biyotik streslerin üstesinden gelmek için etkili stratejiler tanımlamak ve uygulamaktır (Gupta ve ark.,2016). Çalışmamızda Al'nin buğday (*Triticum aestivum*) köklerinde oluşturduğu toksisitenin iyileştirilmesi için bir poliamin çeşidi olan putresinin uygun konsantrasyonunu belirlemek amaçlanmıştır.

1.1. Al Toksisitesi

Al, yer kabuğunda oksijen ve silikondan sonra yaklaşık % 8.1'lik oranla en çok bulunan elementtir (Şekil 1.1.A). Al toprakta bitkilerin yaşam döngüsü boyunca her yerde bulunmasına rağmen, özel bir biyolojik işlevi yoktur (Poschenrieder ve ark., 2008; Kisnierienė ve Lapeikaitė, 2015). Organizmalar, genellikle toprakta kompleks bileşikler (alüminosilikatlar ve alüminyum oksitler) şeklinde bulunan Al'den etkilenmezler, ancak düşük pH'larda Al çözünerek alüminyum hidroksitleri oluşturmak

üzere su moleküllerini hidrolize eder. Çökelmiş ya da organik bileşiklerle şelatlanmış Al, bitkiler için toksik değildir. Topraktaki toplam Al konsantrasyonu ve Al bileşiklerinin türleşmesi pH ve ortamdaki kimyasal çeşitliliğe bağlıdır (Kisnieriené ve Lapeikaité, 2015). Al'nin farklı formlarının bitki büyümesi üzerindeki toksik etkisi çoktan aza doğru şöyle sıralanabilir: Al^{+3}, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$, $Al(OH)_4^{-}$ (Şekil 1.1.B). Düşük pH'da (~4.3) üç değerlikli alüminyum (Al^{3+}) toprakta en çok bulunan formudur ve bitki büyümesi üzerinde en yüksek toksik etkiye sahiptir.



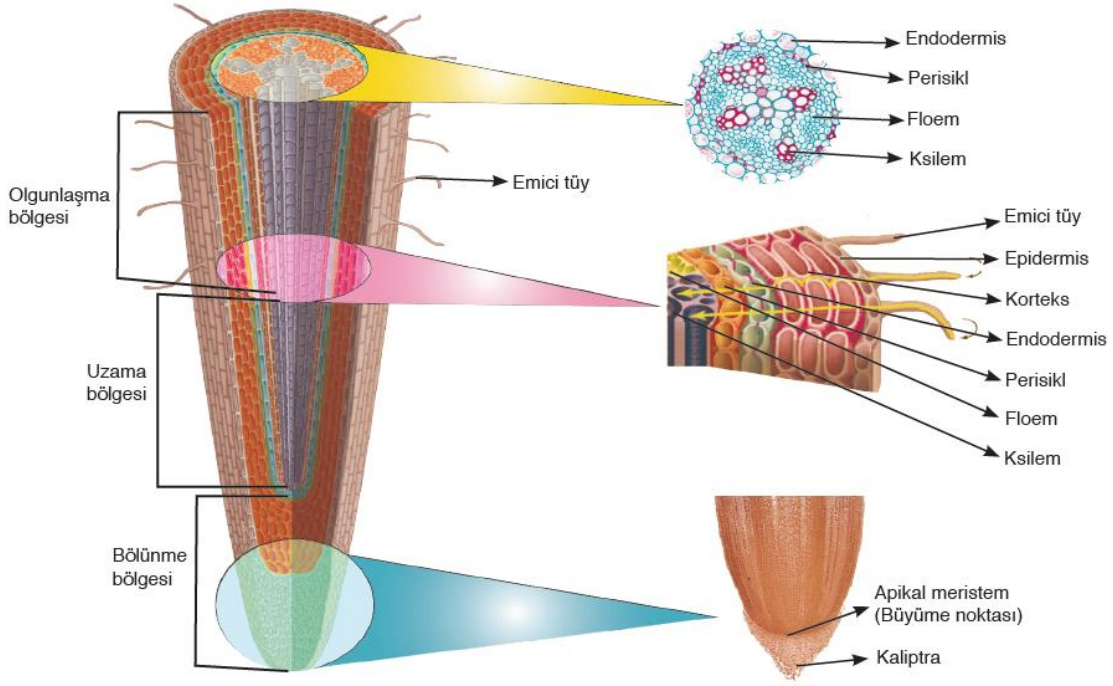
Şekil 1.2. Yerkabuğunda alüminyum bolluğu ve türleşme. (A) Toprak ve sudaki farklı Al formları. (B) Toprakta Al türleşmesi (Kisnieriené ve Lapeikaité, 2015).

Al konsantrasyonu ve Al'nin türleşmesi toprak çözeltisinin pH ve kimyasal ortamına bağlıdır. Ancak, çok zehirli bir polinükleer Al türü ($*Al_{13}$) Al'nin toplam konsantrasyonuna bağlıdır. Moleküler alüminyum (mononükleer) hidroksialüminyum olarak bulunur: $Al/Al(H_2O)_6^{3+}$, $Al(OH)^{2+,}$ $Al(OH)_2^{+}$, $Al(OH)_3$, $Al(OH)_4^{-}$. Trivalent alüminyum (Al^{+3}) en bol bulunan formudur ve pH<5'te bitki büyümesi üzerinde en büyük etkiye sahiptir. pH> 5–6'da, baskın türler olan $AlOH^{2+}$ ve $Al(OH)_2^{+}$ bitkiler için Al olarak zehirli değildir. PH nötr olduğunda, $Al(OH)_3$ veya gibbsit oluşur; ancak toksik değildir ve nispeten çözünmez. Alüminat, $Al(OH)_4^{-}$ pH bazik olduğunda (pH> 7) baskındır (Kisnieriené ve Lapeikaité, 2015).

Dünyadaki toplam arazi alanının yaklaşık %30'u ve dünyanın potansiyel ekilebilir arazilerinin %50'sinden fazlası asidiktir. Doğal ve/veya antropojenik süreçlerden dolayı toprak asidik hale gelebilir. Asitlenmenin doğal bir süreç olduğu tropik ve subtropik bölgelerin çoğu asidik topraklardan oluşur. Güney Amerika, Orta Afrika ve Güney Doğu Asyada besin kıtlığı çeken ülkelerin topraklarının %60'ı asidik özelliktedir. Aynı zamanda gübre ve asitleştirici maddelerin kullanımı ile çevre kirliliğinin yanı sıra atmosfere nitrojen dioksit (NO_2) ve kükürt dioksit (SO_2) açığa çıkaran kömür ve yağ gibi fosil enerji kaynaklarının kullanımı ile durum daha da kötüleşebilir. Oksitleyici ajanların varlığında nitrik asit (HNO_3) ve sülfürik asit (H_2SO_4) oluşumuna yol açar, böylece asit yağmurlarıyla yeryüzüne ulaşarak su ve toprağın asitlenmesini arttırır (Kochian ve ark., 2004; Viterollo ve ark., 2005; Gupta ve ark., 2013; Bose ve ark., 2015). Bu sebeplerden dolayı Kanada, Avrupa ve Amerika'nın endüstriyel topraklarının asitliği giderek artmaktadır (Viterollo ve ark., 2005). Toprak pH'sı 1980'lerden 2000'lere kadar Çin'in önemli ekin üretim alanlarında ciddi oranda azalmıştır (Guo ve ark., 2010). Türkiye'de ise Karadeniz bölgesinde aşırı yağışlardan dolayı topraktaki bazlar yıkanarak doğal asidik topraklar açığı çıkmıştır ve asiditeden dolayı en çok yetişen ürünlerden olan buğday, arpa ve mısır Al toksisitesiyle karşı karşıyadır (Vardar ve ark., 2011). Al asidik topraklarda ortalama olarak 10–100 µM aralığında bulunur (Foy, 1992; Čiamporová, 2002) ve düşük bazik doygunluğa sahip, Ca ve Mg bakımından zayıf olan topraklarda toksisite derecesi en şiddetlidir (Vitorello ve ark., 2005). Al toksisitesini önlemek için kireçleme çalışmaları yapılarak toprağın pH'sı 5-6.5 arasındaki değerlere kadar çıkarılmış ve ürün veriminde önemli artışlar sağlanmıştır (Özuygur ve ark., 1974; Lawrence ve ark., 2016). Fakat asitli topraklara uygulanan kirecin; demir, bakır, mangan ve çinko elementlerinin bitki tarafından alınımını azalttığı için toprakları fazla kireçlemenin mikro element eksikliğine yol açtığını bildirilmiştir (Shuman, 1986).

Bitkiler için birincil büyüme sınırlayıcı faktörü olan Al çoğu bitkiler için yaygın olarak toksisite göstermektedir (Sade ve ark., 2016). Al toksisitesinin, bitki gelişimi üzerinde genel belirtileri; yapraklarda morfolojik değişiklikler, toplam yaprak sayısında ve gövde kütlesinde azalma, yaprak sararması ve nekrozuna bağlı olarak fotosentetik aktivite de azalma, stoma açıklığında azalma ve kök büyüme inhibisyonuna bağlı olarak su ve bitki besin elementleri alımında azalmadır (Delhaize, 2004; Ryan ve ark., 1993;

Delhaize ve Ryan, 1995; Özyiğit ve Akıncı, 2009). Kök ucunun (kök şapkası, meristem ve uzama bölgesi) Al iyonlarının ilk hedefi olduğu, sürgün ve yapraklardan daha fazla etkilendiği ortaya çıkarılmıştır (Delhaize ve ark., 2004; Vardar ve ark., 2006). Al'nin kökten 30 dakika gibi kısa bir sürede girdiğini ve hücrede biriktiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Babourina ve Rengel, 2009).



Şekil 1.3.Bitki kökünün enine ve boyuna kesiti (https://www.fikir.gen.tr/kok-nedir-kok-cesitleri-nelerdir/)

Bitkilerde Al toksisitesinden kaynaklanan kök büyüme inhibisyonu, mineral ve suyun köklerden alınımının engellenmesi, lipid peroksidasyonu, hücre iskeletindeki değişiklikler, hücre bölünmesinin inhibisyonu gibi ciddi olumsuz etkilere sebep olmaktadır (Kopittke ve Blamey, 2016). Hücre uzamasının engellenmesi, kök büyümesinin engellenmesine neden olan erken mekanizma olarak kabul edilebilir (Ciamporová, 2002; Zheng ve Yang, 2005). Al toksisitesi ile hücre uzamasının engellenmesi, özellikle kök ucu ve lateral köklerin kalınlaşarak kahverengine dönüşmesine neden olur (Vardar et al., 2006). Al stresine uzun süre maruz kalmak hücre bölünmesinin azalmasına ve hücre iskeletinde de bozulmaya yol açar (Ciamporová, 2002). Bu nedenle, kök büyüme inhibisyonunda başlatılan çeşitli hücresel süreçlerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, bu hücre içi olaylar zincirinde Al

toksisitesinin kesin hücre içi hedefi hala açık değildir. Hücre iskeleti bileşenlerinin organizasyonu hücre bölünmesi, hücre duvarının biyosentezi ve büyüyen kök ucunun genişlemesinde oldukça etkili bir faktördür. Bu nedenle Al toksisitesi için potansiyel sitosolik hedef olarak da kabul edilmektedir (Alessa ve Oliveira, 2001; Schwarzerová ve ark., 2002; Sivaguru ve ark., 2003; Vardar ve Ünal, 2007; Gupta ve ark., 2013).

Al toksisitesinin kök hücrelerindeki hem mikrotübüllerin hem de mikrofilamentlerin organizasyonunu bozabileceği belgelenmiştir. Al iyonları, hücre iskeleti ile doğrudan etkileşim yoluyla ya da hücre iskeletinin stabilizasyonunda yer alan sitozolik Ca^{2+} düzeylerini değiştirerek, hücre iskeletinin genel dinamiklerini bozabileceği düşünülmektedir (Vardar ve Ünal, 2007; Gupta ve ark., 2013). Mikrotübüllerin düzenli çalışması hücrenin enine ve boyuna büyümesiyle yakından ilişkilidir. Boyuna uzayan hücreler, karşılıklı yerleşmiş mikrotübüllere sahiptir. Birçok araştırıcıya göre mikrotübülleri bozan ajanlar enine genişlemeyi artırdığı halde boyuna uzamayı durdurmaktadır (Ryan ve ark., 1993; Sasaki ve ark., 1996). Al toksisitesi mikrotübüllerin yapılarının bozulması ve hücre duvarı yapısındaki değişikliklere de bağlı olarak, kök uzamasının gerilemesine neden olmaktadır (Horst ve ark., 1999; Matsumoto, 2000; Alessa ve Oliveira, 2001). Al toksisitesi aynı zamanda normal hücre genişlemesi için gerekli olan kortikal mikrotübüllerin bozulmasına da neden olur. Grabski ve Schindler (1995), soya fasulyesi köklerinin uzun süreli Al muamelesi sonrasında aktin yapısının değişerek liflerin gerilimindeki artışı ortaya çıkarmışlardır. Bu nedenle, Al stresi altındaki kökte, genel morfolojik ve yapısal bozukluklar ortaya çıkmaktadır.

Al reaktif bir element olduğundan hücre duvarı, plazma membranı dahil olmak üzere birçok hücrenin birçok alt yapısıyla ya da protein enzim gibi hücre içi bileşenler ile etkileşime girerek yapılarının bozulmasına yol açar (Zheng ve Yang, 2005; Ma, 2007; Liu ve ark., 2014). Seçici geçirgen plazma zarı hücrenin dış sınırını oluşturur ve iki tabakalı bu özel yarı akışkan yapı hücre içi ve dışındaki moleküler trafiği düzenler. Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı Al^{3+} negatif yüklü plazma membran yüzeyi ile güçlü bir etkileşime girer ve bu nedenle Al^{3+} toksisitesi için ilk potansiyel hedefi oluşturmaktadır (Kinraide ve ark., 1998). Al, membran lipitlerinin peroksidasyonunu indükleyerek plazma zarının genel işlevlerini değiştirir (Horst ve ark., 1997; Massot ve ark., 1999; Vitorello ve ark., 2005; Panda ve ark., 2009).

Al, ağırlıklı olarak plazma membranının fosfolipitlerine bağlanarak yüksek derecede toksik serbest radikaller meydana gelebilir (Panda ve ark., 2009). Ca^{2+} gibi diğer katyonların aksine Al, fosfatidilkolinin'e 560 kat daha fazla afinite gösterir. Bu nedenle, Al^{3+} çift tabakalı membranın fosfolipid grupları arasında pozitif yüklü köprülerin başlangıcından sorumlu olabilecek diğer katyonlar ile aktif olarak yer değiştirebilir (Vardar ve Ünal, 2007; Gupta ve ark., 2013; Bhalerao ve Prabhu, 2013). Sonuç olarak, fosfolipitlerin yapısı, yerleşimi ve membran akışkanlığı Al toksisitesi sebebiyle değişmektedir (Kochian ve ark., 2005). Al sadece fosfolipitlerin yapısını değil, bütün olarak plazma membranının yapısını değiştirir. Bu değişiklikler sonucunda plazma membranı boyunca iyonik taşıma mekanizmaları etkilenerek hücre homeostazını bozar (Kochian ve ark., 2005). Al'nin plazma zarı ile etkileşimi, birkaç katyonun emilim oranını da değiştirerek (Örn: Ca^{+2}, amonyum (NH_4^+)) besin dengesizliklerine neden olabilir (Poschenrieder ve ark., 1995; Pineros ve Kochian, 2001; Mariano ve Keltjens, 2005). Benzer şekilde, sitoplazmaya Al'nin girişi, hidrojen (H^+), kalsiyum (Ca^{2+}) ve potasyum (K^+) gibi çeşitli katyonların homeostazisini etkiler (Bose ve ark., 2010).

Birçok bitki türünde, Al^{3+} toksisitesi dakikalar içinde sitosolik Ca^{2+} aktivitesinde sürekli bir yükselme ile dışsal düşük pH'a tepki oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu tür bir artış aynı türün Al hassas genotiplerinde aynı türün Al-dirençli genotiplerinden daha yüksek bir Al duyarlılığına sahip olması nedeniyledir (Ma ve ark., 2002; Rengel ve Zhang, 2003). Bu sitozolik Ca^{2+} yükselmesi, Al toksisitesinin ifadesinde önemli bir rol oynar, çünkü hücre yanıt elemanları, stres olmayan koşullar altında çeşitli sinyallerin neden olduğu sitosolik Ca^{2+}'daki geçici artışlara yanıt vermeyi durdurabilmektedir (Rengel ve Zhang, 2003). Örneğin, sitosolik Ca^{2+}'daki bir artış, plazmodezmata'nın kapanmasına (Holdaway-Clarke ve ark., 2000) neden olur ve Al hassas buğday köklerinde plazmodezmata aracılı hücreden hücreye taşıma engellenir. Aslında, sitosolik Ca^{2+}'da (30 dakika içinde) Al kaynaklı artış ve buğday genotiplerinde kök büyüme inhibisyonu arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir (Zhang ve Rengel, 1999), bu da Ca^{2+} homeostazisinin bozulmasının Al^{3+} toksisitesinin birincil sebebi olabileceği hipotezine yol açmıştır (Rengel ve Zhang, 2003).

Selülozdan farklılaşan 1,3- β-glukan polimerinin 1,6 dallanmasıyla oluşan kallozun kök şapkasındaki birikimi de Al toksisitesinin belirtilerinden biridir (Nichol ve ark,1993). Al tarafından katyonların yer değiştirmesi, plazma membranı yüzeyinde ß-

1,3 glukan sentaz ile kallozun sentezini uyarır (Gupta ve ark., 2013). Bitkilerde kalloz birikimi, Ca, Mg ve su alınımına engel olan bir bariyer gibi davranmaktadır (Yim ve Bradford, 1998). Kalloz oluşum hızı, plazmodesmatal bağlantılar yoluyla hücreler arası taşınmayı önleyerek hücre yıkım oranını daha da artırabilir (Sivaguru ve ark., 2000). Bu nedenle, apoplazmadaki kalloz birikimi, Al hassasiyetinin etkili bir parametresi olarak kabul edilir ve pektin içeriği ile pozitif ilişkilidir (Massot ve ark., 1999).

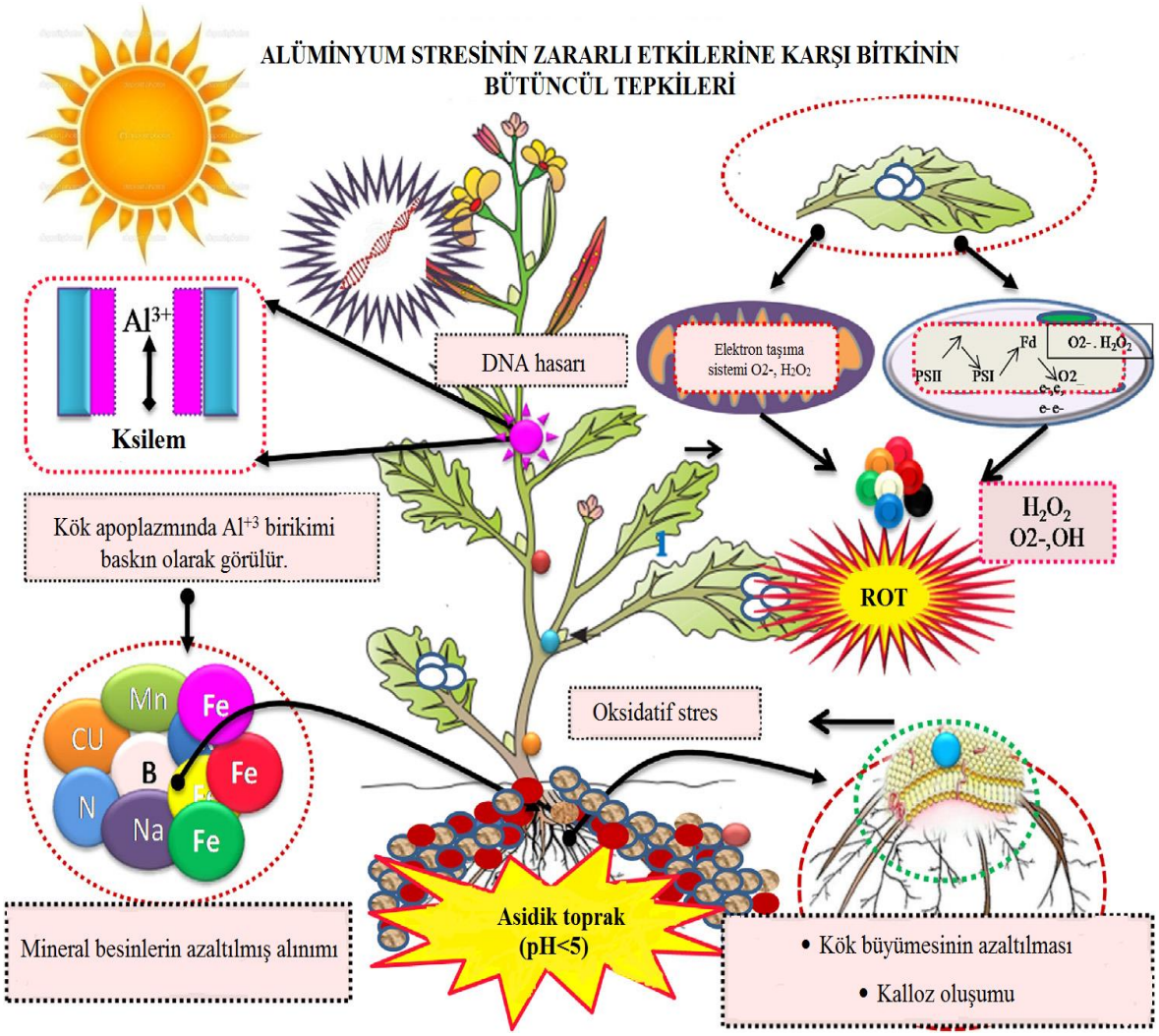
Bunların yanında Al, ATPaz enzim aktivitesini ve hücresel enerji metabolizmasını negatif şekilde etkileyerek kök solunumunu azaltır. Ayrıca hücre duvarlarında polisakkarit birikimini yöneten enzimleri inhibe eder, sitokininlerin sentezini ve taşınmasını azaltır, bitki köklerinden su ve elementlerin alımını, taşınmasını ve kullanımını engelleyerek plazma zarlarının yapısını ve işleyişini değiştirir (Kamprath ve Foy, 1971). Al bitkide sitozolik Ca^{2+} ve 1,4,5-trifosfat gibi sinyal yolaklarına da müdahale ettiği bilinmektedir (Matsumoto, 2000; Rengel ve Zhang, 2003). Örneğin, Al toksisitesinde hücre içi Ca^{2+} ve pH homeostazının bozulması, Al toksisitesinde önemli bir rol oynayan sinyal iletim yolunu tetikler (Ma ve ark., 2002). Bu transdüksiyon yolunun aktivasyonu, çok sayıda bitki organizasyon düzeyinde, Al'nin ortaya çıkan toksik etkilerini giderecek genlerin ifadesine yol açmıştır (Ma ve ark., 2002). Hücre zarında Al ile etkileşime giren muhtemel bölgeler, guanin nükleotid bağlama proteinleri (G proteinleri) ve bir fosfatidilinositol-4, 5- difosfat (PIP2) - spesifik fosfolipaz C'dir (Rengel ve Elliot, 1992; He ve ark., 2015).

Al'nin hücre içine alınmasından sonra sonra hücre içi Ca homeostazisi bozuklukları ile ilişkili olarak inositol fosfatın, özellikle de inositol-1,4,5-trifosfatın (IP3) birikimini azaltır, (Rengel ve Elliot,1992). Buna rağmen Al'nin fosforilasyon ve/veya defosforilasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Matsumoto, 2000). Protein fosforilasyonu sadece bitkilerin biyolojik aktivitelerinin dizisini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda hücre dışı uyaranlara hücrelerde aracılık etmek için bir sinyal iletim yolu sağlar (Rengel ve Elliot, 1992; Matsumoto, 2000).

Al, bitki kök hücrelerinde simplast (calmodulin), apoplast (pektin matriks) bileşenlerini, DNA'yı; hücre bölünmesi ve nükleolus ile ilgili bir dizi hücresel toksik değişikliği ve fibrillarin gibi nükleolar proteinlerin lokalizasyonu ve ekspresyonunu indükler, hücre duvarının sertliğini pektinlerin çapraz bağlanmasıyla arttırır ve çift

sarmalın artan sertliğinden dolayı DNA replikasyonunu azaltarak etkileyebilir (Zhang ve ark., 2014; Eekhout ve ark., 2017). Böylece, Al^{3+}'nın mikromolar konsantrasyonu hızlı bir şekilde kök büyümesini engelleyerek, su ve besin alımı ile ilgili sonraki bozulmalar zayıf büyümeye ve üretkenliğe yol açarak ürün verimini düşürür (Kochian 1995).

Al toksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda; Minocha ve ark. (1992) Al uygulamasının (0.2–1.0 mM) hücre bölünmesini ve hücre canlılığını inhibe ettiğini; ayrıca, Al'nin 16-24 saat içinde DNA sentezinde ciddi bir inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Matsumoto ve ark. (1977) Al'nin DNA'ya bağlanmasının hücre bölünmesinin inhibisyonu için potansiyel bir neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bennet ve ark. (1985) Al sebepli nükleusta kromatin yoğunlaşması ve yapısal değişiklikler gözlemlemişlerdir. Vardar ve ark. (2015) buğday, çavdar ve tritikalede ilk 15. dakikadan itibaren DNA hasarı meydana geldiğini komet analizi ile göstermişlerdir. Benzer şekilde Vardar ve ark. (2016) buğday, çavdar, tritikale ve arpada ilk 2 saat içerisindeki DNA fragmentasyonunu agaroz jel elektroforezinde ortaya çıkarmışlardır.



Şekil 1.4. Bitkinin Al stresine karşı oluşturduğu yanıtlara genel bir bakış (Singh ve ark., 2017).

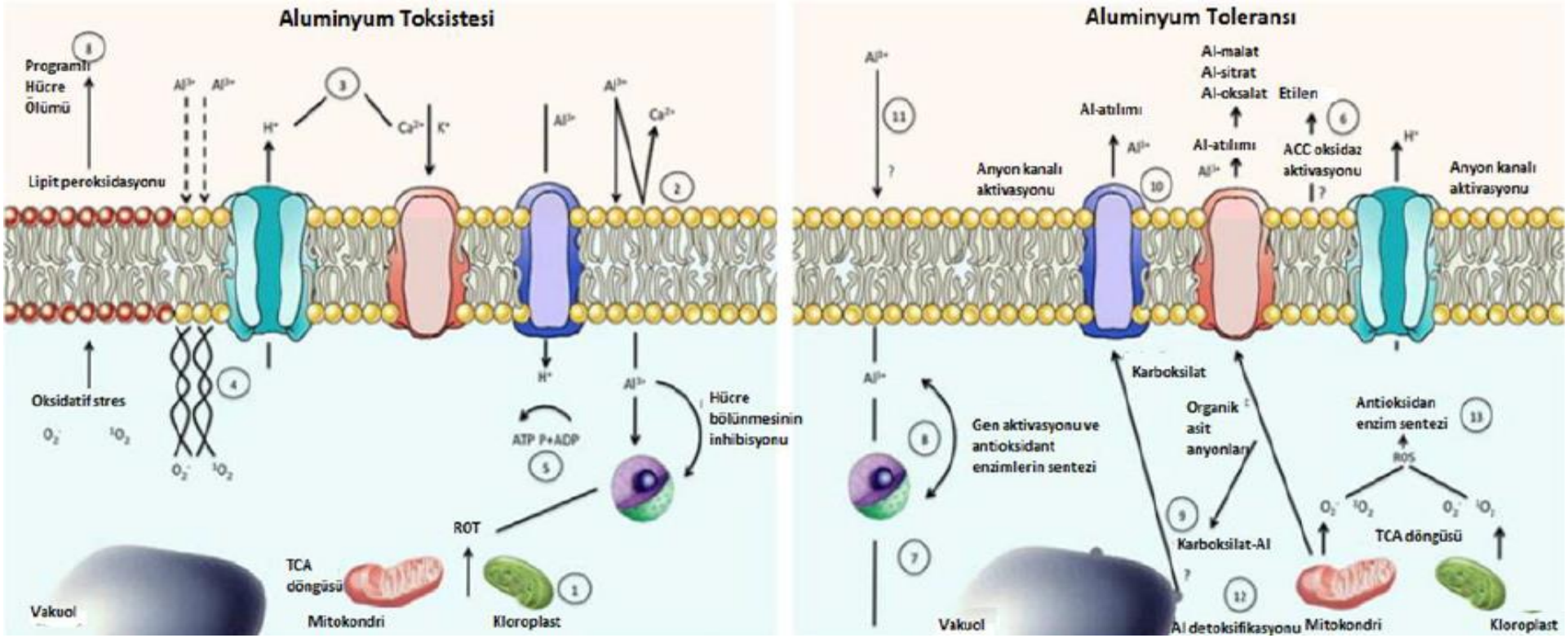
Al toksisitesi sonucunda hücre duvarı bileşenlerinin yapı ve/veya fonksiyonlarındaki (Horst ve ark., 2010), plazma membranındaki (Yamamoto ve ark., 2001), besin homeostazındaki (Delhaize ve Ryan, 1995; Gupta ve ark., 2013; Singh ve ark., 2017) ve sinyal iletim yollarındaki (Matsumoto, 2000; Ma ve ark., 2002; Sivaguru ve ark., 2003; Goodwin ve Sutter, 2009) değişiklikler Şekil 1.2'de şematize edilmiştir. Araştırmacılar, hücresel organellerde, membranlarda ve çeşitli biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olan ROT'ların artan üretimine bağlı olarak Al toksisitesinin köklerde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir (Guo ve ark., 2009; ; Ma, 2014).

Al, fosfor (P) ile toprak ve bitki köklerinde daha az mevcut ve çözünmez bir formda bağlanma eğilimindedir ve böylece bitki büyümesi için bir P eksikliği yaratır (Kochian ve ark., 2004). Bu nedenle bitkilerin yapraklarında Al toksititesi belirtileri P eksikliğine (genel bodurluk, küçük, koyu yeşil yapraklar ve geç olgunluk, sapların, yaprakların ve yaprak damarlarının morarması, yaprak uçlarının sararması ve ölümü) benzemektedir.

Bazı durumlarda, Al toksisitesi indüklenmiş Ca eksikliği veya azalmış Ca taşıma problemi olarak ortaya çıkar. Bu durum genç yaprakların kıvrılması ve büyüme noktalarının veya yaprak saplarının bozulması ile sonuçlanır. Aşırı Al, pirinç (*Oryza sativa*), darı ve buğdayda Fe eksikliği semptomlarını bile indüklemektedir (Foy ve Fleming, 1982).

İyonik yük, şelatların varlığı, pH, hücre tipi, Ca ve dış çözeltideki diğer katyon konsantrasyonları ve bitki genotipleri Al toksititesinin şiddetini belirleyen başlıca faktörler arasındadır (Gupta ve ark., 2013). Al toksisite ve tolerans mekanizmaları Al'un karmaşık kimyasal formuyla birlikte şaşırtıcı bir şekilde farklılık gösterir. Al'in karmaşık kimyası nedeniyle, moleküler, genetik ve fizyolojik esasları hala iyi anlaşılmamıştır. Bu nedenle, deney sonuçları aynı Al konsantrasyonları kullanılmasına rağmen, pH ve birlikte var olan iyonlar gibi deneysel koşullarla farklılık gösterebilir (Matsumoto, 2000).

Al toksisitesi sebebiyle, buğday (Kariuki ve ark. 2007), arpa (Tang ve ark. 2003) ve mısırın (Sierra ve ark. 2003) tarımsal üretiminin %30'dan daha fazlasının azaldığı rapor edilmiştir. Bu sebeple asit topraklarda verimliliği arttırmak için bitkide Al direnci mekanizmasının araştırılması oldukça önemlidir (Brunner ve Sperisen, 2013). Son yıllarda en çok ilgi çeken araştırma alanlarından biri de Al'ye karşı tolerant bitki türlerinin belirlenmesi ve yetiştirilmesidir (Kochian ve ark., 2005). Ayrıca Al toksisitesinin sonucu olan ürün verimliliğini sınırlandıran hasarların iyileştirilmesi için dışarıdan organik asit, fenolik bileşikler, salisilik asit ve nadiren poliaminlerin kullanımıyla ilgili de birçok çalışma vardır (Yalçın ve Vardar, 2016). Çalışmalar azalan bitki gelişmesi ve hücresel fonksiyonları iyileştirerek tarımsal ve ekonomik öneme sahip ürünlerde, verimin ve kalitenin arttırılmasını hedeflemektedir.



Şekil 1.5. Bitkide alüminyum toksisitesine yanıt ve tolerans mekanizmasının şematik gösterimi. (1) Kloroplastlarda ROT üretimi, (2) Hücre zarında pozitif yüklü iyonların Al^{+3}'le yerdeğişimi,(Ca+2 ve Al^{+3}'ün yerdeğişimi), (3) İyon kanallarında değişiklikler, (4) Hücre iskeletinde değişiklikler, (5) Hücre bölünmesinin engellenmesi, (6) Etilen sentezi, (7) Gen aktivasyonu ve ROT'ların azaltılmasında görev alan antioksidan enzimlerin sentezi, (SOD, POD vb.) (8) Programlı hücre ölümü (Apoptozis), (9) Al'nin organik asit anyonlarıyla şelatlanması, (10) Kök yüzeyine organik asit anyonlarının salınması ve Al-organik asit bileşiklerini oluşturması, (11) Al'nin hücre zarından taşınımı, (12) Al-organik asit anyonu bileşiklerinin vakuolde birikimi, (13) Antioksidan enzim sisteminin aktive olması. Soru işaretleri yolak üzerindeki bilinmeyenleri belirtmektedir (Inostroza-Blancheteau ve ark., 2012).

1.2. Al Toksisitesinin İyileştirilmesi

Doğal asidik olan veya çevresel faktörlerin etkisi ile asidikleşen topraklarda bitkiler Al toksisitesiyle karşı karşıya kalmakta ve tarımsal önemi olan bitkilerin verimliliği azalmaktadır. FAO (Food and Agriculture Organization) 'ya göre dünya nüfusunun 2050 yılında %70 daha fazla besine ihtiyaç duyacağı göz önüne alınırsa yaklaşan besin ihtiyacı probleminin üstesinden gelmek için Al toksisitesine toleranslı ıslah ürünleri yetiştirmek başarılı ve aktif bir çalışma olacaktır (Kochian ve ark., 2005). Potansiyel olarak toksik Al konsantrasyonlarının varlığında yaşayan bitkilerin, Al^{3+} iyonlarının yüksek reaktiviteleriyle birlikte hayati yapıların ve metabolik süreçlerin doğrudan temasından kaçınabilmeleri gerektiği bilinmektedir (Şekil 1.3). Al'in zararlı etkileriyle başa çıkmak için, bitki türleri genellikle Al'yi dışta tutma ve/veya iç tolerans mekanizmaları ile ilişkili olan çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir (Barcelo ve Poschenrieder, 2002; Kochian ve ark., 2005; Poschenrieder ve ark., 2008).

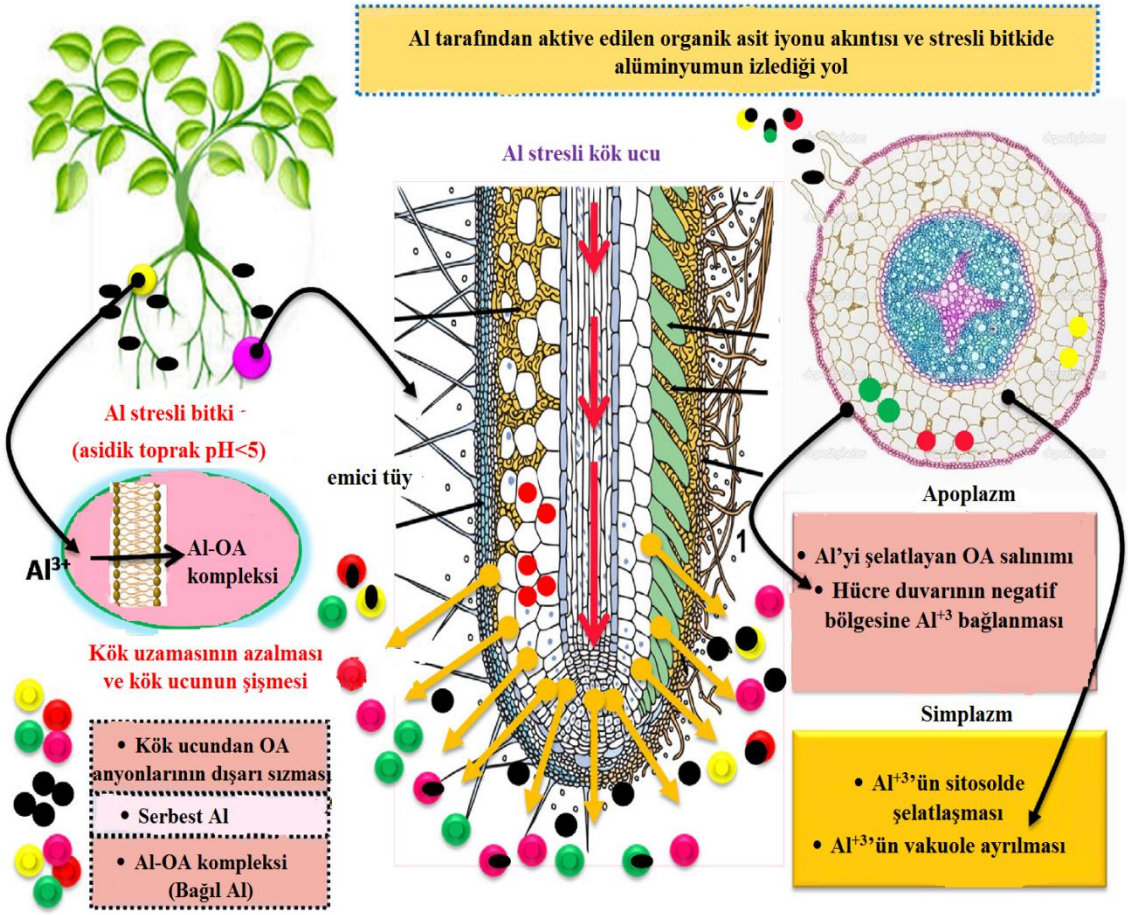
Tolerans mekanizmaları, toksik Al'nin sitoplazmada organik maddelerle zararsız Al komplekslerinin oluşturulmasını, vakuollerde biriktirilmesini (Şekil 1.4) ve üretilen fazla ROT'un antioksidanlarla daha iyi temizlenmesi gibi iç detoksifikasyon mekanizmalarını içerir (Barcelo ve Poschenrieder, 2002; Kochian ve ark., 2005; Poschenrieder ve ark., 2008).

Al iyonlarını dışlama mekanizmaları, Al'yi bağlayan ve bunun sitosol içine alınmasını sınırlayan fenolik bileşiklerin ve organik asit anyonlarının kökten salınımını içerir. Alüminyum oksijenin donör ligandları ile güçlü kompleksler oluşturma eğilimindedir. Büyük deneysel kanıtlar kök sıvılarıyla şelatlama ile kompleksleşmeyi ya da müsilaja bağlanmanın, hem apoplast hem de simplastta fitotoksik Al birikiminin önlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Barceló ve Poschenrieder, 2002).

Kökten organik asit anyonların salgılanması; bitkilerde en yaygın olarak tanımlanan Al dışlama mekanizmasıdır ve çeşitleri Al toleranslı bitki türlerine bağlı olarak değişir. Organik anyonlar, malat, sitrat ve oksalat kök tarafından salgılanır ve Al, kökü koruyan ve büyümesine izin veren toksik olmayan bir Al-OA kompleksinde (Şekil 1.4) Al şelatlanır. Malat ve sitrat, mitokondrideki trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün bir parçası olduklarında tüm bitki hücrelerinde her yerde bulunurken (Şekil 1.3), oksalat, Ca'nın düzenlenmesine ve metallerin detoksifikasyonuna katılır (Brunner ve

Sperisen, 2013). Karabuğdayda (*Fagopyrum esculentum*), Al'nin hücre içinde ve kök dışında şelatlanması için oksalat kullanır (Ma ve ark., 1998; Ma ve Hiradate, 2000; Shen ve ark., 2002; Wang ve ark., 2015a). Buğdayın malat akış mekanizması en iyi şekilde incelenmiş olup, sitrat ise Al-toleranslı mısır ve fasulyenin salgıladığı en yaygın organik asit anyonudur (Barceló ve Poschenrieder, 2002). Her üç organik asit anyonlarının salgılanması, Al-dirençli olanlarda Al-duyarlı olanlardan yaklaşık 10 kat daha fazladır. Organik asit anyonları arasında, Al^{3+}'ın en güçlü şelatörü, fotosentez yoluyla büyük miktarda sentezlenebilen sitrattır (Larsen ve ark., 1998).

Son yıllarda, Al ile aktive olan organik asit salınımına katılan genler, çeşitli bitki türlerinde tanımlanmıştır (Ma ve ark., 2014; Kochian ve ark., 2015). Moleküler yaklaşımlar, birçok bitki türündeki Al direncinin, ALMT ve MATE aileleri dahil olmak üzere OA salgılanmasında rol oynayan membran taşıyıcı proteinleri kodlayan genler tarafından düzenlendiğini ortaya çıkarmıştır (Ryan ve ark., 2011). Ayrıca, bakteri türü ABC taşıyıcı (Huang ve ark., 2009) ve antioksidan savunma genleri de (Goodwin ve Sutter, 2009; Du ve ark., 2010; Panda ve Matsumoto, 2010) bitkilerde Al toleransında rol oynamaktadır. Buğdayda yapılan çalışmalar ALMT-1 geninin, Al ile aktive edilen ve kök ucundan malatın salınmasında neden olan taşıyıcı proteinin sentezinden sorumlu gen olduğunu göstermiştir (Delhaize ve ark., 2004). ALMT-1 geninin arpaya aktarılması ile elde edilen transgenik bitkinin de, Al stresi koşullarında malat salgıladığı görülmüştür. Böylece buğday ve arpada ALMT-1 geninin Al toleransını etkileyen temel gen olduğu kanıtlamıştır. Yapılan çalışmalarda Al tarafından indüklenen ve bir sitrat taşıyıcıyı kodlayan BoMATE'nin *Arabidopsis*'te alüminyum toleransını arttırdığı gösterilmiştir. (Wu ve ark., 2014). *Arabidopsis*'te BoALMT1'in aşırı eksprese edilmesi, artan Al toleransı ve artan malat sekresyonu ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, BoALMT1'in lahanada (*Brassica olereaceae*) Al toleransında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Zhang ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Al stresli bitkilerin kök uçlarından Al tarafından aktive edilen organik asit (malat, sitrat, oksalat) salgılanması (Singh ve ark., 2017).

Farklı türler de dahil olmak üzere çeşitli karşılaştırmalı çalışmalar, Al direnci ve OA salınması miktarı arasında korelasyon olmadığını göstermiştir (Ishikawa ve ark., 2000). Bu sonuçlar organik asitlerin salgılanmasının Al'nin dışlanmasında tek mekanizma olmayabileceğini göstermektedir.

Metallere karşı bir direnç mekanizması olarak kök musilajı da önemli bir rol oynar (Morel ve ark., 1986). Musilaj, kök tepe noktasının en dış katmanlarından çıkan yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritlerden oluşan jelatinimsi bir malzemedir ve içeriğindeki üronik asit ve pektinin karboksil grupları Al gibi metalik katyonları bağlayabilir (Watanabe ve ark., 2008a,b). Al' ye dirençli fasulye (*Phaseolus vulgaris*), arpa, soya fasulyesi ve hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*) genotiplerinde, metalin dışlanması, kök şapkasının ve sınır hücrelerinin salgıladığı müsilaj ile Al'nin bağlanması ve detoksifikasyonu ile ilişkilidir (Silva ve ark., 2014).

Fenolik bileşiklerin kökten salınımı da Al'nin kök uzaması üzerindeki toksik etkilerini tersine çevirebilirler (Wagatsuma ve ark., 2001). Ayrıca, bir deprotonasyon reaksiyonu ile organik asitlerden karboksilik grupların varlığında fenolikler Al^{3+} ve organik asit anyon ligandı arasındaki etkileşimi güçlendirebilir (Driscoll ve Schecher, 1988).

Rhizosfer pH'sındaki küçük bir artış, bitkilerin kök apoplastından metalin dışlanmasıyla Al'nin çözünürlüğünü, aktivitesini, toksisitesini ve içeriğini azaltır (Yang Y. ve ark., 2011). Kabak (*Cucurbita pepo*) ve buğdayda, rizosfer pH'sındaki değişiklikler ve Al'ye bağlı strese karşı direnç, plazma zarının H^+-ATPaz'ı tarafından düzenlenmektedir (Yang ve ark., 2011).

Son kanıtlar, bazı elementlerin dışarıdan eklenmesi bitkilerde Al toksisitesini önlediğini göstermiştir. Pirinçte, NH_4^+ hücre duvarına bağlanma bölgeleri için pH değişikliğine bağlı olarak Al ile doğrudan rekabete girerek kökte Al birikimini azaltmıştır (Wang ve ark., 2015d). Benzer şekilde, mısıra silisyumun (Si) dışarıdan eklenmesi, kök uzamasının inhibisyonunu, kök ucunda alüminosilikatların oluşumu yoluyla önler (Wang ve ark., 2004). Si uygulaması bezelye ve pirinçte; kök, gövde ve yapraklarda Al içeriğinin miktarını azaltmıştır (Singh ve ark., 2011; Shen ve ark., 2014). Pek çok enzimin kofaktörü ve klorofilin merkezi bir bileşeni olmasının yanı sıra, Mg ayrıca Al dahil olmak üzere metal fitotoksisitesini de önler. Yüksek Mg (mM) konsantrasyonları hücre duvarındaki ve plazma membranındaki bağlanma yerleri ile rekabet ederek Al etkileşimini dolayısıyla Al toksisitesini önler (Rengel ve ark., 2015). Organik asit sentezi ve metabolizmasında yer alan birçok enzimin aktivasyonu için kritik öneme sahip olan Mg^{2+}'nin mikromolar konsantrasyonlarının eklenmesi, soya fasulyesinde ve pirinçte sitratın dışa salınımını artırarak Al^{3+} toksisitesini hafifletmiştir (Silva ve ark., 2001a).

Bunların yanında Pomelo'da (*Citrus grandis*) ortama bor eklenmesi ile hücresel transportun, metabolizmanın, sinyal iletiminin ve antioksidan aktivitenin modifikasyonu ile ilişkili farklı genlerin düzenlenmesi ile Al toksisitesinin önlediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015c; Zhou ve ark., 2015). Benzer şekilde, P eklenmesi, *C. grandis*'in kök büyümesi ve fotosentetik makineleri üzerindeki Al-toksisitesini önlemiştir (Jianq ve ark., 2009).

Hormonlar, salisilik asit ve poliaminler Al'nin strese karşı toleransında önemli rol oynarlar. Dışsal oksin eklenmesi, buğdaydaki kök ucunda Al birikimini azaltır ve yonca'da (*Medicago sativa*) Al'in neden olduğu kök büyümesinin inhibisyonunu hafifletir. İndol-asetik asit sitratın dışa akışını GmMATE taşıyıcının pozitif düzenlemesi ile uyarır ve plazma membranında H^+-ATPaz'nın aktivitesini fosforilasyon ile arttırır. Her iki süreç de Al-sitratın şelatlanması yoluyla ve rizosferdeki pH değişimleriyle Al stresine karşı dirençte görev alır (Wang ve ark., 2016). Ayrıca, oksin akışlı taşıyıcının (OsPin2) aşırı ifadesi, hücre duvarının sertliğini, hücre çeperine Al-bağlanmasını , oksin ve H^+'nun taşınması yoluyla Al kaynaklı oksidatif hasarı önler (Wu ve ark., 2014). Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan salisilik asit (SA), birçok metabolik ve fizyolojik olayı düzenleyerek bitki büyüme ve gelişmesini etkilemektedir (Hayat ve ark., 2010). SA'nın dışsal uygulaması, Surapu ve ark. (2014) tarafından bildirildiği gibi Al toksisitesi sırasında DNA fragmantasyonunu önlemiştir. Yalçın ve Vardar, (2016) dışsal SA uygulaması'nın kök dışında şelat oluşumuyla köklere Al alımını engellediği ve antioksidan enzimlerin aktivasyonuna bağlı Al tarafından indüklenen oksidatif hücre hasarını hafifletebildiği gösterilmiştir. Poliamin putresin (Put) ve nitrik oksit de kırmızı fasulyenin (barbunya) köklerinden sitrat salgısının düzenlenmesinde rol oynar (Wang ve ark., 2013a). Al toksisitesinin neden olduğu kök büyüme inhibisyonu, etilen üretiminin azaltılmasıyla Al toleransında önemli bir sinyal molekülü olan Put tarafından da hafifletilebilir (Wang ve ark., 2013b; Yu ve ark., 2016).

1.3 Poliaminler

Son on yılda, dünyanın çeşitli bölgelerindeki ekili araziler, ürün ekimi ve verimini engelleyen tuz, soğuk, kuraklık, UV gibi çevresel streslerden etkilenmiştir (Mahajan ve Tuteja, 2005; Rengasamy, 2006). Olumsuz çevresel faktörler nedeniyle başlıca ekinlerin verim potansiyelinin üçte ikisinin rutin bir şekilde yitirildiği tahmin edilmektedir. Bu sebeple her yıl ülkeler abiyotik streslerin neden olduğu ürün verimindeki düşüşlerden önemli miktarda para kaybedilmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005). Bu çevresel streslerin, özellikle küresel ısınma olmak üzere iklim değişikliğiyle daha yoğun ve sık hale geleceği tahmin edilmektedir. Öte yandan, dünya nüfusunun 2050 yılına kadar yaklaşık 10 milyara ulaşacağı tahmin ediliyor ve bu da ciddi gıda sıkıntılarıyla karşılaşmamıza neden olacak. Bu nedenle artan insan nüfusunu beslemek

için çeşitli çevresel faktörlere dayanıklı tolerant ürünler geliştirilmelidir. Olumsuz çevresel stres koşulları altında ürün verimliliğinin korunması muhtemelen modern tarımın karşılaştığı poliaminlerin önemli rol oynayabileceği en büyük zorluktur.

Poliaminler (PA), alifatik nitrojen yapılı fitohormon benzeri alifatik amin doğal bileşikleri grubudur ve bitkiler dahil hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunurlar. Bulgular, poliaminlerin hücre büyümesi ve gelişimi gibi birçok fizyolojik sürece dahil olduğunu ve çeşitli çevresel faktörlere karşı stres toleransına tepki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle kültür bitkilerinin poliamin biyosentetik yollarının enzimlerini kodlayan genlerle manipülasyonu kültür bitkilerine çevresel stres faktörlerine karşı daha iyi stres toleransı sağlayabilir. Dışsal PA'ların uygulaması bitkilerde stres toleransı potansiyelini arttırmak için başka bir seçenektir (Gill ve Tuteja, 2010).

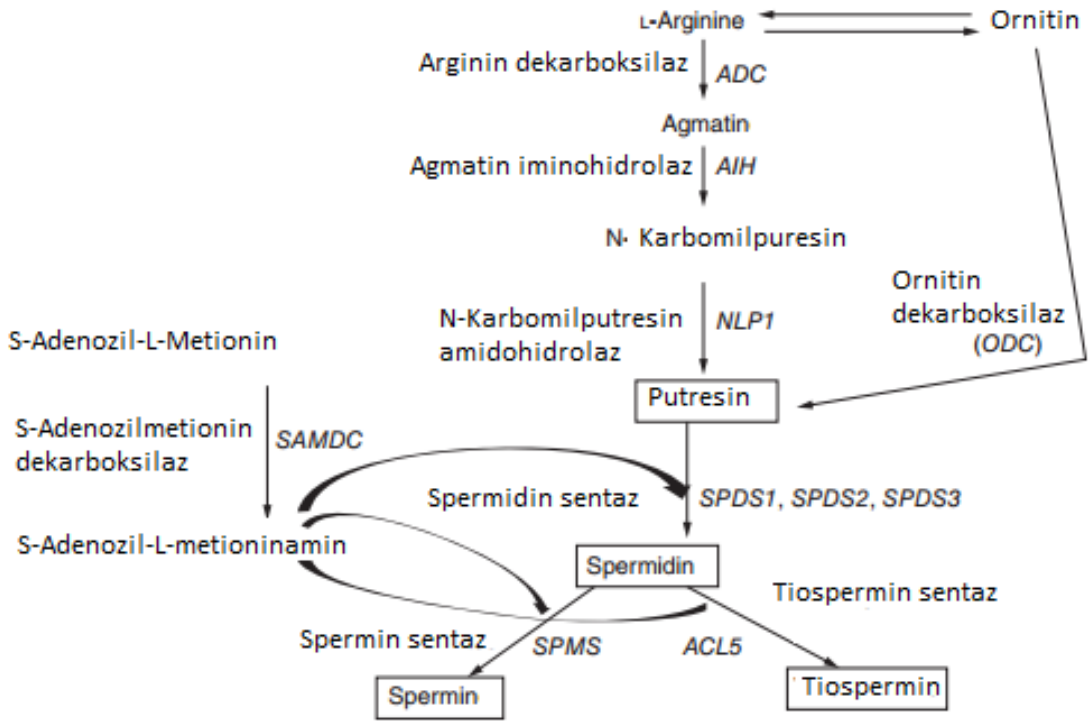
Hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan alifatik nitrojen yapılı bir grup doğal bileşik olarak bilinen Spermidin (Spd, bir triamin), spermin (Spm, bir tetraamin) ve bunların öncüsü putresini (Put, bir diamin) içeren poliaminler hücre büyümesi, gelişmesi gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynar ve çevresel streslere yanıt verir (Kusano ve ark., 2007).

PA'lar bitki de serbest olarak ya da fenolik asitlere, protein, nükleik asit gibi makromoleküller ile diğer düşük molekül ağırlıklı bileşiklere bağlı olarak bulunurlar. Birçok çalışmada, PA'ların biyosentetik enzimlerin genleri ile bitki transformasyonunun veya Put, Spd ve Spm gibi PA'ların dışsal uygulamasının çeşitli bitkilerde abiyotik stres toleransı ile sonuçlandığını göstermektedir (Kireççi, 2006).

PA'lar bitkilerde hücre bölünmesi, farklılaşma, çiçek ve meyve gelişimi, tohum çimlenmesi, gen ekspresyonu, DNA replikasyonu, protein sentezi ve apoptozu da içeren temel hücresel olaylarda düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. PA'lar farklı stres koşullarına cevap oluşturmada fonksiyon görmektedir (Takahashi ve Kakehi, 2010). PA'lar asit nötralize edici ve antioksidan özelliklerinden dolayı anti-stres ve antisenesens olarak kabul edilmektedirler (Zhao ve Yang, 2008).

PA'ların yaşlanma karşıtı etkileri birçok bitki türünde rapor edilmiştir (Takahashi ve Kakehi, 2010). PA'lar bu etkilerini, etilen sentezinin baskılanması, hücre zarı kararlılığı, lipid peroksidasyonunun önlenmesi, klorofil kaybının engellenmesi,

ROT'ların detoksifikasyonu yoluyla meydana gelebilir. Hücre yaşlanmasına (senesens) ilişkin analiz edilen en yaygın hipotez, PA ve etilen regülasyonu arasındaki ilişkidir. Hücre yaşlanmasında PA ve etilen sentezi, zamansal ve mekânsal olarak düzenlenmiştir (Pandey ark., 2000). Put, Spd ve Spm gibi ana PA'ların biyosentetik yolları Şekil 1.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Bitkilerde poliaminlerin biyosentez şeması (Matto ve ark., 2014).

Bitkilerde Diamin putresin ornithin dekarboksilaz (ODC) ile ornitinden sentezlenmektedir. Bir diğer oluşum yolu ise arjininden arjinin dekarboksilaz (ADC) sonucu oluşan agmatindir. Agmatinden iki ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda sentezlenir. (Kusano ve ark., 2008). Sonuç olarak Put doğrudan ornitin dekarboksilaz ile ornitinden, dolaylı olarak arjinin dekarboksilaz ile arjininden sentezlenir.

Put, amino propil gruplarının ilavesi ile önce spermidine sonra spermine dönüştürülür. Amino propil grupları S-adenozil metiyonin dekarboksilaz (SAMDC) tarafından katalizlenen S-adenozil metiyoninin (SAM) dekarboksilasyonundan meydana gelmiştir (Slocum ve ark.,1984). Bitkilerde poliaminlerin ve etilenin biyosentezi için S-adenosil metiyonin ortak madde olduğu bilinmektedir.

Transgenik tütünde etilen üretimi antisens teknolojisi ile bloke edildiğinde, S-adenozil metiyonin PA biyosentez yoluna yönlendirilir, böylelikle PA miktarı büyük ölçüde yükselerek stresin teşvik ettiği yaprak senesensi geciktirmiş olur (Wi ve Park, 2002). Son zamanlarda yapılan çalışmalar PA'ların yüksek ve düşük sıcaklık, tuzluluk, hipoksi, hiperosmoz, tuzluluk, atmosfer kirleticileri gibi stres faktörlerine karşı bitkilerin tolerans kazanılmasında rol oynadığını göstermektedir (Garcıa-Jimenez ve ark., 2007).

Zapata ve ark. (2014) *Beta vulgaris, Spinacia oleracea, Lactuca sativa, Cucumis melo, Capsicum annum, Brassica oleraceae* ve *Lycopersicon esculentum*'da tuzluluğun bitki gelişimi, etilen üretimi, poliamin seviyeleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. PA seviyelerinin tuzluluk ile değiştiğini ve çoğu durumda Spd ve /veya Spm'nin arttığı ancak Put'un azaldığını bulmuşlardır. Tüm türlerde tuzluluk ile (Spd+Spm)/Put oranındaki artış tuzluluk toleransını arttırmıştır. Tuzluluğa bağlı olarak farklı bitki türlerinde PA üretimi ortak bir yanıt olduğu ve etilen üretimiyle ilgili olmadığını göstermiştir.

Artan PA konsantrasyonu membranların stabilitesinin sağlanmasını, iyon dengesinin korunmasını, artan ROT'ların yok edilmesini ve antioksidan mekanizmayı çalıştıran bazı genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır (Gill and Tuteja, 2010). Put, Al toleransına dahil olan önemli bir sinyal molekülü olarak da tanımlanmasına rağmen Al'nin neden olduğu kök büyüme inhibisyonunu nasıl azalttığı henüz bilinmemektedir.

Mandal ve ark. (2013) ise *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480µM Al) Al stresine maruz bırakmışlardır. Araştırıcılar Al stresi altında artan ROT, antioksidan enzim aktivitesi ve DNA hasarını 1mM Put ile iyileştirmişlerdir. Benzer olarak Sen ve ark (2014) bir liken türü olan *Xanthoria parietina*'ya farklı konsantrasyonlarda (0.1-0.25-0.5-1mM) Al stresine maruz bırakmış ve olumsuz etkilerini 1 mM Spd ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda 1mM Spd düşük konsantrasyonlardaki Al uygulamasında klorofil miktarı ve antioksidan enzim aktivasyonu üzerine iyileşme gözlemlemişlerdir. Yu ve ark. (2015) farklı konsantrasyonlarda Al çözeltisinin buğday köklerinde hücre duvarında yaptığı bozulmaların Put ile iyileştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Devam eden süreçte yapılan yeni bir çalışmada ise araştırıcılar buğdayda Al toksisitesi sonucu ortaya çıkan kök

uzamasının inhibisyonunun, Put'in etilen biyosentezini engelleyerek iyileştirdiğini ortaya çıkarmışlardır. Burada Al dirençleri birbirinden farklı olan iki buğday genotipi kullanılmıştır. Bu iki buğday genotipinden Xi Aimai-1 Al toleranslı ve Yangmai-5 Al duyarlıdır. Al, Yangmai-5'te daha fazla kök büyüme inhibisyonuna ve Xi Aimai-1'e kıyasla kök uçlarında etilen üretiminin artmasına neden olurken etilen biyostentez inhibitörleri ile etkiler önemli ölçüde tersine çevrilmiştir. Buğday fideleri eş zamanlı olarak Al ve etilen donörlerine maruz bırakılmış etefon ya da etilen biyosentez öncüsü 1-aminosiklopropan, 1-karboksilik asit (ACC) artmış etilen üretimi ve ağırlaşan kök büyüme inhibisyonuna Xi Aimai-1'de daha belirgindir. Buna karşın Put muamelesi her iki buğday genotipinde etilen üretimini azaltır ve Al kaynaklı kök büyüme inhibisyonu hafifletir. Ve bu etkiler Yangmai-5 genotipinde daha belirgindi. Ayrıca sonuçlar Al kaynaklı etilen üretimin ACC sentaz (ACS) ve ACC oksidazın aracılık ettiğini ve Put'un ACS'yi engelleyerek etilen üretimini azalttığını göstermiştir. Tamamen, bu bulgular etilenin Al kaynaklı kök büyümesinin engellenmesinde rol oynadığını ve bu sürecin ACS aktivitesini engelleyerek Put tarafından hafifletilebileceğini göstermektedir.

Nahar ve ark. (2017) mas fasulyesinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan Al stresine karşı Spd'nin artan ROT üretimini ve oksidatif hasarı baskılayarak iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır.

Bu bilgiler ışığında ileride dünya nüfusunun daha da artacağı düşünülürse, dünyada ve ülkemizde doğal ya da antropojenik etkiler nedeniyle tarım arazilerindeki asidik toprakta çözünür hale gelen Al'nin agronomik önemi olan buğday veriminde ve kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerinin dışsal Put uygulaması ile iyileştirilmesini; amaçlıyoruz.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

2.1.1. Buğday (*Triticum aestivum* L.)'ın Genel Özellikleri ve Sistematiği

Tez çalışmamızda Al toksisitesinin yol açtığı morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal etkilerinin belirlenebilmesi için Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TBMAE-Ankara) tarafından tescillenmiş *Triticum aestivum* L. tohumunun Demir 2000 varyetesi kullanıldı. Buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumunun taksonomideki yeri (Şekil 2.1) ve Demir 2000 varyetesinin tarımsal özellikleri (Tablo 2.1) verilmiştir.



Alt âlem:	Tracheobionta (Damarlı bitkiler)
Üst bölüm:	Spermatophyta
Bölüm:	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Liliopsida (Tek çenekliler)
Alt sınıf:	Commelinidae
Takım:	Poales
Familya:	Poaceae
Alt familya:	Pooideae
Oymak:	Triticeae
Cins:	*Triticum*
Tür:	*Triticum aestivum* L.

Şekil 2.1. *Triticum aestivum* L. (buğday)'ın sistematikteki yeri.

Tablo 2.1. *Triticum aestivum* L. Demir 2000 (buğday) varyetesinin tarımsal özellikleri (TBMAE-Ankara).

Genel Özellikler	
Tescil Yılı	2000
Morfolojik Özellikleri	Beyaz başaklı, kılçıklı, kırmızı sert taneli, orta boylu bir çeşittir.
Tarımsal Özellikleri	Alternatif gelişme tabiatlı ve orta geççidir. Soğuğa, kurağa ve yatmaya mukavemeti yüksek, tane dökmeyen ve harman olma kabiliyeti iyi olan bir çeşittir. Gübreye tepkisi yüksektir. Destek sulu şartlarda yüksek tane ve sap verimine sahiptir.
Verim Özellikleri	Orta Anadolu Bölgesi ve Geçit Bölgelerinde kuru şartlarda 350-400 kg/da, destek sulu şartlarda 500 – 600 kg/da
Teknolojik Özellikleri	1000 tane ağırlığı 34 - 37 gr
Protein Oranı	%12-15
Hastalık Durumu	Sarı pasa dayanıklı, sürme için ilaçlanmalı.
Ekimi Tavsiye Edilen Bölgeler	İç Anadolu ve Geçit bölgelerinin buğday tarımı yapılan taban alanlarına ve destek sulama yapılan alanlarına ekimi önerilmektedir.

2.1.2 Buğday Tohumlarının Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

TBMAE-Ankara'dan temin edilen buğdayların görünüşü düzgün ve birbiri ile özdeş olanları sterilizasyon için ticari çamaşır suyu %1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisinde yaklaşık 10 dakika bekletildi. Buğday tohumları daha sonra distile sudan geçirildi. Otoklavda steril edilmiş her bir petri kabının (15cm) içine nemlendirilmiş kağıt ve distile su konularak 20 adet buğday tohumu yerleştirilerek 36 saat çimlenmeye bırakıldı. 36 saat sonunda çimlenen tohumlardan çalışma materyali olarak yaklaşık 0.5-1cm boyundaki buğday kökleri seçilmiştir.

2.1.3 Putresin ve Alüminyum Çözeltisi Uygulama İşlemi

Buğday köklerinden alınan yaklaşık 0.5-1 cm uzunluğundaki parçalara daha önceki çalışmaların öncülüğünde belirlenen konsantrasyonlarda (0.5mM, 1mM) Put ve (100µM) Al çözeltileri uygulandı ve 6 çalışma grubu oluşturuldu (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Çalışma gruplarının hazırlanması.

Çalışma grubu	**Konsantrasyon**
Kontrol grubu	Distile su
Pozitif kontrol grubu	0.5 mM Put
	1 mM Put
Uygulama grubu	100 µM $AlCl_3$
İyileştirme grubu	0.5 mM Put + 100 µM $AlCl_3$
	1 mM Put + 100 µM $AlCl_3$

Uygulamaya geçilmeden önce stok ve çalışma çözeltileri hazırlandı (Tablo 2.3). Tüm stok ve çalışma solüsyonları kullanılana kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı. Petri kaplarına stoktan seyreltilerek hazırlanmış çözeltiler buğday fidelerinin üzerini kapatacak şekilde eklendi. Kontrol-uygulama grupları ve analiz çalışmaları en az 3 kere tekrarlandı. Kontrol-uygulama gruplarındaki çözeltiler gün aşırı yenilendi.

Tablo 2.3. Uygulamada kullanılacak stok ve solüsyonların elde edilmesi.

Çözelti adı	**Konsantrasyon**	**Hazırlama İşlemleri**
Stok Put Çözeltisi	10 mM	0.162 gr Put alınıp 100 ml distile su ile tamamlandı.
Putresin Çalışma Çözeltileri	0.5 mM	25 ml stok putresin alınıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
	1 mM	50 ml stok putresin alınıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
Stok $AlCl_3$ Çözeltisi	100 mM	100 ml distile suya tamamlanacak şekilde içerisinde 13.334 gr $AlCl_3$ çözüldü.
$AlCl_3$ Çalışma Çözeltisi	100 µM	Stok alüminyum klorür çözeltisinden 1ml alınıp 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti pH'sı 4.5 ayarlandı.
Putresin ve $AlCl_3$ Çalışma Çözeltileri	0.5mM Put+ 100µM $AlCl_3$	25 ml stok putresin alınıp 500 ml'ye 100 µM $AlCl_3$ ile tamamlandı.
	1mM Put+ 100µM $AlCl_3$	50 ml stok putresin alınıp 500 ml'ye 100 µM $AlCl_3$ ile tamamlandı.

2.2 Araştırma Yöntemleri

2.2.1. Morfolojik Yöntemler

2.2.1.1 Buğday Kök Uzunluğu

Çimlendirilmeye bırakılan buğday köklerinin herhangi bir uygulamaya tabii tutulmadan 36. saatte uzunluk ölçümleri yapıldı. 96 saat sonunda kontrol ve uygulama

gruplarındaki buğday köklerinde ölçümler tekrarlandı. Put ve Al uygulamalarının buğday köklerine etkilerini kontrol grubu ile karşılaştırmak için kök uzunlukları aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı (Schildknecht ve De Campos Vidal, 2002).

$$\text{Kök Uzunluğu}=\left(\frac{(Kk-K\ddot{o})}{Kk}\right)*100$$

K_k: 36 saatlik kök uzunluğu

$K_{\ddot{o}}$: 96 saatlik kök uzunluğu

2.2.2 Sitokimyasal Yöntemler

2.2.2.1 Buğday Köklerinde Al^{+3} İyon Miktar Tayini

Buğday köklerinde Al^{+3} iyonlarının miktarının tespiti için hematoksilen ile Ownby (1993) yöntemine göre boyama yapıldı. Öncelikle kontrol ve uygulama grubundaki kökler yüzeye tutunmuş Al iyonlarının uzaklaştırılması için 10 dakika boyunca akan suyun altında bekletildi. Daha sonra kontrol ve uygulama gruplarına ait 10'ar adet kök önceden hazırlanmış %2'lik hematoksilen (Tablo 2.4) içeren solüsyon içinde boyanmaya bırakıldı. Boyanan köklerdeki fazla boyayı uzaklaştırmak için 10 dakika akan suda bekletildi. Sonraki aşamada kök uçlarından yaklaşık 1cm'lik parçalar kesilerek yeni tüplere alındı ve üzerine 4ml 1N hidroklorik asit (HCl) eklenerek bir saat bekletildi. Tüplerin içerisindeki solüsyonlarda bulunan kökler pens yardımıyla alındı ve geri kalan solüsyonlar 490 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapıldı. Kontrol ve uygulama gruplarındaki absorbans değerleri karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Tablo 2.4. Hematoksilen ve KIO_3 bulunan çözeltinin hazırlanışı.

Çözelti adı	Konsantrasyonu	Hazırlama İşlemleri
Hematoksilen	%2	2gr toz haldeki hematoksilen tartılıp 100ml distile su içerisinde çözülür. Karanlıkta muhafaza edilir.
KIO_3	%0.02	Hematoksilen çözeltisine toz olan 0.02gr KIO_3 eklenir ve manyetik karıştırıcıda çözülür. Koyu renk şişede ve +4 °C'de muhafaza edilir.

2.2.2.2 Plazma Membranının Bütünlüğünün Bozulması

Al toksisitesinin sebep olduğu buğday kök hücrelerindeki hasar miktarı Schützendübel ve arkadaşlarının (2001) yöntemine göre tespit edildi. Buğday köklerinde hasarın tespiti kontrol ve uygulama gruplarına %0.25'lik Evans mavisi çözeltisi (Tablo 2.5) uygulandı. Kontrol ve uygulama grubundaki buğday kökleri 1.5-2 cm uzunluğundaki kısmı boya içinde yarım saat bekletildi. Köklerdeki fazla boyayı uzaklaştırmak için distile suda biraz bekletilip çalkalandı. Sonraki aşamada kontrol ve uygulama gruplarındaki köklerden 1cm'lik parçalar kesilip, 1.5ml %1 SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren havanda homojenize edildi. Havandaki homejenatlar santrifüj tüplerine alındı ve 10 dakika, 13.500 g 'de santrifüj edildi. Daha sonra tüplerden alınan süpernatantlardan spektrofotometre de 600nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kontrol ve uygulama gruplarındaki absorbans değerleri karşılaştırılarak analiz edildi.

Tablo 2.5. Evans blue (Evans mavisi) çözeltisinin hazırlanışı.

Çözelti adı	Konsantrasyon	Hazırlama İşlemleri
Evans mavisi	%0.25	100 ml distile su içerisinde 0.25 gr toz haldeki Evans mavisi tartılıp çözüldü. Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edilir.

2.2.2.3. Mitotik İndeks ve Kromozom Anormalliklerinin Tespiti

Kontrol ve uygulama gruplarındaki buğday köklerinin ucundan 0.5-1 cm uzunluğunda parçalar kesilerek 24 saat boyunca 1:3 oranında CH_3COOH (asetik alkol) içerisinde bekletildi. Boyanan kök uçları %96, %70'lik alkol içerisinde ayrı ayrı 2 kez çalkalandı ve %70'lik alkol bulunan küçük şişelerde buzdolabında +4 °C'de saklandı. İnceleme yapılacağı zaman %70'lik alkolden çıkarılan kök uçları 1N HCI içerisinde 60°C'de 18-20 dakika hidroliz edildi. Hidroliz sonrasında kök uçları karanlık ortamda 1.5-2 saat bazik fuksin boyasında bekletildi. Bazik fuksinden alınan kökler lam üzerine yerleştirilip aseto-orsein damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak ezildi (Tablo 2.6). Her bir kontrol ve uygulama grubu için yaklaşık 1500-2000 hücre sayıldı (Huyluoğlu ve ark., 2008) ve mitotik indeks yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Kromozom bozuklukları ve bölünme geçiren hücreler 100× büyütmede, Olympus BX-51 mikroskobunda tespit edildi. Kromozom fotoğrafları, KAMERAM dijital fotoğraf makinesi ile çekildi ve KAMERAM yazılım programında analizi gerçekleştirildi.

$$\text{Mitotik indeks} = \frac{\text{Bölünen hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

Tablo 2.6. Aseto-orsein ve bazik fuksin çözeltilerinin hazırlanışı.

Çözelti adı	**Konsantrasyon**	**Hazırlama işlemleri**
Aseto-orsein	%2	45 ml kaynar asetik asit içerisinde 2gr aseto-orsein çözülüp distile su ile 100ml tamamlanır.
Bazik fuksin		15ml 1N HCl içerisinde 0.5 gr pararosanilin klorid çözülür ve 0.5 gr sodyum metabisülfit 85ml distile su ile hazırlanan çözelti ile karıştırılır. Karışım koyu renk şişede +4 °C'de muhafaza edilir.

2.2.3. Biyokimyasal Yöntemler

2.2.3.1. Buğday Köklerinde Peroksidaz (POD) Aktivite Tayini

Buğday köklerinde peroksidaz aktivite tayini Birecka ve arkadaşlarına (1973) göre belirlendi. Her bir gruptaki buğday köklerinin uç kısmından yaklaşık 1 cm parçalar alındı, hassas terazide tartıldı. Kontrol ve uygulama gruplarındaki her bir 100 mg örnek için pH'sı 7.0, 1ml 0.1 M ekstraksiyon (fosfat) tamponu ilave edilerek buz üzerine yerleştirilen soğuk havanlarda ayrı ayrı özütü çıkarıldı. Daha sonra etiketli 2ml'lik epondorf tüplere aktarılan örnekler soğutmalı santrifüjde 11.000 rpm'de +4 °C'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra enzim kaynağı olan üst sıvı sterilize edilmiş ependorflara aktarıldı ve spektrofotometrede ölçüm yapılana kadar buz içerisine yerleştirilip bekletildi. Spektrofotometrede kör olarak örnek içermeyen ölçüm tamponu kullanıldı (Tablo 2.7) ve okutuldu. Kontrol ve uygulama grupları için ölçüm yapılırken 3ml'lik kuvarz tüplere ölçüm tamponu içine 20 µl örnek eklendi. Hızlıca ters düz edilen tüplerin 470nm'de köre karşı 10'ar saniyede bir 2dk boyunca spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Her bir grup için 3 kez ölçüm yapıldı. Absorbans değerleri ΔA/gTA.Dakika şeklinde hesaplandı.

Tablo 2.7. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan fosfat ve ölçüm tamponlarının hazırlanışı.

Çözelti adı	**Hazırlama İşlemleri**
Fosfat (Ekstraksiyon) tamponu	**Stok A:** 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ **Stok B:** 0.2 M $Na_2HPO_4.7H_2O$. 39 ml stok A ile 61 ml stok B alınarak 200ml'ye tamamlandı. Hazırlanan fosfat tamponunun pH'sı 7, konsantrasyonu 0.1 M'dır.
Ölçüm tamponu	**Stok A:** 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ **Stok B:** 0.2 M $Na_2HPO_4.7H_2O$. 46 ml stok A ile 4 ml stok B alınarak 100ml'ye tamamlandı. Hazırlanan fosfat tamponunun pH'sı 5.8'dir. Fosfat tamponunun içerisine, 600 µl substrat guaiacol ve 300 µl H_2O_2 eklendi. 100 ml ölçüm tamponundaki son konsantrasyonları 5 mM ve 15 mM'dır ve tampon taze olması için her çalışmada yeniden hazırlanır.

2.2.3.2. Buğday Köklerinde Süperoksit Dismutaz Aktivite (SOD) Tayini

Buğday köklerinde süperoksit dismutaz aktivitesi tayini Çakmak ve Marschner (1992) göre yapıldı. Her bir gruptaki buğday köklerinin uç kısmından yaklaşık 1 cm parçalar etiketlenen tüplere alınarak -80°C saklandı. Uygulama içinde -80°C'de saklanan örnekler kullanıldı. Kontrol ve uygulama gruplarındaki her bir 100 mg örnek tartılarak ph'sı 7.0, 1ml 0.1 M ekstraksiyon tamponu (Tablo 2.8) ilave edilerek buz üzerine yerleştirilen soğuk havanlarda ayrı ayrı homojenize edildi. Havandaki homojenatlar etiketlenen 2ml'lik epondorf tüplere aktarıldı ve soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra enzim kaynağı olan üst sıvı sterilize edilmiş etiketli ependorflara aktarıldı. SOD aktivitesinin belirlenebilmesi için 3µl örnek, 3 ml ölçüm tamponu (Tablo 2.9) ile karıştırılarak 0.2mM riboflavin son konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde eklendi. 15 W'lık floresan ışıkta tüplerde renk değişimleri görülene kadar bekletildi. Pozitif ve negatif kontrol gruplarına örnek yerine sadece fosfat tamponu eklendi. Negatif kontrolün bulunduğu tüp alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta tutuldu ve kör olarak kullanıldı. Pozitif kontrol ve örnek içeren tüpler ise floresan ışık altında tamponun rengi koyu mavi-lacivert renge dönüşene kadar bekletildi. Bekleme süreci kronometre ile ölçüldü ve 560nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Ölçülen absorbans değerlerinden aşağıdaki formül yardımıyla % inhibisyon değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \{(\text{Örnek } \Delta_{560} - \text{Kör } \Delta_{560}) \times 100\} / (\text{Pozitif kontrol } \Delta_{560} - \text{Kör } \Delta_{560})$$

Tablo 2.8. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan ekstraksiyon tamponunun hazırlanışı.

Çözelti adı	Hazırlama İşlemleri
Ekstraksiyon tamponu	**Stok A:** 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ **Stok B:** 0.2 M $Na_2HPO_4.7H_2O$. 39 ml stok A ile 61 ml stok B alınarak konsantrasyonu 0.1mM olacak şekilde EDTA ve 4gr polivinilpirolidon eklendi. Hazırlanan karışım +4 °C'de muhafaza edilir.

Tablo 2.9. Süperoksit dismutaz aktivitesi için ölçüm tamponu hazırlanışı.

Bileşenler	Stok	Stoktan alınan miktar	Son konsantrasyon
Fosfat tamponu	100 mM	1.5 ml	50 mM
Sodyum karbonat	2 M (8.40 gr alınıp 50ml'ye tamamlanır)	75 µl	50 mM
EDTA	0.5 M (9.30 gr alınıp 50ml'ye tamamlanır)	0.6 µl	100 µM
L-methionine	300 mM (2.23 gr alınıp 50ml'ye tamamlanır)	129.9 µl	13 mM
NBT	7.5 mM (0.3gr alınıp 50ml'ye tamamlanır)	30 µl	75 µM
Distile su	-	1.265 ml	-

2.2.3.3. Buğday Köklerinde Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Buğday köklerinde katalaz aktivite tayini Cho ve arkadaşlarının (2000) yöntemine göre yapıldı. -80 °C'de saklanan her bir gruptaki örneklerden 100 mg alınıp 1ml 0.1 M ekstraksiyon tamponu (pH 7) ilave edilerek buz üzerine yerleştirilen soğuk havanlarda ayrı ayrı homojenize edildi. Homojenatlar etiketlenen 2 ml'lik epondorf tüplere aktarıldı ve soğutmalı santrifüjde 18.000 g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra elde edilen süpernatantlar etiketlenen steril epondorflara alındı. CAT enziminin aktivitesinin belirlenebilmesi için fosfat tamponu, hidrojen peroksit ve distile su Tablo 2.10'da belirtilen konsantrasyonlarda epondorfa aktarıldı ve vortekslendi. Daha sonra epondorf 30 °C'de 3dk bekletildi. Spektrofotometrede kör olarak örnek içermeyen ölçüm tamponu kullanıldı ve okutuldu. Kontrol ve uygulama grupları için ölçüm yapılırken kuvarz tüplere önce 1ml ölçüm tamponu alınarak üzerine 25 µl süpernatant eklendi ve 240 nm'de 2 dk boyunca 10 saniyede bir kinetik ölçüm yapıldı. Her bir grup için 3 kez ölçüm yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri ΔA240/(protein(mg) x dakika) formülü kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2.10. Katalaz ölçüm tamponunun hazırlanışı.

Bileşenler	**Stok**	**Stoktan alınan miktar**	**Son konsantrasyon**
Fosfat tamponu	200 mM	100 µl	20 mM
H_2O_2	72 mM	83.5 µl	6 mM
Distile su	-	791.5 µl	

2.2.3.4. Buğday Köklerinde Lipit Peroksidasyonu Tayini

Buğday köklerinde lipid peroksidasyonu analizi MDA (malondialdehit) içeriği hesaplanarak Çakmak ve Horst (1991) yöntemine göre -80 °C'de saklanan her bir gruptaki örneklerden ayrı ayrı 0.2 gr tartılarak, 1ml %0.1 trikloroasetik asit (TCA) ile buz üzerindeki soğuk havanda ekstre edildi. Havandaki özütler mikrosantrifüj tüplerine alınarak soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 12.000 rpm hızında 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra elde edilen üst sıvı MDA kaynağı olup lipid

peroksidasyonunun ölçütü olarak kullanıldı. Her gruptaki üst sıvıdan 250 µl örnek tüplere alınıp içerisine 1ml %20'lik TCA'da çözünmüş %0.6 tiobarbitürük asit (TBA) ilave edildi. Hazırlanan tüplerin kapakları gaz çıkışı sebebiyle ince bir iğne yardımıyla delinip ısıtma tablasında 95 °C'de 30 dakika bekletildi. Isıtma tablasından alınan tüpler hızla soğuması için buz banyosunda 30 dakika bekletildi. Tüpler 12.000 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvının 532 ve 600nm'de absorbans değerleri ölçülerek aşağıdaki formül yardımı ile lipid peroksidasyonu hesaplandı.

$$MDA= (\Delta 532 - \Delta 600)/1.56 \times 10^5$$

2.2.4 İstatistiksel Analizler

Kontrol ve uygulama gruplarına ait deney gruplarından elde edilen biyokimyasal parametrelerin Excel programında (Microsoft Office 2010) ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Elde edilen deneysel veriler SPSS 13.0 paket programında bağımsız grup T testi $p<0,05$ düzeyinde (%5) anlamlılık oranı dikkate alınarak hesaplama yapıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

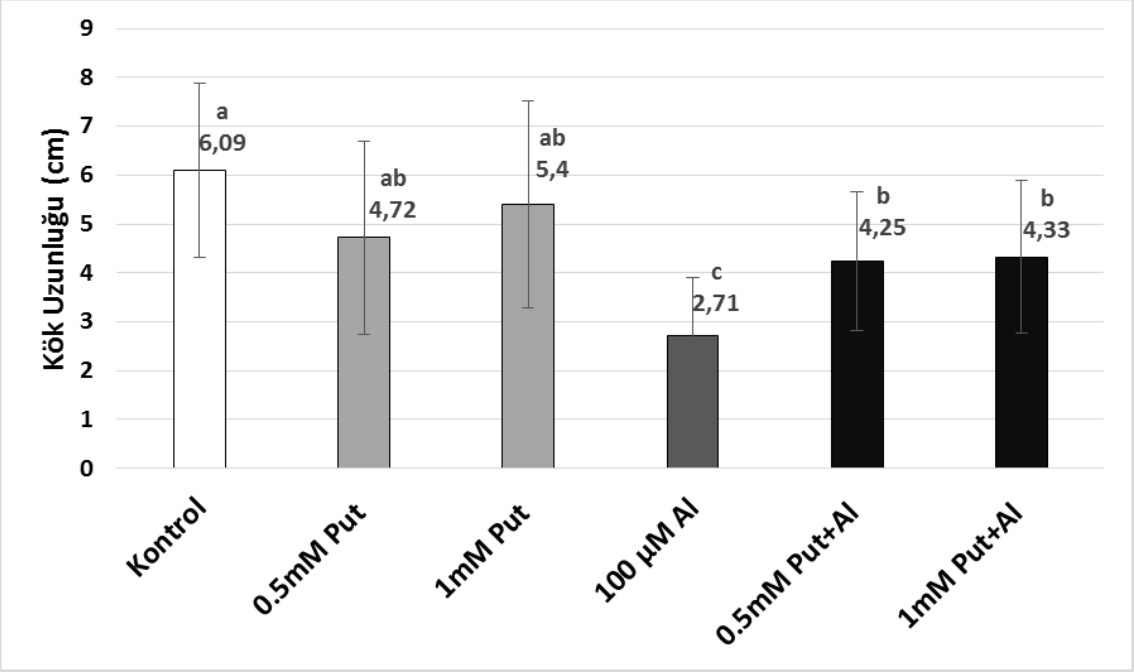
3.1 Morfolojik Yöntemler

3.1.1 Buğday Kök Uzunluğu:

Al toksisitesi kök morfolojisindeki büyük değişikliklerle ilgili olup (Ciamporová, 2002) en belirgin işareti, 30 dakika ile 2 saat arasında Al'in mikromolar konsantrasyonlarında bile tespit edilebilen kök büyümesinin engellenmesidir (Barceló ve Poschenrieder, 2002). Bu sebeple çalışmamızda negatif, pozitif kontrol, Al, Al+Put gruplarındaki kök uzunlukları yüzdeleri tespit edildi.

Uygulama öncesinde distile suda çimlendirilmiş (36 saat) buğday köklerinin uzunlukları ölçüldü. 1-1.5 cm kök uzunluğuna sahip yaklaşık 30 tohum distile su içeren negatif kontrol, Put içeren pozitif kontrol, Al ve Al+Put uygulama gruplarında 96 saat boyunca bekletildi. 96 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarındaki tohumların kök uzunluğu ölçümü yapıldı. Yapılan ölçüm sonucuna göre pozitif kontrol gruplarında, 0.5

mM Put grubunda %77.5 ve 1 mM Put grubunda %88.7 büyüme yüzdesiyle kök uzunluklarının kontrol grubuna en yakın değerde oldukları tespit edildi. Diğer uygulama gruplarındaki kök uzama yüzdeleri sırasıyla 100µM $AlCl_3$ grubunda %44.5, 0.5mM Put+$AlCl_3$ grubunda %69.8, 1 mM Put+$AlCl_3$ grubunda %71.1'dir. Put ve Al uygulama grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Al+1mM Put grubunun kök uzaması üzerindeki iyileştirici etkisinin Al+0.5 mM Put grubuna göre daha fazla görünsede arada istatistiksel anlamda belirgin bir fark yoktur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde % kök uzunluklarına ait grafik.

Xu ve ark. (2012); Yangmai-5 (Al-duyarlı) ve Jian-864 (Al-toleranslı) iki buğday genotiplerinin köklerine 24 saat boyunca 30 µM Al uygulamış ve her iki genotipin kök uzunluğunda azalma rapor edilmiştir.

Mandal ve ark. (2013); *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480 µM Al) Al uygulamış ve 480µM Al'nin toksik etkilerini 1mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. 480µM Al+1 mM Put uygulamasının Al'nin en yüksek konsantrasyonunda azalan büyüme oranını 1.6 katına geri kazandırarak iyileştirdiğini göstermişlerdir.

Yu ve ark. (2016); Xi Aimai-1 (Al toleranslı) ve Yangmai-5 (Al duyarlı) buğday genotiplerinde 30μM $AlCl_3$'ün neden olduğu kök uzama inhibisyonunu 0.5, 1, 2, 5 ve 10 mM Put uygulaması ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Putresinin tüm konsantrasyonları Al-kaynaklı kök uzama inhibisyonu üzerinde doza bağımlı bir iyileşme gösterdiği, en olumlu etkinin de 2 mM Put konsantrasyonunda Al duyarlı buğdayda, Al toleranslıya göre daha belirgin olarak tespit etmişlerdir. Her iki genotipte sadece 2 mM Put uygulamasının kök uzamasını bir miktar azalttığı rapor edilmiştir.

Nahar ve ark. (2016); Maş fasulyesinin kökleri ve sürgünlerine 1.5 mM $CdCl_2$ uygulamış ve Cd'nin toksik etkilerini Put ve/veya SNP (sodium nitroprusside) ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Maş fasülyesinin kökleri ve sürgünlerinde 1.5 mM $CdCl_2$ uygulamasına bağlı olarak sürgünle karşılaştırıldığında kökte Cd birikiminin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Put ve / veya SNP ile yapılan uygulamaların köklerde %59 ve sürgünlerde %93 oranında Cd birikimini azalttığı, en yüksek koruyucu (iyileştirici) etkinin ise 0.2 mM Put ve 1 mM SNP ile birlikte yapılan uygulamalarda gösterildiği belirtilmiştir.

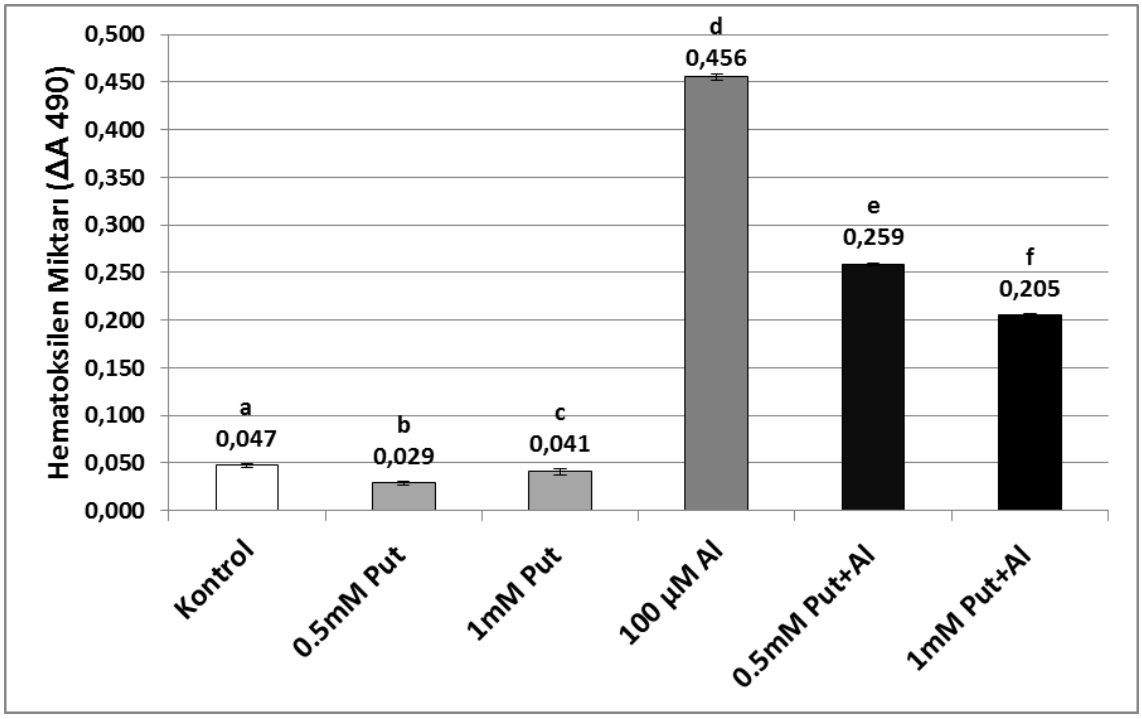
Nahar ve ark. (2017); Mas fasülyesinde 0.5 mM Al toksisitesi kök büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Al uygulamasından 48 ve 72 saatinden sonra, kök büyümesi, sırasıyla, % 31 ve % 35 oranında azalırken, sürgün büyümesi, aynı stres maruziyetinden sonra % 22 ve % 24 azalmıştır. Kök ve sürgün büyümesinin azaltılması fide kuru ağırlığında azalma ile sonuçlanmıştır. Dışsal spermidin uygulaması (0.3 mM Spd) ile Al toksisitesi sonucu azalan kök ve sürgün büyümesi ile fidelerin kuru ağırlığında iyileşme tespit edilmiştir.

3.2. Sitokimyasal Yöntemler

3.2.1 Buğday Köklerinde Al^{+3} İyon Miktar Tayini

Al iyonları bitki de en çok kök ucunda biriktirilir. Yapılan araştırma sonuçlarına göre Al^{+3} iyonları kök uçlarındaki korteks tabakasında yer alan epidermis ve parankima hücreleri tarafından alınmaktadır (Vardar ve ark., 2011). Al'ye maruz kalan köklere uygulanan hematoksilen boyama yöntemi ile Al^{+3} iyonunun miktarı tayin edilebilir. Bu yöntemde hematoksilen adı verilen boya mordant gibi davranarak Al, demir, kurşun gibi metalleri bağlayabilir. Al iyonları da hematoksilen tarafından bağlanarak mavi-mor renkli hemateine okside olur.

Çalışmamızda bu yöntemi kullanarak, kontrol ve uygulama gruplarına ait buğday kökleri hematoksilen ile boyandı ve bağlanan boya miktarları spektrofotometre ile ölçüldü. Yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre; Al birikimi bakımından kontrol ve 0.5 mM – 1 mM Put grubunda arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Al alınımı 100 µM $AlCl_3$ grubunda 9.7 katına, 0.5 mM Put+$AlCl_3$ grubunda, 5.5 katına ve 1 mM Put+$AlCl_3$ grubunda ise 4.36 katına çıkmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar kontrolle karşılaştırıldığında 1 mM Put+$AlCl_3$ grubu, 0.5 mM Put+$AlCl_3$ grubuna göre Al alınımının engellenmesinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde Al^{+3} iyonu birikiminin grafiği

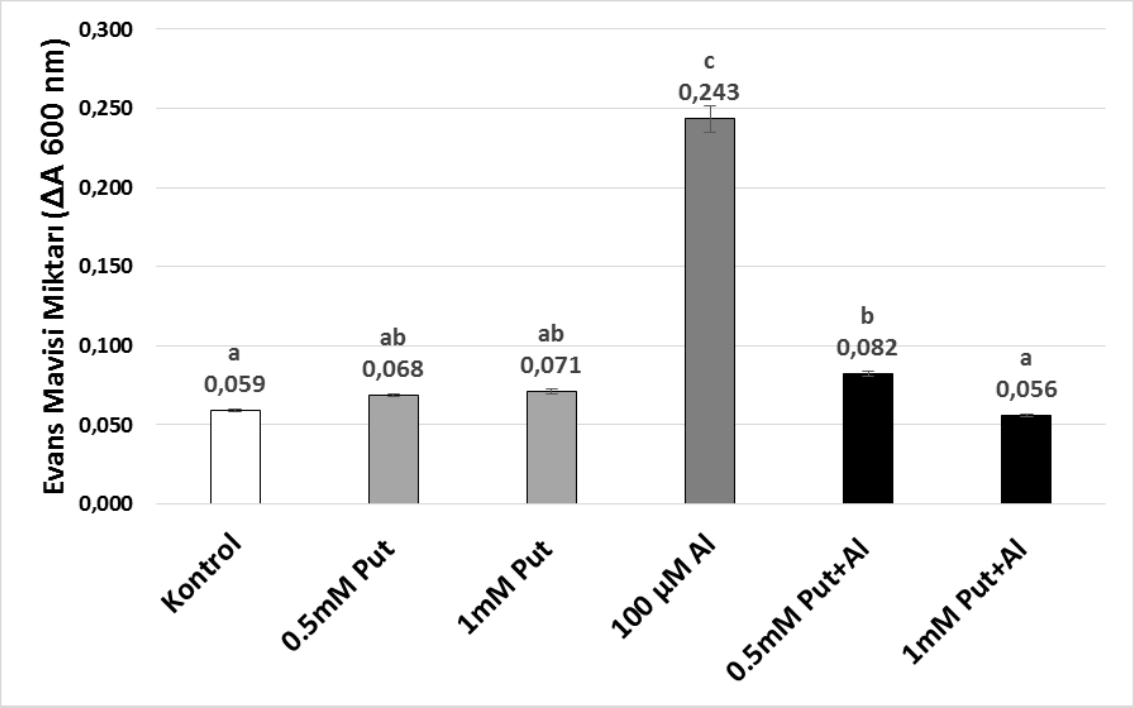
Mandal ve ark. (2013) *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480 µM Al) Al uygulamış ve 480 µM Al'nin toksik etkilerini 1 mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Al'nin artan konsantrasyonları ile Al birikiminin doğrusal bir ilişkisini olduğunu, maksimum birikiminin 480 µM Al stresinde ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. 480 µM Al stresindeki bitki hücrelerinde 1 mM Put uygulaması sonucu Al^{+3} birikiminin daha düşük miktarda olduğunu rapor etmişlerdir.

Yu ve ark.(2015) buğday köklerini 24 saat süreyle 30 µM Al uygulaması yapılmış ve alüminyumun toksik etkilerini gidermek için Al çözeltisine 2 mM Put eklemişlerdir. Put uygulamasının kökte Al birikimini azalttığını tespit etmişlerdir. Köklerde Al birikiminin azalmasının Put uygulamasına bağlı organik asit akışı ile Al şelatlanması sonucu olup olmadığı araştırmışlardır. Köklerde Al stresine bağlı malat akışı tespit etmişler fakat 30 µM Al +2 mM Put uygulamasının malat salgısında bir artış meydana getirmediğini ve bu mekanizmanın Put kaynaklı Al dışlamasından sorumlu olmadığını belirtmişlerdir.

3.2.2 Buğday Köklerinde Plazma Membranı (Zarı) Bütünlüğünün Tespiti

Evans mavisi, büyük moleküllü bir boya olması sebebiyle hasarsız hücre zarındaki porlardan içeri giremez. Plazma zarı bütünlüğü herhangi bir sebepten bozulursa ise içeri girerek hücre içine nüfuz eder. Evans mavisinin hücreye alınımı hücre zarının hasarı, canlı ve ölü hücrelerin tespitinde indikatör olarak kullanılır. Çalışmamızda hücre zarındaki hasara bağlı olarak hücre ölümünün tespiti için kontrol ve uygulama gruplarındaki buğday kökleri Evans mavisi ile boyanarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Elde edilen spektrofotometredeki absorbans değerleri; kontrol grubuna göre 0.5 mM Put grubunda %15.3, 1mM Put grubunda %20.3, (0.5 mM Put + $AlCl_3$) grubunda %39 oranında artış, (1 mM Put + $AlCl_3$) grubunda % 5.1 oranında azalma göstermiştir. 100 µM $AlCl_3$ grubunda artış miktarı en fazla olup kontrol grubuna göre 4.12 katına çıkmıştır (Şekil 3.3). Kontrolle karşılaştırıldığında Put ve Al'nin birlikte uygulandığı gruplarda (1mM Put+$AlCl_3$) grubunun, (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre hücre ölümünün engellenmesinde daha etkili olduğu belirlendi.



Şekil 3.3. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde plazma membranı bütünlüğünün bozulması ve Evans mavisinin hücre içine alınımı.

Minocha ve ark. (1992) *Catharanthus roseus* isimli odunsu bitkinin süspansiyon kültürleri 24 saat (0.2, 0.5 ve 1mM $AlCl_3$) ve 48 saat (0.2, 0.5 ve 1 mM $AlCl_3$) grupları Al stresine maruz bırakılmış ve 0.2 mM Al eklenmesi, hücre canlılığı üzerinde 24 saat etki göstermezken, 0.5 ve mM Al, sırasıyla %13 ve %35 hücre ölümüne neden olmuştur. 48 saat sonra, hücreler 0.5 ve 1 mM Al uygulamasında hücrelerin küme oluşturma eğilimi gösterdiği belirtilmiştir. Bu serbest kümelerin içerisinde ölü hücrelerin yanı sıra canlı hücrelerde tespit edilmiştir.

Xu ve ark. (2012) buğday köklerinde plazma zarının bütünlüğünün bozulduğu 24 saat boyunca 30µM Al uygulamasına bağlı Evans mavisi alınımındaki artış ile tespit edilmiştir.

Yalçın ve Vardar (2016) arpa köklerinde 72 saat boyunca 20µM $AlCl_3$ uygulamasına bağlı olarak evans mavisi alınımında en fazla artışın olduğu ve kök uçlarında belirgin bir tahrip yarattığını ifade etmişlerdir.

Awasthi ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada incelenen çeşitli parametrelere dayanarak pirinç türlerinden Disang'ın Al-toleranslı, Joymati'nin Al-duyarlı olduğu sonucuna varmıştır. Al stresi altındaki pirinç köklerine yapılan Evans mavisi boyaması ile kök uçlarına yakın hücrelerde canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. 24 ve 48 saat boyunca Al muamelesi yapılan köklerde kontrole kıyasla 1-3 kat daha fazla boya alınımı gözlenmiş olup 24 pirinç genotipinden, Joymati çeşidinde Disang'a kıyasla 24 ve 48 saatlerde evans mavisinin anlamlı bir şekilde alındığı tespit edilmiştir.

3.2.3 Mitotiks İndeks ve Kromozom Anormallikleri

Mitotik indeks, yaşayan tüm canlılar için sitotoksik ölçüt olarak kabul edilir (Amer ve Alı, 1974). Yaşayan canlılarda sitotoksik ölçüt olarak kabul edilen mitotik indeks, toksik maddelerin mitoz bölünme ve kromozom davranışlarına etkilerini incelemede kullanılan bir yöntemdir. Toksik seviye mitotik indeks oranındaki azalmayla belirlenebilir.

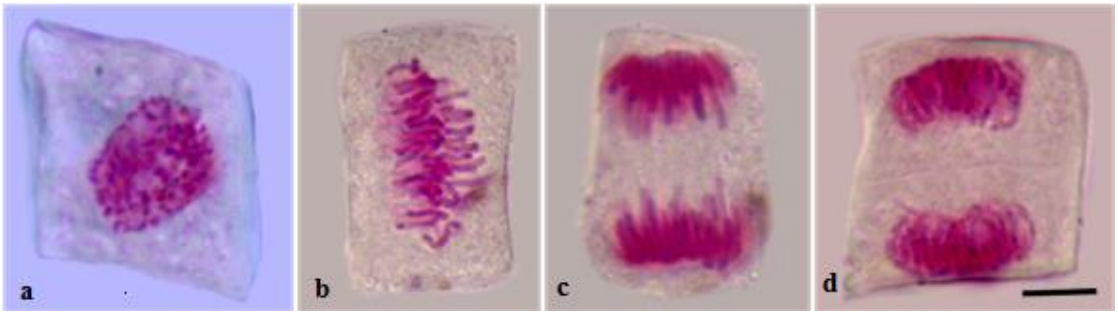
Kontrol, pozitif kontrol, Put ve Al'nin birlikte uygulandığı gruplardaki buğday kök uçlarına mitotik indeks ölçümü için Feulgen ezme tekniği uygulanmıştır. Mitotik aktivite kontrol grubunda, % 4.9, pozitif kontrol olan 0.5 mM Put grubunda %6.8, 1 mM Put grubunda %8.2, 100 µM $AlCl_3$ grubunda %3.3, (0.5 mM Put + $AlCl_3$) grubunda %3.8, (1 mM Put + $AlCl_3$) grubunda %4.7'dir. En büyük düşüş Al toksisitesine bağlı olarak 100 µM $AlCl_3$ grubunda tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Kontrole göre, pozitif kontrol grubunda 1 mM Put mitotik indekse olumlu yönde katkı sağlarken, Put ve Al'nin birlikte uygulandığı (1 mM Put + $AlCl_3$) grubu ise en etkili gruptur. Al toksisitesine bağlı olarak ortaya çıkan mitotik indeksteki azalmanın iyileştirilmesinde (1 mM Put + $AlCl_3$) grubunun en etkili grup olduğu tespit edildi.

Genel olarak sitotoksik maddeler mikrotübül oluşumunu inhibe ederek mitozda etkilerini gösterirler. Birçok araştırmacıya göre, C-mitoza bağlı olarak ortaya çıkan anoploidi, poliploidi; düzensiz profaz ve anafaz, ekvator plağının parçalanması, multipolar anafaz, yapışkanlıklar ve yanlış kutuplaşma gibi anormallikler iğ ipliği inhibisyonuna bağlanmaktadır (Amer ve Alı, 1974; Lazareve ve ark., 2003). Çalışmamızda c mitoz oluşumu tespit edilmiş olup en çok 100 µM $AlCl_3$ grubunda görülmüştür (Şekil 3.4, Şekil 3.5).

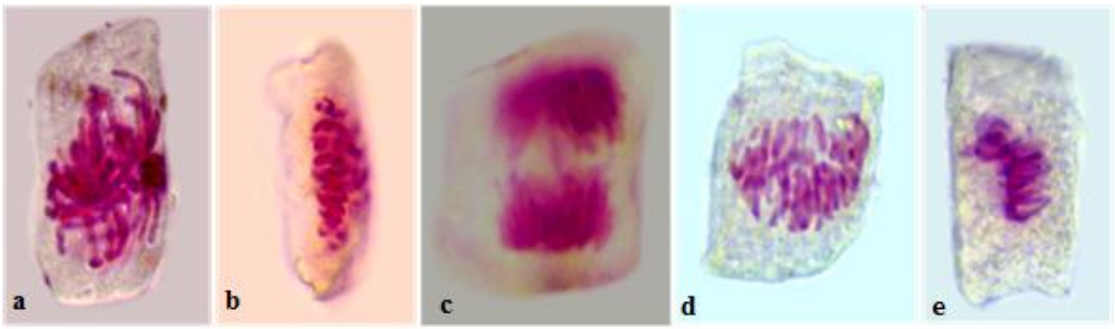
Al toksisitesi sonucu kök uçlarında mitotik aktivitede azalma; buğday (*Triticum aestivum*) (Li ve ark., 2008; Silva, 2012), mısır *(Zea mays*) (Marienfeld ve ark., 2000; Doncheva ve ark., 2005), arpa (*Hordeum vulgare*) (Budikova ve Durcekova, 2004) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) (Marienfeld ve ark., 2000) gibi tarım ürünlerinde tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde mitotik indeks ve kromozom anormallikleri.

	Kontrol	**0.5 mM Put**	**1 mM Put**	**100 µM $AlCl_3$**	**0.5 mM Put+Al**	**1 mM Put+Al**
% Mitotik İndeks (±SS)	4.86 ±0.44a	6.76 ±0.26b	8.15 ±1.57c	3.30 ±0.22d	3.83±0.21e	4.68±0.58a
Toplam Hücre sayısı	1278	1503	1158	1330	1360	1270
C mitoz	3	6	4	7	3	6
‰ C mitoz	2.35	3.99	3.45	5.26	4.41	4.72



Şekil 3.4. Negatif kontrol grubuna ait buğday kök uçlarında normal mitoz bölünme evreleri. **a.** Profaz, **b**. Metafaz, **c.** Anafaz, **d.** Telofaz. Bar: 5 µm.



Şekil 3.5. Put, Al ve Al-Put uygulanan gruplarda görülen c mitoz ve kromozom anormallikleri. **a**. PK1, **b.** PK2, **c.** Al, **d.** Al+0.5 Put, **e.** Al+1 Put. Bar: 5 µm.

Minocha ve ark.(1992) *Catharanthus roseus* isimli odunsu bitkinin süspansiyon kültürleri 24 saat 0.2, 0.5 ve 1mM $AlCl_3$ konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve hücre bölünmesini % 20-25 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir.

Poliaminlerin hücre bölünmesi üzerine etkisi konusunda tam bir fikir birliğine varılamamış olup, bazı araştırmacılar hücre bölünmesinde PA artışının bir sonucu olduğunu ifade ederken (Costa ve Bagni, 1983) diğerleri ise dışsal PA uygulamasının hücre bölünmesini inhibe ettiğini ifade etmiştir (Gatta ve ark., 1992). İsmailoğlu ve ark. (2004) poliaminlerin; buğday kök ucundaki mitotik indekste azalmaya neden olarak kök büyümesini inhibe ettiğini ifade etmiştir. Ünal ve ark. (2002) putresin ile ön muamele yaptıkları arpa tohumlarında hücre bölünmesini inhibe ettiğini ifade etmiştir. Tabur ve Demir (2010b) çalışmalarında dışsal PA uygulamasının Spd hariç tümünün mitotiks indekste azalmaya neden olduğu özellikle Put uygulaması yapılan tohumların en çok kromozom anormalliklerine sahip olduklarını belirtmiştir (Ergün, 2016). Yüksek

sıcaklık stresi altındaki arpa tohumlarına tek başına uygulanan Put ve Spm'nin mitotik indeks ve kromozom anormalliklerini iyileştirmede Spd'nin aksine başarılı olduklarını belirtmiştir.

3.3. Biyokimyasal Yöntemler

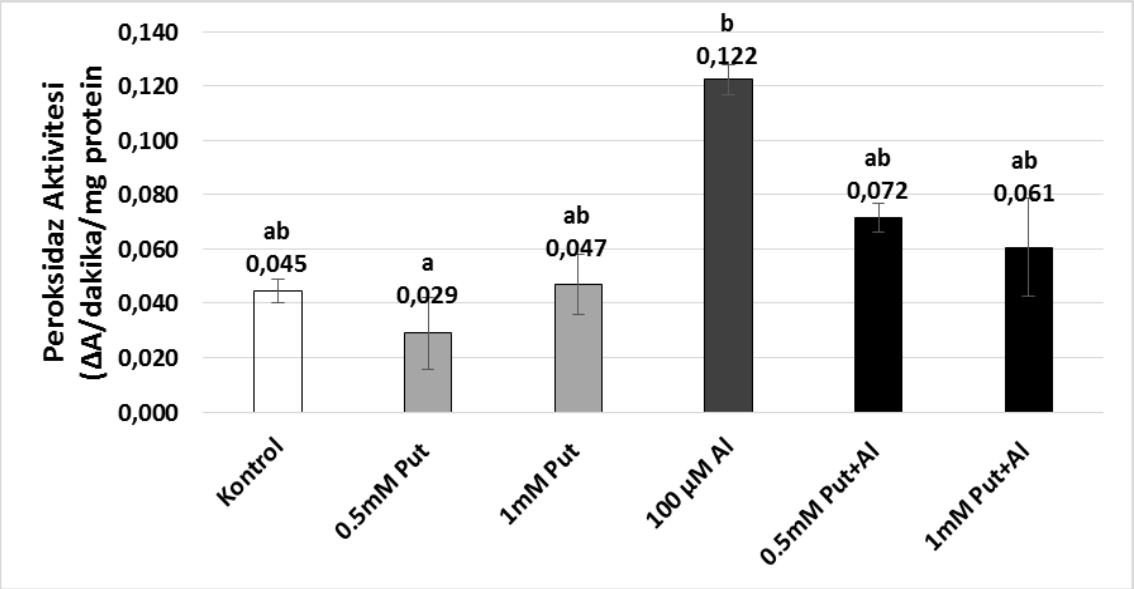
3.3.1. Buğday Köklerinde Peroksidaz (POD) Aktivite Tayini

Bitkide stres koşullarında ROT'ların oluşumu ve meydana getirdiği hasarı azaltmak için birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. ROT kaynaklı oksidatif hasarın önlenmesi için antioksidan enzimlerden biri de peroksidazdır (POD, E.C. 1.11.1.7).

Çoğunlukla kloroplastlarda sentezlenen peroksidaz, hidrojen atomlarını verme eğilimindeki olan bileşikler ile bu atomları alıcı eğiliminde olan hidrojen peroksit (H_2O_2) bileşiği arasındaki tepkimeleri katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Nawar,1996).

Bitkilerde büyük oranda bulunan ve kloroplast gibi organellerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan peroksidaz enzimi, hormonal etki (Wakamatsu ve Takahama, 1993), savunma sistemleri (Bartonek-Roxa ve ark., 1991), sebze ve meyvelerin büyüme süreci boyunca indolasetik-asit oranının dengelenmesi (Agostini ve ark., 1997) ve lignin sentezi (Duarte-Vazquez ve ark., 2000) vb. hayatsal işlevlerde rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca düşük ve yüksek sıcaklık, SO_2 stresi, tuzluluk, kuraklık stresi, parazit enfeksiyonu, UV ışık gibi çeşitli stres faktörlerinde miktarı artan peroksidaz enzimi stres enzimi olarak da anılır. POD aktivitesi çeşitli stres faktörlerine bağlı olarak artar (Kim ve ark., 2000).

Çalışmamızda; kontrol grubu ile uygulama grubuna göre POD aktivitesi karşılaştırıldığında, 0.5 mM Put grubunda %35.6, 1mM Put grubunda %4.4 oranında azalma, (0.5 mM Put+$AlCl_3$) grubunda %60, (1 mM Put+$AlCl_3$) grubunda %35.6 artış saptanmıştır. 100µM $AlCl_3$ grubunda artış miktarı çok yüksek olup kontrole göre 2.71 katına çıkmıştır. Put ve Al'nin birlikte uygulandığı gruplarda ise (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubu, (1mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre POD aktivitesinde bir miktar artış göstermiş fakat anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. En yüksek POD aktivitesi ise, 100µM $AlCl_3$ grubunda tespit edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde peroksidaz aktivite tayini.

Xu ve ark. (2012) Yangmai-5 (Al-duyarlı) ve Jian-864 (Al-toleranslı) iki buğday genotiplerinin köklerine 24 saat boyunca 30 µM Al uygulamış ve Al toleranslı buğdayda, Al duyarlılara göre APX ve GPX aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Mandal ve ark. (2013) *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480µM Al) Al uygulamış ve 480µM Al'nin toksik etkilerini 1mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. En yüksek Al konsantasyonunda GPX ve APX aktivitesinde de en fazla artışın en yüksek Al konsantrasyonunda olduğunu belirtmişlerdir. 480µM Al+ 1mM Put uygulaması yapılan bitki hücrelerinde GPX ve APX aktivitesinde en yüksek Al konsantrasyonuna göre azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

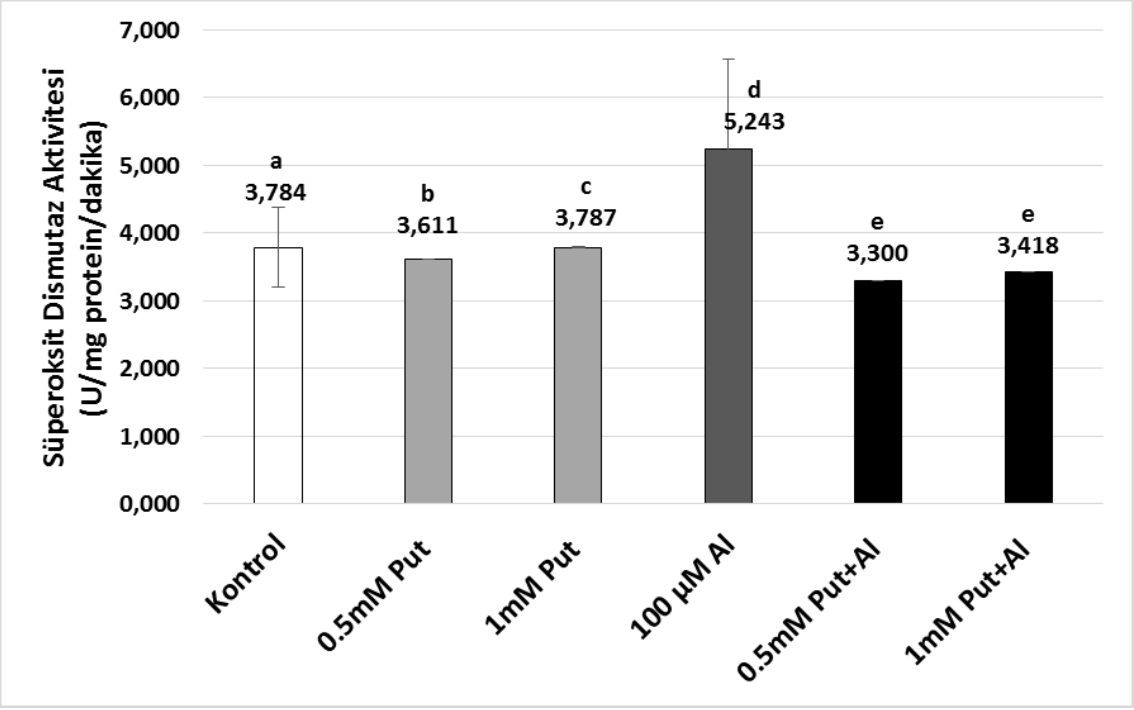
Nahar ve ark. (2017) Mas fasulyesine 48 saat ve 72 saat boyunca 0.5mM Al uygulanmış ve toksik etkilerini 0.3 mM spermidin uygulaması ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Al stresi altında APX aktivitesi 48 saat ve 72 saat grubunda kontrole göre artmıştır. Al+Spd uygulaması, sadece Al stresine kıyasla APX miktarının arttığını rapor etmişlerdir.

3.3.2 Buğday Köklerinde Süperoksit Dismutaz Aktivite (SOD) Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalini O_2^- hidrojen peroksit ve oksijene yıkımını katalizleyen bir enzimdir. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve H_2O_2'ye dönüşümünü katalizler. Fotosentezin güçlü bir engelleyicisi olan H_2O_2 peroksidazlar tarafından temizlenir (Kukreja ve ark., 2005).

Bitkide çeşitli stres koşulları altında oksidatif hasarla başa çıkmada ve programlı hücre ölümünün engellenmesinde önemli role sahiptir. *Morus alba* (Dut), *Cicer arietinum* (nohut) ve *Lycopersicon esculentum* (domates*)* gibi birçok bitkide çeşitli stres koşullarının SOD aktivitesinde artışa sebep olduğu (Attia ve ark., 2009).

Çalışmamızda SOD aktivitesi kontrol ve uygulama grupları ile karşılaştırıldığında, 0.5mM Put grubunda % 4.57 oranında azalma, 1mM Put grubunda %0.08 oranında artış, 100µM $AlCl_3$ grubunda %38.6 oranında artış, (0.5 mM Put+$AlCl_3$) grubunda, %12.8 oranında azalma, (1 mM Put+$AlCl_3$) grubunda %9.7 oranında azalma tespit edilmiştir. SOD, kontrole göre Put ve Al'nin birlikte uygulandığı (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubunda, (1mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre anlamlı olmayan daha düşük aktivasyon göstermiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde süperoksit dismutaz aktivite tayini.

Xu ve ark. (2012) Yangmai-5 (Al-duyarlı) ve Jian-864 (Al-toleranslı) iki buğday genotiplerinin köklerine 24 saat boyunca 30µM Al uygulamışlar ve Al duyarlı buğdayda, Al toleranslılara göre SOD aktivitesinin sürekli olarak yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Mandal ve ark. (2013) *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480µM Al) Al uygulamış ve 480µM Al'nin toksik etkilerini 1mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. SOD aktivitesinde Al'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak artma olduğu ve kontrol grubuna göre en fazla artmanın da 480µM Al konsantrasyonunda bulunduğu tespit edilmiştir. Put uygulamasının SOD aktivitesi üzerinde derin bir etkiye sahip olduğu ve en yüksek Al konsantrasyonunda SOD aktivitesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Nahar ve ark. (2017) Mas fasulyesine 48 saat ve 72 saat boyunca 0.5mM Al uygulamış ve toksik etkilerini 0.3mM spermidin uygulaması ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Al stresi altında SOD aktivitesinin 48 saat ve 72 saat grubunda kontrole göre arttığı; Al+Spd uygulamasının, sadece Al stresine kıyasla 48 saat grubu hariç SOD aktivitesini arttığını rapor etmişlerdir.

3.3.3 Buğday Köklerinde Katalaz (CAT) Aktivite Tayini:

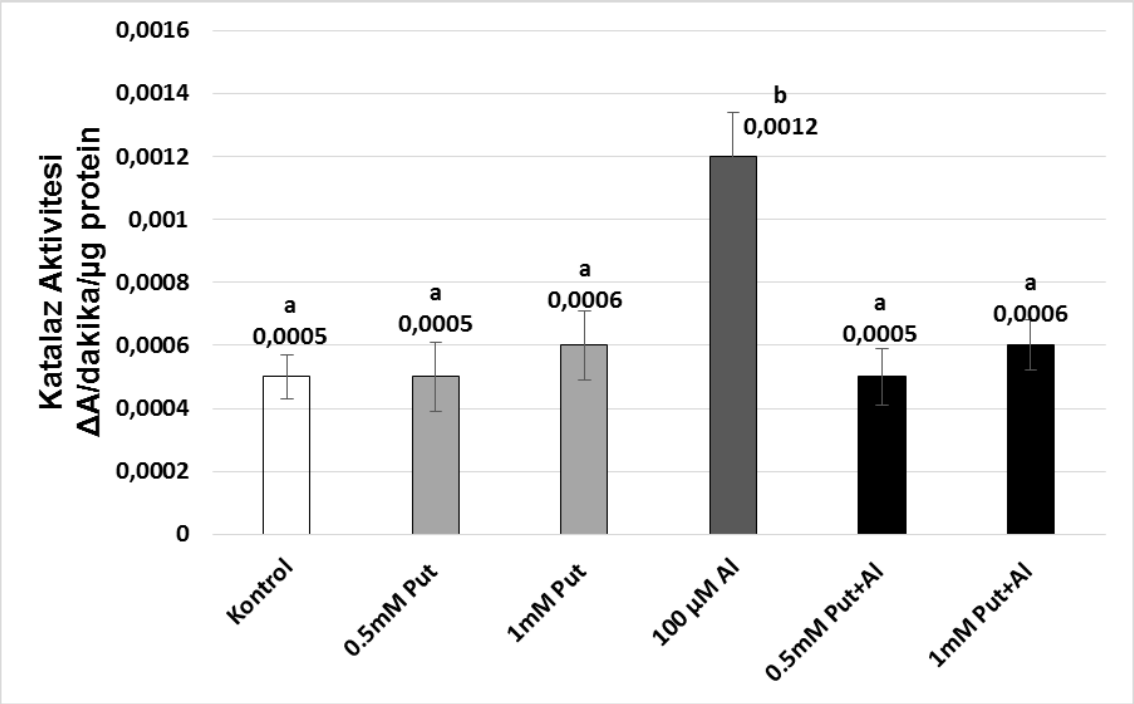
Antioksidan enzimler, hücre zarlarına zarar veren serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirmekte ve böylece koruyucu bir kalkan olarak rol oynamaktadır. Bu enzimlerden biri olan katalaz (CAT) (EC.1.11.1.6.) fotosentetik bitki hücrelerinde özel peroksizomlarda bulunur. Bitkilerde bulunan katalaz dört hem grubu içerir (Eising ve Trelease, 1990). CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2'in yıkılmasında etkili görev aldığı bilinmektedir (Patykowski ve Urbanek, 2003).

CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen varlığında metabolizmanın bazı kadamelerinde sentezlenen hidrojen peroksitin (H_2O_2) ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek, özellikle membranlarda meydana gelebilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Chaudiere ve Ferrari-Ilioui, 1999). Katalaz kararlı bir enzim

olmamakla birlikte yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde bulunan H_2O_2'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb ve ark., 1993).

Çalışmamızdaki spektrofotometrik sonuçlarda; kontrol grubuna göre 0.5 mM Put grubunda istatistiki olarak fark olmadığı, 1mM Put grubunda %20 artış; (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubunda, istatistiki olarak fark olmadığı, (1mM Put+$AlCl_3$) grubunda %20 oranında artış tespit edilmiştir. 100µM $AlCl_3$ grubunda ise yüzde artışı fazla saptanmıştır. Kontrole göre 100µM $AlCl_3$ grubunda 2.4 katına çıkmıştır (Şekil 3.9).

Yapılan çalışmalarda stres koşulları altında bitkilerde fotosentetik pigmentler, prolin, glisin, betain, ve protein gibi azotlu bileşiklerin, polisakkaritler, fenolikler, flavonoitler, β-karoten ve likopen gibi enzimatik olmayan antioksidanların ve peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimatik antioksidanların strese dayanıklı türlerde, hassas türlerle karşlaştırıldığında daha yüksek miktarda sentezlendiği belirlenmiştir (Smirnoff, 2005: Koca ve ark., 2007).Kontrolle karşılaştırıldığında sadece putresin uygulaması yapılan gruplarda, 1mM Put uygulaması, 0.5 mM Put uygulamasına göre CAT aktivitesinde anlamlı olmayan bir miktar artış, 100µM $AlCl_3$ grubunda ise önemli miktarda bir artış söz konusudur. Kontrole göre Put ve Al'nin birlikte uygulandığı gruplarda ise (1 mM Put + $AlCl_3$) grubunun, (0.5mM Put + $AlCl_3$) grubuna göre CAT aktivitesinde bir miktar artış gözlendi.



Şekil 3.8. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde katalaz aktivite tayini.

Xu ve ark. (2012) Yangmai-5 (Al-duyarlı) ve Jian-864 (Al-toleranslı) iki buğday genotiplerinin köklerine 24 saat boyunca 30µM Al uygulamışlar ve Al toleranslı buğdayda, Al duyarlılara göre CAT aktivitesinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Mandal ve ark. (2013) *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480µM Al) Al uygulamış ve 480µM Al'nin toksik etkilerini 1mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. CAT aktivitesinde Al'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azalma olduğu ve kontrol grubuna göre en fazla azalmanın da 480µM Al konsantrasyonunda bulunduğu tespit edilmiştir. Put uygulamasının CAT aktivitesini devam ettirdiği ve en yüksek Al konsantrasyonunda artış sağladığı tespit edilmiştir.

Nahar ve ark. (2017) Mas fasulyesine 48 saat ve 72 saat boyunca 0.5mM Al uygulanmış ve toksik etkilerini 0.3mM spermidin uygulaması ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Al stresi altında CAT aktivitesi 48 saat ve 72 saat grubunda kontrole göre azalmıştır. Al+Spd uygulaması, sadece Al stresine kıyasla CAT aktivitesini arttığını rapor etmişlerdir.

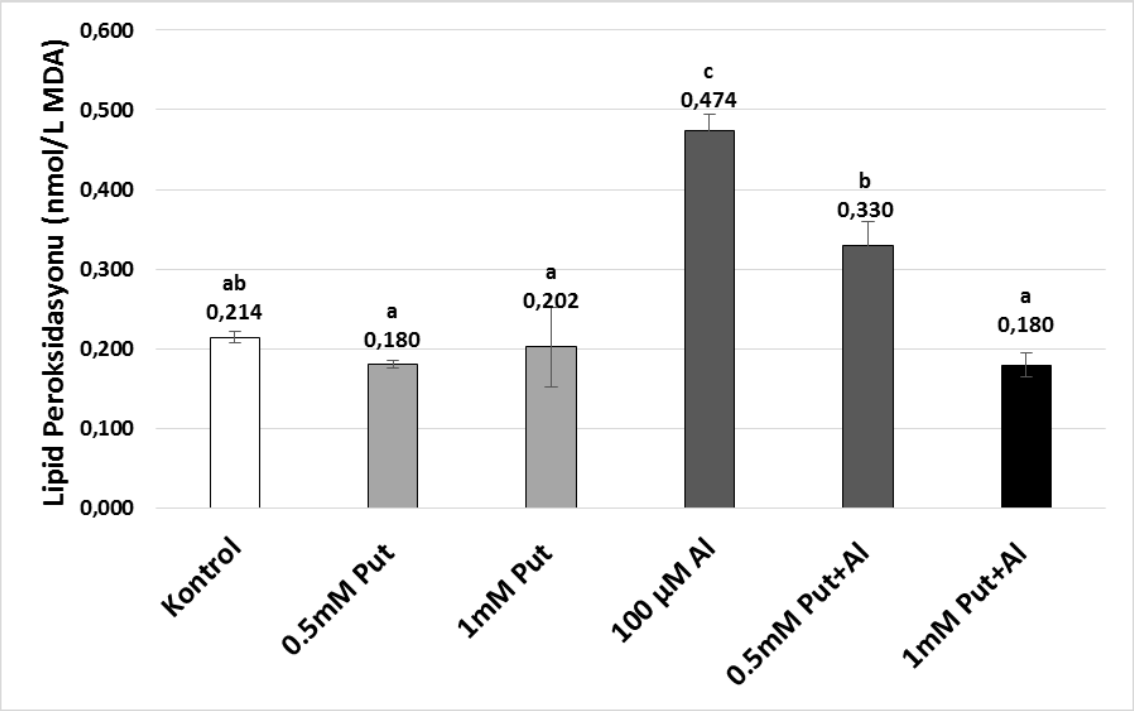
3.3.4 Buğday Köklerinde Lipit Peroksidasyonu Tayini:

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle hidroksil iyonunun (OH-) membran yapısında bulunan çoklu doymuş yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla hidrojen kaybeden yağ asiti yeniden düzenlenerek konjuge dien yapısı meydana gelir. Konjuge dien yapısı oksijenle reaksiyona girer ve lipit peroksil radikalleri (LOO•) meydana gelir. Bu peroksil radikalleri diğer yağ asitlerinden hidrojen koparması ile başlayan zincirleme peroksidasyon reaksiyonları (Girotti, 1998) sonucunda lipid peroksitleri malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal isimli aldehitlere dönüşür (Esterbauer ve ark., 1991).Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan MDA lipid peroksidasyon indeksi olarak ölçülmüştür (Onat ve ark., 2002).

Çalışmamızda elde edilen spektrofotometrik veri sonuçlarında, kontrol grubuna göre 0. 5mM Put grubu % 15.9, 1 mM Put grubu ise, %5.6 azalma; (0.5mM Put + $AlCl_3$) grubunda % 54.2 artış; (1mM Put + $AlCl_3$) grubunda ise %15.9 azalma tespit edilmiştir. 100µM $AlCl_3$ grubunda ise yüzde artışı çok fazla olup, kontrole göre 2.21 katına çıkmıştır.

Alüminyum toksisitesi de dâhil metal toksisitesinin ROT üretiminde katalizör olarak görev aldığı ve bitkilerde lipit peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, nükleik asit hasarı, enzim inhibisyonu gibi birçok oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir (Panda ve Patra, 2000; Panda ve ark. 2003). Çalışmamızda kullandığımız poliamin (Put) nükleik asit ve membranların stabilitesinin sağlanmasında önemli bir role sahip olup, oksidatif hasara yol açabilecek ROT'ların yok edilmesini ve antioksidan mekanizmayı çalıştıran bazı genlerin ekspresyonunu sağlayarak stres koşullarında fizyolojik bir cevabın oluşmasını sağlar (Gill ve Tuteja, 2010).

Elde ettiğimiz sonuçlar, kontrole göre sadece putresin uygulaması yapılan gruplarda 0.5mM Put'un, 1mM Put uygulamasına göre MDA oluşumunda bir miktarda azalma göstermiştir. Put ve Al'nın birlikte uygulandığı gruplarda ise (1mM Pu+$AlCl_3$) grubunda, (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubuna göre membran stabilitesinin daha fazla korunduğu ve oksidatif hasarın önlendiği MDA oluşumundaki azalma ile tespit edilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. 96. saatte negatif kontrol, pozitif kontrol, Al ve Al-Put uygulanan buğday köklerinde lipid peroksidasyon tayini.

Xu ve ark. (2012) Yangmai-5 (Al-duyarlı) ve Jian-864 (Al-toleranslı) iki buğday genotiplerinin köklerine 24 saat boyunca 30 µM Al uygulamışlar ve her iki genotipte kök uçlarında MDA konsantrasyonlarında artış tespit etmişlerdir. 24 saatlik Al uygulamasında Al- duyarlı buğdayların Al-toleranslılara göre daha yüksek MDA içeriğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Mandal ve ark. (2013) *Salvinia natans* isimli su bitkisini yüksek konsantrasyonlarda (240-360-480µM Al) Al uygulamış ve 480µM Al'nin toksik etkilerini 1mM Put ile iyileştirmeye çalışmışlardır. Su bitkisi Al toksisitesinin neden olduğu oksidatif strese MDA içeriği açısından lipid peroksidasyonunda artış ile cevap verdiğini ve en yüksek Al konsantrasyonunda kontrol grubuna göre 3.44 kat artışla en fazla MDA birikimi olduğunu belirtmişlerdir. 480µM Al stresindeki bitki hücrelerinde 1mM Put uygulamasının lipid peroksidasyonunu düşürerek oksidatif streste iyileşme sağladığını rapor etmişlerdir.

4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Alüminyum (Al), su ve besin alımını sınırlayan ve kök uzamasını engelleyen bitkiler için toksik bir metaldir (Yin ve ark. 2010). Al ve bileşenleri, toplam yer kabuğunun yaklaşık %8'i kadardır (Achary ve ark., 2007) ve Al'nin (örneğin, Al^{+3}) potansiyel üç değerlikli katyonik formu, toprak çözeltisinde özellikle de asidik durumda (pH≤4.5) çözüldükten sonra fitotoksik elementler olarak işlev görür. Böylece toprak asitliği ve Al-toksisitesiyle eş anlamlı olup, bitkilerin büyümesinin engellenmesi için tamamlayıcı hale gelir. (Zheng ve Yang 2005). Ayrıca Al, lipit peroksidasyonuna neden olur, hücre zarının bütünlüğünü tahrip eder ve hücre ölümüne yol açar (Yin ve ark. 2010).

Al toksisitesi ortalama olarak dünyadaki ekili alanların yaklaşık % 40'ını kapsar (Hede ve ark. 2001). Bu sebeple asitli topraklarda Al toksisitesi sonucunda oluşan hasarları iyileştirmek ve azalan ürün verimini yükseltmek için en sık organik(malik asit, sitrik asit vb.) ve inorganik maddeler (Ca, Mg vb.) kullanılmıştır. Bunun yanında salisilik asit ve poliaminler kullanılmıştır (Yalçın ve Vardar,2016).

Yalçın (2016) yaptığı çalışmada arpa köklerinde alüminyumun toksik etkilerini iyileştirmek için salisilik asit uygulaması yapmıştır. 20 µM $AlCl_3$'ün toksik etkilerini 10µM SA uygulamasıyla iyileştirmiştir.

PA'lar iyileştirme etkilerini organik asitlerin salgılanması, osmolit biyosentezi ve bitkilerde antioksidan sisteminin aktivasyonu sağlar (Liu ve ark., 2017). Yu ve arkadaşlarına (2016) göre önemli bir sinyal molekülü olan Put, etilen sentezini azaltarak toksisite kaynaklı kök büyüme inhibisyonunu hafifletmektedir. Put'un bu etkisi göz önüne alınarak Al^{+3} toksisitesi sonucu tarımsal önemi olan buğdaygillerde düşen ürün verimini arttırmak için, hasar ve hücre ölümünün iyileştirilmesinde kullanılabilir.

Yapılan literatür çalışmaları eşliğinde buğday köklerine uygulanan 100µM Al'nin toksik etkilerinin iyileştirilmesi için 96 saat boyunca 0.5mM ve 1mM putresin uygulaması yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Al toksisitesi; kökte Al birikiminin sonucu olarak kök büyüme inhibisyonuna sebep olmuştur. Lipid peroksidasyonunda meydan gelen artışın plazma membranı bütünlüğünü bozduğu, mitotik indekste azalmaya ve antioksidan enzimler olan peroksidaz, süperoksit dismutaz

ve katalazı aktive ettiği, miktarının arttığı (Tablo 4) tespit edilmiştir. Toksisite belirtilerinin iyileştirilmesinde (0.5mM Put+$AlCl_3$) grubu ve (1mM Put+$AlCl_3$) grubu arasında belirgin bir farklılık olmamakla birlikte tümü ele alındığında (1mM Put+$AlCl_3$) uygulamasının daha etkili olduğu belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4. 1 100µM Al toksisitesini iyileştirmede 0.5 mM ve 1 mM put uygulamasının negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Çalışma grupları / **Parametreler**	**(0.5mM Put+$AlCl_3$)**	**(1mM Put+$AlCl_3$)**
Kök uzunluğu	%69.8	%71.1
Al^{+3} iyon birikimi	5.5 katıdır	4.36 katıdır
Plazma membran bütünlüğü	%39 artış	%5.1 azalma
Mitotik indeks	%3.8	%4.7
POD aktivitesi	%60 artış	%35.6 artış
SOD aktivitesi	%12.8 azalma	%9.7 azalma
CAT aktivitesi	Değişim yok	% 20 artış
Lipid peroksidasyonu	% 54.2 artış	%15.9 azalma

Putresinin, Al toksisitesine karşı bitki toleransını nasıl arttırdığı belirsizliğini korumakla birlikte literatür araştırmalarına göre, dışsal poliaminlerin ROT'ları temizleyebileceği ve membran lipid peroksidasyonunu önleyebileceği gösterildi. Bu sebeple Wang ve ark. (2013b); Put'un, Al kaynaklı ROT oluşumunu azaltarak oksidatif strese karşı koruma sağlamada antioksidan olarak görev yapabildiğini ifade etti (Wang ve ark., 2013b). Aynı zamanda Put'un , köklerden sitrat gibi organik asit salgılarını modüle ettiği ve organik asitlerin salınımı ile Al^{+3} şelatlayarak Al toksisitesini iyileştirebildiği belirtildi (Wang ve ark., 2013a).

Çalışmamızda dünyada ve ülkemizde besin maddesi olarak bol miktarda tüketilen *Triticum aestivum* köklerinde 100µM $AlCl_3$'ün morfolojik, sitolojik, biyokimyasal olarak tespit edilen toksik etkilerinin poliamin (putresin) ile iyileştirilmesinin ileride yapılacak çalışmalara öncülük etmesi ve literatürdeki boşlukları doldurması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Achary, V.M., Jena, S., Panda, K., Panda, B. (2007). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. Ecotoxicolgy and Environmental Safety 70(2), 300–310.
2. Agostini, E., Medina, M.I., Milrad De Forchetti, S.R., Tigier, H. (1997).Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica Napus* L.) roots. Journal of Agricaltural and Food Chemistry, 45(3), 596–598.
3. Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnology Letters, 28(23),1867–1876.
4. Alessa, L., Oliveira, L. (2001). Aluminum toxicity studies in Vaucheria longicaulis var. Macounii (Xanthophyta Tribophyceae) II. Effects on the F-Actin array. Environmental and Experimental Botany, 45(3), 223–237.
5. Amer, S.M., Alı, E.M. (1974). Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on Vicia faba. Cytologia, 39(4), 633-643.
6. Arenhart, R.A., Bai, Y., de Oliveira, L.F., Neto, L.B., Schunemann, M., Felipe dos Santos Maraschin, F.D.S., Mariath, J., Silverio, A., Sachetto-Martins, G., Margis, R., Wang, Z.Y., Margis-Pinheiro, M.(2014). New insights into aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. Molecular Plant, 7(4), 709–721.
7. Arenhart, R.A., Chunemann, M., Neto, L.B., Margis, R., Wang, Z.Y., Margis-Pinheiro, M., 2016. Rice ASR1 and ASR5 are complementary transcription factors regulating aluminium responsive genes. Plant, Cell & Environment, 39(3), 645–651.
8. Arenhart, R.A., Lima, J.C., Pedron, M., Carvalho, F.E.L., Da Solveira, J.A.G., Rosa, S.B., Caverzan, A., Andrade, C.M.B., Schunemann, M., Margis, R., Margis-Pinheiro, M.(2013). Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. Plant, Cell & Environment, 36(1), 52–67.

9. Attia, H., Karray, N., Lachaa, M.(2009). Light interacts with salt stress in regulating superoxide dismutase gene expression in *Arabidopsis*. Plant Science, 177(3) 161–167.
10. Awasthi, J.P., Saha, B., Regon, P., Sahoo, S., Chowra, U., Pradhan, A., Roy, A., Panda, S.K. (2017). Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. PLoS ONE 12(4), 1-23.
11. Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine. 109 (1), 33–44.
12. Babourina, O., Rengel, Z.(2009). Uptake of aluminium into *Arabidopsis* root cells measured by fluorescent life- time imaging. Annals of Botany, 104(1), 189–195.
13. Baluška, F., Šamaj, J., Wojtaszek, P., Volkmann, D., Menzel, D. (2003). Cytoskeletonplasma membrane-cell wall continuum in plants: emerging links revisited. Plant Physiology, 133(2), 482–491
14. Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance. A review. Enviromental and Experimental Botany, 48(2002), 75–92.
15. Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B.(1991). The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. Biochimica Et Biophysica Acta, 1080(2), 245–250.
16. Bennet, R.J., Breen, C.M., Fey, M.V.(1985). Aluminium-induced changes in the morphology of the quiescent centre, proximal meristem and growth region of the root of *Zea mays*. South African Journal of Botany, 51(5), 355–362.
17. Bhalerao, S.A., Prabhu, D.V.(2013). Aluminium toxicity in plants _ A review. Journal of Applicable Chemistry, 2(3), 447–474.
18. Birecka, H., Briber, K. A., Catalfamo, J. L. (1973). Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. Plant Physilogy,52, 43-49.
19. Bose, J., Babourina, O., Ma, Y., Zhou, M., Shabala, S., Rengel, Z. (2015). Specificity of ion uptake and homeostasis maintenance during acid and aluminium stresses, in *Aluminum Stress Adaptation in Plants.*

20. Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., Rengel, Z.(2010). Aluminium-dependent dynamics of ion transport in Arabidopsis: specificity of low pH and aluminium responses. Physiologia Plantarum, 139(4), 401–412.
21. Brunner, I., Sperisen, C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in plants. Frontiers In Plant Science, 4, 172-184.
22. Budikova, S., Durcekova, K.(2004). Aluminium accumulation in roots of Al-sensitive barley cultivar changes root cell structure and induces callose synthesis. Biologia (Bratislava), 59, 215-220.
23. Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji, 69(2), 97-110.
24. Cai, M., Wang, N., Xing, C., Wang, F., Wu, K., Du, X. (2013). Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. Environmental Science and Pollutian Research, 20(12), 8924–8933.
25. Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology., 37(9-10), 949-962.
26. Chen, Q., Zhang, M., Shen, S.(2010). Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 33(2), 273-278.
27. Cho, Y.W., Park, E.H., Lim, C.J. (2000). Catalase, glutathione s-transferase and thioltransferase respond differently to oxidative stres in Schizosaccharomyces pombe. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 33(4), 344-348.
28. Ciamporová, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminum at organ, tissue and cellular levels. Biologia Plantarum, 45(2), 161-171.
29. Clark, R.B., Pier, H.A., Knudsen, D., Maranville, J.W.(1981). Effect of trace element deficiencies and excesses on mineral nutrients in sorghum, Journal of Plant Nutrition, 3(1-4), 357–374.
30. Costa, G., Bagni, N. (1983). Effects of polyamines on fruit-set of apple. HortScience, 18 (1), 59-61.

31. Çakmak, I., Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologia Plantarum, 83(3), 463-468.
32. Çakmak, I., Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology, 98(4), 1222-1227.
33. Delhaize E. (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(42), 15249–15254.
34. Delhaize, E., Ryan, P. R. (1995). Aluminium toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology. 107(2), 315–321.
35. Doncheva, M. A., Poschenrieder, C., Barcelo, J.(2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. Journal of Experimental Botany, 56(414), 1213-1220.
36. Driscoll, C.T., Schecher, W. D.(1988). Aluminum in the environment, Vol. 24, Aluminum and its role in biology, Marcel Dekker, New York, USA.
37. Du, B., Nian, H., Zhang, Z., Yang, C. (2010). Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance. Acta Physiologiae Plantarum. 32(5), 883–890.
38. Duarte-Vazquez, M.A., Garcia-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R.(2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica Napus* L. Var Esculenta D.C.) Peroxidases, Journal of Agricaltural and Food Chemistry 48(5), 1574–1579.
39. Eekhout, T., Larsen, P., De Veylder, L. (2017). Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. Trends in Plant Science, 22(2), 102–105.
40. Edreva, A. (2005). pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. General and Applied Plant Physiology, 31(1-2), 105-124.
41. Eising, R., Trelease, R.N., Ni, W.(1990). Biogenesis of catalase in glioxysomes and leaf-type, peroxisomes of sunflower cotyledons. Archives of Biochemistry and Biophysics, 278(1), 258-264.

42. Eschrich, W.(1975). Sealing System in Plants, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Zimmermann. M.H.. Malburn, J.A.Eds.; Springer-VerIng. Berlin.
43. Ergün, Ş.B. (2016). Yüksek Sıcaklık Stresi Altındaki Arpa Tohumlarında (*Hordeum vulgare* L. cv.''Bülbül 89'') Bazı Bitki Büyüme Regülatörlerinin Mitotik İndeks ve Kromozom Anormallikleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye.
44. Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H.(1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology & Medicine, 11(1), 81-128.
45. Fan, W., Xu, J.M., Lou, H.Q., Xiao Ch Chen, W.W., Yang, J.L.(2016). Physiological and molecular analysis of aluminium-induced organic acid anion secretion from grain amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) roots. International. Journal of Molecular Sciences, 17(5), E608.
46. Flora, S.J.(2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cellular and Molecular Biology, 53(5), 1-3.
47. Foy, C.D. (1974) Effects of aluminum on plant growth. The plant root and its environment, University Press of Virginia, Charlottesville, USA.
48. Foy, C.D.(1992). Soil chemical factors limiting plant root growth. Advances in Soil Sciences: Limitations to Plant Root Growth, Vol. 19, Springer Verlag, New York, USA.
49. Foy, C.D., Fleming, A.L. (1982).Aluminium tolerance of two wheat cultivars related to nitrate reductase activities, Journal of Plant Nutrition, 5(11), 1313–1333.
50. Frantzios, G., Galatis, B. P. Apostolakos.(2001). Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum.* II. Cytokinetic cells. Journal of Plant Research, 114(2), 157-170.
51. Fujii, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho, D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., Nakazono, M., Ma, J.F.(2012). Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. Nature Communications, 3, Article Number: 713.

52. Furlani, R.R., Clark, R.B.(1981).Screening Sorghum for aluminium tolerance in nutrient solution. Agronomy Journal, 73, 587–594.
53. Garcıa-Jimenez, P., Just, P.M., Delgado, A.M., Robaina, R.R.(2007) Transglutaminase activity decrease during acclimation to hyposaline conditions in marine seaweed *Grateloupia doryphora* (Rhodophyta, Halymeniaceae). Journal of Plant Physiology, 164(3),367-370.
54. Gatta, L., Marhitelli, C., Federico, R.(1992). Effect of polyamines and their oxydative product on maize and lentil root growth. Annals of Botany, 50, 43-48.
55. Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V., Minkov, I. (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. Journal of Plant Physiology,160(5), 509-515.
56. Gill, S.S., Tuteja, N.(2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling and Behavior, 5(1), 26–33.
57. Girotti, A.W.(1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, The Journal of Lipid Research, 39(8),1529-1542.
58. Goodwin, S. B., and Sutter, T. R. (2009). Microarray analysis of Arabidopsis genome response to aluminum stress. Biologia Plantarum. 53(1), 85–99.
59. Grabski, S., Arnoys, E., Busch, B., Schindler, M.(1998). Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. Plant Physiology, 116(1), 279–290.
60. Grabski, S., Schindler, M. (1995). Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. Plant Physiology, 108 (3), 897–901.
61. Guo, J.H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J.L., Han, W.X., Zhang, W.F., Zhang, F.S.(2010). Significant acidification in major Chinese croplands. Science, 327 (5968), 1008– 1010.
62. Gupta, K.,Sengupta, A., Chakraborty, M., Gupta, B.(2016). Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses, 7, Article ID, 1343.
63. Gupta, N., Gaurav, S. S., Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review. American Journal of Plant Sciences. 4(12C), 21–37.

64. Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany, 68(1), 14–25.
65. He, H., He, L., Gu, M. (2015). Signal transduction during aluminum-induced secretion of organic acids in plants. Biologia Plantarum, 59(4), 601–608.
66. Hede, A.R., Skovmand, B., López-Cesati, J. (2001). Application of Physiology in Wheat Breeding. Eds:Reynolds, M.P., Ortiz-Monasterio J.I., McNab, A.; CIMMYT, Mexico.
67. Horst, W.J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluska, F., Sivaguru, M.(1999). Does aluminum affect root growth of maize through interaction with the cell wall—plasma membrane—cytoskeleton continuum? Plant Soil 215(2), 163–174.
68. Horst, W. J., Wang, Y., Eticha, D. (2010). The role of the apoplast in Al induced inhibition of root elongation and in Al resistance of plants: A review. Annals of Botany, 106(1), 185–197.
69. .https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=42 (Erişim tarihi, 2018).
70. https://www.fikir.gen.tr/kok-nedir-kok-cesitleri-nelerdir/
71. Huang, C. F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., Ma, J. F. (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. The Plant Cell, 21(2), 655–667.
72. Hue, N.V., Craddock, G.R., Adams, F.(1986). Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoil. Soil Science Society America Journal, 50(1), 28–34.
73. Huyluoglu, Z., Unal, M., Unsal, N.P. (2008). Cytological evidence of the rool of Meta-topolin and Benzyladenin in barley root tips. Advances in Molecular Biology, 1, 31-37.
74. Inostroza-Blancheteau, C., Rengel, Z., Alberdi, M., Aquea, F., Arce-Johnson, P. (2012). Molecular and physiological strategies to increase aluminum. Moleculer Biology Reports,39(3), 2069-2079.
75. Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Sasaki, R., Ofei-Manu, P. (2000).Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two

cultivars each in five plant species. Soil Science and Plant Nutrition, 46(3):751–758.

76. İsmailoğlu, I., Ünal, M., Palavan-Ünsal, N. (2004). Effects of spermidine, spermine and cyclohexylamine on mitotic activity of 2X, 4X and 6X wheats. Journal of Cell and Molecular Biology, 3, 83-88.
77. Jianq, H. X., Tanq, N., Zheng, J. G., Li, Y., Chen L. S. (2009). Phosphorus alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings. Physiologia Plantarum, 137(3) 298–311.
78. Kacar, B., Katkat, V. (2007). Gübreler ve Gübreleme Tekniği, 2. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, Türkiye.
79. Kamprath, E.J., Foy, C.D.(1971). Lime Fertilizer Plants Interactions in Acid Soils, Fertilizer Technology and Use, 2 nd., Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.
80. Kariuki, S.K., Zhang, H., Schroder, J.L., Edwards, J., Payton, M., Carver, B.F., Raun, W.R., Krenzer, E.G. (2007). Hard red winter wheat cultivar responses to a pH and aluminum concentrations gradient. Agronmy Journal, 99(1), 88–98.
81. Kenzhebaeva, S.S., Yamamoto, Y. and Matsumoto, M.(2001). Aluminum-ınduced changes in cell-wall glycoproteins in the root tips of al-tolerant and al-sensitive wheat lines. Russian Journal of Plant Physiology.48(4), 441–447.
82. Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrider, C., Gunse, B., and Barcelo, J. (2001). The role of roots exudates in aluminium resistence and silicon- induced amelioration of aluminium toxicity in three varities of maize (Zea mays L.). Journal of Experimental Botany, 52(359), 1339–1352.
83. Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., Kwak, S.S.(2000). Differantial expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethaphon. Phytochemistry, 54(1), 19-22.
84. Kinraide, T.B., Yermiyahu, U., Rytwo, G. (1998). Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. Correspondence to published zeta potentials from diverse plant sources. Plant Physiology, 118(2), 505–512.
85. Kireççi, O. A. (2006). Bazı sentetik bitki büyüme düzenleyicilerin (gibberellik asit, spermin, 351 spermidin, putresin) fesleğen (Ocimum basilicum) bitkisinde morfolojik yapı ve uçucu yağ kalitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye.

86. Kisnierienė, V., Lapeikaitė, I. (2015). When chemistry meets biology: the case of aluminium- A review. Chemija, 26(3), 148–158.
87. Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., Türkan, İ.(2007).The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Enviromental and Experimental Botany, 60, 344-351.
88. Kochian, L.V.(1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,46(1),237–260.
89. Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils?-mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. Annual review of plant biology, 55(1), 459-493.
90. Kochian, L. V., Pineros, M. A., Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. Plant Soil, 274(1-2), 175–195.
91. Kochian, L.J., Piñeros, M. A., Liu, J., Magalhaes, J.(2015). Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. Annual Review of Plant Biology, 66**,** 571–598.
92. Kopittke, P.M.(2016). Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. Plant, Cell & Environment, 39(10), 2319-2328.
93. Kopittke, P. M., Blamey, F. P. C. (2016). Theoretical and experimental assessment of nutrient solution composition in short-term studies of aluminium rhizotoxicity. Plant and Soil 406(1), 311–326.
94. Kukreja, S., Nandval, A.S., Kumar, N., Sharma, S.K., Sharma, S.K., Unvi, V., Sharma, P.K. (2005). Plant water status, H_2O_2 scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. Biologia Plantarum, 2005, 49(2), 305-308.
95. Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M., Tiburcio, AF.(1997). Recent advances in polyamine research. Trends in Plant Science, 2(4), 124–130.
96. Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C.,Takahashi, Y.(2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta, 228(3), 367–381.

97. Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. Journal of Plant Research, 120(3), 345-50.
98. Larsen, P. B., Degenhardt, J., Tai, C. Y., Stenzler, L. M., Howell, S. H., Kochian, L. V. (1998). Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. Plant Physiology, 117(1), 9–18.
99. Lawrence, G.B., Burns, A.D., Riva-Murray, K.(2016). A new look at liming as an approach to accelerate recovery from acidic deposition effects. Science of the Total Environment, 562, 35-46.
100. Lazareve, E.M., Polyakov, V.Y., Chentsov, Y.S., Smirnova, E.A.(2013). Time and cell dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicines in *Triticum aestivum* root meristem. Cell Biology International, 27(8), 633-646.
101. Liu, J., Piñeros, M. A.,Kochian, L. V.(2014). The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. Journal of Integrative Plant Biology, 56(3), 221–230.
102. Liu, N., Song, F., Zhu, X., You, J., Yang, Z., Li, X.(2017). Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in soybean roots through modulation of reactive oxygen species metabolism. Frontiers in Chemistry, 5, 96.
103. Ma, J. F.(2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. International Review of Cytology, 264, 225–252.
104. Ma, J.F., Chen, Z.C., Shen, R.F. (2014). Molecular mechanism of Al tolerance in gramineous plants. Plant and Soil, 381(1-2), 1–12.
105. Ma J. F., Hiradate S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Planta, 211(3), 355–360.
106. Ma J. F., Hiradate S., Matsumoto H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. Plant Physiology,117(3),753–759.
107. Ma, J.F., Taketa, S., Yang, Z.M.(2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. Plant Physiology. 122(3), 687–694.

108. Ma, Q.F., Rengel, Z., Kuo, J. (2002). Aluminium toxicity in rye (Secale cereale): Root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips. Annals of Botany, 89(2), 241– 244.
109. Mahajan, S, Tuteja, N.(2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444(2), 139-158.
110. Mandal, C., Ghosh, N., Maiti, S., Das, V., Gupta, S., Dey, V., Adak, M.K.(2013). Antioxidative response of salvinia (*Salvinia natans* Linn) to aluminum stress and it's modulation by polyamine, Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(1), 91-103.
111. Mariano, E.D., Keltjens, W.G.(2005). Long-term effects of aluminium exposure on nutrient uptake by maize genotypes differing in aluminium resistance. Journal of Plant Nutrition, 28(2), 323–333.
112. Marienfeld, S., Schmohl, N., Klein, M., Schroder, W. H., Kuhn, A. J., Horst, W. J.(2000). Localisation of aluminium in root tips of Zea mays and Vicia faba. Journal of Plant Physiology, 156(5-6), 666– 671.
113. Massot, N., Llugany, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J.(1999). Callose production as indicator of aluminium toxicity in bean cultivars. Journal of Nutrition, 22(1), 1–10.
114. Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. International Review Cytology, 200(4), 1–46.
115. Matsumoto, H., Morimura, S., Takahashi, E.(1977). Binding of aluminium to DNA of DNP (deoxyribonucleoprotein) in pea root nuclei. Plant and Cell Physiology, 18, 987–993.
116. Minocha, R., Minocha, S.C., Long, S.L., Shortle, W.C.(1992). Effects of aluminium on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant, *Catharanthus roseus*, Physiologia Plantarum, 85(3), 417–424.
117. Mojović, M., Vuletić, M., Bacić, G.G., Vucinić, Z.(2004).Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: an EPR spin-trap study. Journal of Experimental Botany, 55(408), 2523-2531.

118. Morel, J. L., Mench, M., Guckert, A. (1986). Measurement of $Pb^{2+,}$ Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. Biology and Fertility of Soils 2(1), 29–34.

119. Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Suzuki, T., Fujita, M.(2016). Polyamine and nitric oxide crosstalk: Antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126, 245-255.

120. Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Suzuki, T., Fujita, M. (2017). Polyamines-induced aluminum tolerance in mung bean:A study on antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems, Ecotoxicology, 26(1), 58-73.

121. Nawar, W.W.(1996). Food Chemistry, 3rd. Edition, Marcel Dekker, New York, USA.

122. Nichol, B.E., Oliveira, L.A., Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y.(1993). The effect of aluminium on the influx of calcium, potassium, ammonium nitrate and phosphate in an aluminium-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.), Plant Physiology, 101(4), 1263–1266.

123. Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L.(2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. Trends in Plant Science, 19(6), 399–407.

124. Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

125. Ownby, J. D. (1993). Mechanism of reaction of hematoxylin with aluminum-treat wheat roots. Phisologia Plantarum, 87(3), 371-380.

126. Özuygur, M., Ateşalp, M., Börekçi, M.(1974). Doğu Karadeniz topraklarının kireç ihtiyaçlarını tayinde uygulanacak metodlar ve kireçleme malzemeleri üzerinde bir araştırma, *TÜBİTAK*, Ankara, Türkiye.

127. Özyiğit, İ., Akıncı, Ş. (2009). Effects of stress factors (Aluminum, Cadmium and Drought) on stomata of Roman neetle (*Urtica pilulifera* L.). Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napaco, 37(1), 108-115.

128. Panda, S. K., Baluška, F., Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. Plant Signaling & Behavior, 4(7), 592-597.

129. Panda, S.K., Chaudhury, I.,Khan M.H. (2003) Heavy metals induce lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. Biologia Plantarum, 46(2), 289-294.
130. Panda, S. K., Matsumoto, H. (2010). Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (Pisum sativum L.) under Al stress. Biometals, 23(4), 753–762.
131. Pandey, S., Ranade, S.A., Nagar, P.K., Kumar, N. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. Journal of Biosciences, 25(3), 291-299.
132. Patykowski, J., Urbanek, H. (2003). Activity of enzymes related to H_2O_2 generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology, 151(3), 153-161.
133. Pegg, A.E. (2010). Michael A.J., Spermine synthase, Cellular and Molecular Life Sciences, 67(1), 113-121.
134. Pineros, M.A., Kochian, L.V. (2001). A patch–clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of $Al3^+$-induced anion channels. Plant Physiology, 125(1), 292–305.
135. Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. Sciens of the Total Environment, 400(1-3), 356–368.
136. Rengasamy P.(2006). World salinization with emphasis on Australia. Journal of Experimental Botany, 57(5), 1017-1023.
137. Rengel, Z. (2004). Aluminium cycling in the soil-plant-animal-human continuum. Biometals, 17(6), 669–689.
138. Rengel Z., Bose J., Chen Q., Tripathi B. N. (2015). Magnesium alleviates plant toxicity of aluminium and heavy metals. Crop and Pasture Science, 66(12), 1298–1307.
139. Rengel, Z., Elliott, D.C. (1992). Aluminum inhibits net $45Ca^{2+}$ uptake by Amaranthus protoplasts. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 188(3), 177–186.

140. Rengel, Z., Zhang, W.H.(2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. New Phytologist, 159(2), 295–314.
141. Roy, A.K., Sharma, A., Talukder, G.(1988).Some aspects of aluminium toxicity in plants, The Botanical Review, 54, 145–177.
142. Ryan, P., Ditomaso, J., Kochian, L. (1993). Aluminum Toxicity in Roots: An Investigation of Spatial Sensitivity and the Role of the Root Cap. Journal of Experimantal Botany, 44(2), 437-446.
143. Ryan, P. R., Tyerman, S. D., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W. H., Delhazie E.(2011). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. Journal of Experimental Botany, 62(1), 9–20.
144. Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M. S., Suravajhala, P., Kavi Kishor, P.B.(2016). Toxicity and tolerance of aluminium in plants: tailoring plants to suit to acid soils. Biometals 29(2), 187–210.
145. Sasaki, M., Yamamato, Y., Matsumoto, H. (1996). Lignin Deposition Induced by Aluminum in Wheat (*Triticum aestivum*) Roots. Physiology Plant, 96(2), 193-198.
146. Schildknecht, P.H.P.A., De Campos Vidal B. (2002). A role for the cell wall in Al^{3+} resistance and toxicity: crystallinity and availability of negative charges. International Archieves of Bioscience, 2000, 1087–1095.
147. Schmitt, M., Watanabe, T., Jansen, S. (2016). The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. AoB Plants, 8, plw065.
148. Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold D. L., Polle, A.(2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. Plant Physiology, 127(3), 887-898.
149. Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P., Opatrný, Z.(2002). Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. Plant&Cell Physiology, 43(2), 207–216.
150. Sen, G., Eryilmaz, I.E., Ozakca, D.(2014). The effect of aluminium-stress and exogenous spermidine on chlorophyll degradation, glutathione reductase activity

and the photosystem II D1 protein gene (*psbA*) transcript level in lichen *Xanthoria parietina,* Phytochemistry, 98, 54-59.

151. Shen, R., Ma, J., Kyo, M., Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. Planta, 215(3), 394–398.
152. Shen, X., Xiao, X., Dong, Z., Chen, Y. (2014). Silicon effects on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of peanut under aluminum stress. Acta Physiologiae Plantarum, 36(11), 3063–3069.
153. Shuman, L.M. (1986). Effect of limiting in the distribution of Mn, Cu and Zn among soil fractions. Soil Science Society of America Journal, 50, 1236-1240.
154. Sierra, J., Noe¨l, C., Dufour, L., Ozier-Lafontaine, H., Welcker, C., Desfontaines, L. (2003). Mineral nutrition and growth of tropical maize as affected by soil acidity. Plant and Soil, 252(2), 215–226.
155. Silva, G. E. A., Ramos F. T., de Faria A. P., França M. G. C. (2014). Seeds' physicochemical traits and mucilage protection against aluminum effect during germination and root elongation as important factors in a biofuel seed crop (*Ricinus communis*). Environmental Science and Pollution Research, 21(19), 11572–11579.
156. Silva, I., Smyth, T.J, Israel, D.W, Raper,C.D, Rufty, T.W. (2001a). Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation by roots. Plant and Cell Physiology,42(5), 546-554.
157. Silva, S. (2012). Aluminium toxicity targets in plants. Journal of Botany, Article ID 219462, 1–8.
158. Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., Vaculik, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. Environmental and Experimental Botany. 137, 177–193.
159. Singh, V. P., Tripathi, D. K., Kumar, D., Chauhan, D. K. (2011). Influence of exogenous silicon addition on aluminium tolerance in rice seedlings. Biological Trace Element Research, 144, 1260-1274.
160. Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z. H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkmann, D., Matsumoto, H. (2003). Aluminum-induced gene expression and

protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. Plant Physiology. 132(4), 2256–2266.

161. Sivaguru, M., Fujiwara, T., Šamaj, J., Baluška, F., Yang, Z., Osawa, H., Matsumoto, H.(2000). Aluminum-induced 1-3-b-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant physiology. 124 (3), 991–1006.
162. Sivaguru, M., Horst, W.J.(1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. Plant Physiology, 116 (1), 155–163
163. Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R., Galsto, A.W.(1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235(2), 283–303.
164. Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist, 125(1), 27-58.
165. Smirnoff, N.(2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
166. Surapu, V., Ediga, A., Meriga, B. (2014). Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in tomato seedlings (*Lycopersicum esculentum* Mill.) through activation of antioxidant defense system and proline biosynthesis. Advances in Bioscience and Biotechnology, 5(9), 777-789.
167. Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J.(1993). Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. Physiologia Plantarum, 88(4), 590- 598.
168. Tabur, S., Demir, K. (2010 b). Protective roles of exogenous polyamines on chromosomal aberrations in *Hordeum vulgare* exposed to salinity. Biologia, 65(6), 947-953.
169. Takahashi, T., Kakehi, J.(2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. Annals of Botany, 105(1), 1–6.
170. Tang, C., Rengel, Z., Diatloff, E., Gazey, C. (2003). Responses of wheat and barley to liming on a sandy soil with subsoil acidity. Field Crops Research, 80(3), 235–244

171. Ülgen, N., Rasheed, M. A.(1975).Kireçlemenin asit topraklar ve çeşitli enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri, *Köy İşleri Bakanlığı, Toprak Su Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları*, Ankara, Genel Yayın No: 62, Rapor Seri No:3.

172. Ünal, M., Palavan-Ünsal, N., Tüfekçi, M.A. (2002). Role of putrescine and its biosynthetic inhibitor on seed germination root elongation and mitosis in *Hordeum vulgare* L. Bulletinof Pure and Applied Sciences Section- B-Botany, 21, 33-38.

173. Van Breusegem, F., Dat, J.F.(2006).Reactive oxygen species in plant cell death. Plant Physiology, 141(2), 384-390.

174. Vardar, F., Akgül, N., Aytürk, Ö., Aydın, Y. (2015). Assessment of Aluminum induced Genotoxicity with Commet Assey in wheat, rye, and triticale roots. Fresenius Enviromental Bulletin, 24 (10 A), 3352-3358.

175. Vardar, F., Arıcan E.,Gözükırmızı, N. (2006). Effects of aluminum on in vitro root growth and seed germination of tobacco (Nicotiana tabacum L.). Advances in Food Sciences, 28(2), 85–88.

176. Vardar, F., Çabuk, E., Aytürk, Ö., & Aydın, Y. (2016). Determination of aluminum induced programmed cell death characterized by DNA fragmentation in Gramineae species. Caryologia, 69(2), 111-115.

177. Vardar, F., İsmailoğlu, I., İnan, D., Ünal, M. (2011). Determination of stress responses induced by aluminum in maize (Zea mays). Acta Biologica Hungarica, 62(2), 156-170.

178. Vardar, F., Ünal, M. (2007). Aluminum Toxicity and Resistance in Higher Plants. Advances in Molecular Biology, 1(1), 1-12.

179. Vitorello,V.A., Capaldi, F.R.C., Stefanuto, V.A.(2005).Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17(1), 129-143

180. Wagatsuma, T., Ishikawa, S., Akimoto, T., Tawaraya, K., Ofei-Manu, P. (2001). Developments in plant and soil sciences-Plant Nutrition, 92, Springer, New York, USA.

181. Wakamatsu, K., Takahama, U. (1993).Changes in Peroxidase Activity and in Peroxidase İsozymes in Carrot Callus. Physiologia Plantarum, 88, 167– 171.

182. Wang, H., Huang, J., Liang, W., Liang, X., Bi, Y. (2013a). Involvement of putrescine and nitric oxide in aluminum tolerance by modulating citrate secretion from roots of red kidney bean. Plant and Soil, 366(1-2), 479–490.

183. Wang, H., Liang, W., Huang, J. (2013b). Putrescine mediates aluminum tolerance in red kidney bean by modulating aluminum-induced oxidative stress. Crop Science, 53(5), 2120–2128.

184. Wang, J., R. H. (2006). Validation of an Alt locus for aluminium tolerance scored with eriochrome cyanine R staining method in barley cultivar Honen (*Hordeum vulgare* L.). Australian Journal of Agricultural Research, 57(1), 113-118.

185. Wang, H., Chen, R. F., Iwashita, T., Shen, R. F., Ma, J. F. (2015a). Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. New Phytologist, 205(1), 273–279.

186. Wang, L.Q., Yang, L.T., Guo, P., Zhou, X.X., Ye, X., Chen, E.J., Chen, L.S. (2015c). Leaf cDNA-AFLP analysis reveals novel mechanisms for boron-induced alleviation of aluminum-toxicity in *Citrus grandis* seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety, 120, 349–359.

187. Wang, W., Zhao, X. Q., Chen, R. F., Dong, X. Y., Lan, P., Ma, J. F., Shen, R.F. (2015d). Altered cell wall properties are responsible for ammonium-reduced aluminium accumulation in rice roots. Plant&Cell Environment, 38(7), 1382–1390.

188. Wang, S., Ren, X., Huang, B., Wang, G., Zhou, P., An, Y. (2016). Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. Scientific Reports, 6, 30079.

189. Wang, Y., Stass, A., Horst, W. J. (2004). Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. Plant Physiology.136(3), 3762–3770.

190. Watanabe, T., Misawa, S., Hiradate, S., Osaki, M. (2008a). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminium accumulation. New Phytologist, 178(3), 581–589.

191. Watanabe, T., Misawa, S., Hiradate, S., Osaki, M. (2008b). Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signaling&Behaviour.* 3(8), 603–605.

192. Wu, D., Shen, H., Yokawa, K., Baluška, F. (2014). Alleviation of aluminium-induced cell rigidity by overexpression of *OsPIN2* in rice roots. Journal of Experimental Botany, 65(18), 5305–5315.

193. Wu, X., Li, R., Shi, J., Wang, J., Sun, Q., Zhang, H., Xing, Y., Qi, Y., Zhang, N., Guo, Y. (2014). *Brassica oleracea* MATE encodes a citrate transporter, and enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 55(8), 1426–1436.

194. Xu, F. J., Li, G., Jin, C. W., Liu, W. J., Zhang, S. S., Zhang, Y. S., & Lin, X. Y. (2012). Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. Biologia Plantarum, 56(1), 89-96.

195. Yalçın, G., Vardar, F.(2016). The alleviating effects of salicylic acid application against aluminium toxicity in barley (*Hordeum vulgare*) roots. Biologia, 71(12), 1338-1344.

196. Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. Plant Physiology, 125(1),199-208.

197. Yang, L.T, Jiang, H.X., Qi,Y.P.(2012).Chen LS Differential expression of genes involved in alternative glycolytic pathways, phosphorus scavenging and recycling in response to aluminum and phosphorus interactions in Citrus roots. Molecular Biology Reports, 39(5),6353-6366.

198. Yang, Y., Wang, Q. L., Geng, M. L., Guo, Z. H., Zhao, Z. (2011). Rhizosphere pH difference regulated by plasma membrane H+-ATPase is related do differential Al-tolerance of two wheat cultivars. Plant Soil and Environment,57, 201–206.

199. Yim, K.O., Bradford, K.J. (1998). Callose deposition is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds. Plant Physiology, 118(1), 83-90.

200. Yin, L., Wang, S., Eltayeb, A.E., Uddin, M.I., Yamamoto, Y., Tsuji, W., Takeuchi, Y., Tanaka, K. (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. Planta, 231(3), 609–621.

201. Yu, Y.,Jin, C., Sun, C., Wang, J., Ye, Y., Lu, L., Lin, X.(2015). Elevation of arginine decarboxylase-dependent putrescine production enhances aluminum tolerance by decreasing aluminum retention in root cell walls of wheat. Journal of Hazardous Materials, 299, 280-288.

202. Yu, Y., Jin, C., Sun, C., Wang, J., Ye, Y., Zhou,W., Lu, L., Lin, X.(2016). Inhibition of ethylene production by putrescine alleviates aluminium-induced root inhibition in wheat plants. Scientific Reports, 6, 18888.

203. Zapata, P.J., Serrano, M., Pretel, M.T., Amoros, A., Botella, M.A.(2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. Plant Science, 167(4), 781-788.

204. Zelinova, V., Haluskova, L., Huttova, J., Illes, P., Mistrik, I., Valentovicova, K., Tamas, L.(2011). Short-term aluminium-induced changes in barley root tips. Protoplasma, 248, 523-530.

205. Zhang, H., Jiang, Z., Qin, R., Zhang, H., Zou, J., Jiang, W., Liu, D. (2014). Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology*,14(1), 264.

206. Zhang, L., Wu, X., Wang, J., Qi, C., Wang, X., Wang, G., Li, M., Li, X., Guo, Y.(2017). BoALMT1, an Al-Induced Malate Transporter in Cabbage, Enhances Aluminum Tolerance in *Arabidopsis thaliana.* Frontiers in Plant Science, 8, 2156.

207. Zhang, W. H., Rengel, Z. (1999). Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium intact wheat root apical cells. Australian Journal of Plant Physiology, 26(5), 401-409.

208. Zhao, H.Z., Yang, H.Q.(2008). Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. Scientia Horticulturae, 116(4), 442–447.

209. Zheng, S.J., Yang, J.L. (2005). Target sites of aluminium phytotoxicity. Biologia Plantarum, 49(3), 321–331

210. Zhou, X.X., Yang, L.T., Qi, Y.P., Guo, P., Chen, L.S. (2015). Mechanisms on boron-induced alleviation of aluminum-toxicity in *Citrus grandis* seedlings at a transcriptional level revealed by cDNA-AFLP analysis. PLOS One, 10(3), e0115485.

ÖZGEÇMİŞ

19/11/1989 İstanbul doğumluyum. İlk ve orta ortaokulu öğrenimimi 2003 yılında İstiklal İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi 2006 yılında Namık Kemal Lisesinde tamamladım. 2007-2011 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi' Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2011-2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde Pedagojik Formasyon eğitimi aldım. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji anabilim dalında 2016 yılının güz döneminden itibaren öğrenci olarak eğitim almaktayım.

Bu tez çalışması Eskişehirde 3-5 Mayıs 2018 tarihleri arasında düzenlenmiş olan **4. Uluslararası ICABS** Kongresinde **sözlü** olarak sunulmuştur.

Vardar F, **Akgün Ö,** Çetinbaş-Genç A and Yanık F. **2018.** The effects of putrescine application against Aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) roorts.