

In vitro koşullarda farklı dozlarda bor uygulamalarının mersin (*Myrtus communis* L.) bitkisinin biyokimyasal özellikleri üzerine etkileri

The effects of boron applications with different doses on the biochemical properties of myrtle plant (*Myrtus communis* L.) in *in vitro* conditions

Cansu DİNDAR¹ , Adnan YILDIRIM² , Civan ÇELİK³ 

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Aydın, Türkiye.

²Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta, Türkiye.

³Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, Türkiye.

| ARTICLE INFO | ÖZET |
|--|---|
| <p>Article history: Recieved / Geliş: 03.08.2022 Accepted / Kabul: 28.09.2022</p> <p>Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım Bor toksisitesi Mersin bitkisi <i>Myrtus communis</i> L. <i>In vitro</i> Stres</p> <p>Keywords: Micropropagation Boron toxicity Myrtle <i>Myrtus communis</i> L. <i>In vitro</i> Stress</p> <p>✉Corresponding author/Sorumlu yazar: Adnan Nurhan YILDIRIM adnanyildirim@isparta.edu.tr</p> <p>Makale Uluslararası Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 Lisansı kapsamında yayınlanmaktadır. Bu, orijinal makaleye uygun şekilde atıf yapılması şartıyla, eserin herhangi bir ortam veya formatta kopyalanmasını ve dağıtılmasını sağlar. Ancak, eserler ticari amaçlar için kullanılamaz. © Copyright 2022 by Mustafa Kemal University. Available on-line at https://dergipark.org.tr/tr/pub/mkutbd This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.</p> <p> </p> | <p>Araştırmada siyah meyveli bir mahalli çeşit olan 'tatlı mersin' genotipinin sürgün uçları materyal olarak kullanılmıştır. Bu çalışma ile ortama eklenen bor konsantrasyonlarından toksisite problemi yaratabilecek bor (B) uygulamaları ile olası B stresi altında mersin bitkisinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerdeki değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla 6 farklı borik asit (H_3BO_3) dozu (12.4 mg L^{-1}, 18.6 mg L^{-1}, 24.8 mg L^{-1}, 31 mg L^{-1}, 37.2 mg L^{-1}, 43.4 mg L^{-1}) Murashige ve Skoog (MS) ortamına eklenmiş ve kontrol grubu ile birlikte bitkilerin gelişimleri takip edilmiştir. Araştırmada kontrol ortamındaki bitkilere yalnızca MS ortam içeriğindeki standart B miktarı (6.2 mg L^{-1}) ilave edilmiştir. Araştırmada, en yüksek prolin miktarı 43.4 mg L^{-1} uygulamasında $11.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak elde edilirken, en düşük prolin miktarı kontrol grubunda $3.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) enzim aktiviteleri uygulama dozları arttıkça yükselmiş, en düşük değer kontrol grubundaki bitkilerde belirlenmiştir. Sonuç olarak; yetiştirme ortamına eklenen H_3BO_3 miktarı arttıkça özellikle askorbat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve peroksidaz gibi stres mekanizmasında rol alan enzimatik antioksidan aktivitelerinde önemli derecede artış gözlenmiştir.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>In this study, shoot tips of the 'sweet myrtle' genotype which is a local variety with black fruits, were used as study material. It was aimed to determine the level of boron (B) that may cause toxicity problems from six different B concentrations added to the growing media and the changes in biochemical properties of myrtle plants under possible boron stress were examined. Six different boric acid (H_3BO_3) doses (12.4 mg L^{-1}, 18.6 mg L^{-1}, 24.8 mg L^{-1}, 31 mg L^{-1}, 37.2 mg L^{-1}, 43.4 mg L^{-1}) was added to the Murashige and Skoog (MS) medium and the development of the plants was compared with the control group. Only standard B content (6.2 mg L^{-1}) was added in the MS medium to the plants in the control group. As a result of examining the statistical evaluations; the highest proline amount was obtained as $11.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 43.4 mg L^{-1} application in the media which has the highest H_3BO_3 concentration, whereas the lowest proline amount was determined as $3.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ in the control group. Ascorbat peroxidase, superoxide dismutase, peroxidase enzyme activities increased as the application doses increased and the lowest value was determined in the plants in the control group. As the amount of B added to the growing medium increased, a significant increase was observed in the enzymatic antioxidant activities that play a role in the stress mechanism, especially ascorbat peroxidase, catalase, superoxide dismutase, peroxidase. As a result of the study, it was determined that the tolerance limits of the myrtle plant against boron stress were high.</p> |
| <p>Cite/Atıf</p> | <p>Dindar, C., Yıldırım, A.N., & Çelik, C. (2023). <i>In vitro</i> koşullarda farklı dozlarda bor uygulamalarının mersin (<i>Myrtus communis</i> L.) bitkisinin biyokimyasal özellikleri üzerine etkileri. <i>Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi</i>, 28 (1), 46-58. https://doi.org/10.37908/mkutbd.1153620</p> |

GİRİŞ

Mersin bitkisi Myrtaceae familyasının *Myrtus communis* L. türü içerisinde yer almaktadır. Bu tür Akdeniz Bölgesi'ne özgü bitki örtüsü içerisinde yer almakta ve bitki genellikle ağaç ya da kısa çalı formunda, her zaman yeşil olan çok yıllık bir bitkidir. Bu türün bitkileri Antalya, Adana, Hatay, İstanbul, Sinop, Zonguldak, Samsun, Ordu, Trabzon, Çanakkale, İzmir, Muğla ve İçel taraflarında sıkça görülmekte ve "Mersin" ismiyle tanınmasına karşın bilhassa güney sahillerinde "murt", "adi mersin" ve "hambeles" isimleriyle de bilinmekte (Aydın & Özcan, 2007) hatta bazı yörelerde yaprağına "bahar" da denmektedir (Oğur, 1994). Mersin bitkisinin meyveleri üzüksü meyve tipinde, beyaz ve siyah renkli olup sonbaharda (Ekim-Aralık) olgunlaşmaktadır. Mersin meyvesi; tanen, uçucu yağ, organik asitler (sitrik ve malik asit) ve şeker ihtiva etmektedir (Erlaçın & Erciyas, 1978). Mersinin hiçbir çeşidi tescil edilmemiş ve isimlendirilmemiştir. Ancak 'aş' ifadesi; kültürü yapılan üstün özellikli çeşitler için kullanılmaktadır. Yabani beyaz veya siyah mersinler küçük meyvelilerdir. Siyah mersin (aş) ise kısmen büyük meyveli ve siyah olan mersin bitkilerinden oluşur (Yeğin & Uzun, 2015). Son yıllarda, sağlık açısından yararlarının saptanması ile birlikte yüksek antioksidan kapasitesi ve içerdiği biyokimyasallar dolayısı ile siyah renkli meyvelere de ilgi artmıştır. İlginin giderek artmasının sebepleri arasında bitkinin kolay yetiştirilebilmesi, dikkate değer bir hastalık ve zararlısının olmaması ve organik tarım için uygun olması da gösterilebilir. Mersin meyvesinin besin değerinin iyi olması, yaprak ve meyvelerinin geniş bir alanda kullanılıyor olması (sofralık, likör yapımı, çay, uçucu yağ eldesi vb.) üretiminin artırılmasına ortam hazırlamaktadır.

Günümüzde çalışmalar, antioksidan, antimikrobiyal ve mutajen özellikleri olan tıbbi ve aromatik bitkilerin sağlığa yararlı işlevleri üzerine odaklanmıştır (Serçe ve ark., 2010). Mersin bitkisi gerek yaprak gerek meyve içeriği bakımından beslenmede önemli değerlere sahiptir. Fakat ülkemizde kültüründen çok doğadan toplayıcılık ile piyasaya ürün sunulmaktadır. Ancak gerekli çalışmalar yapıp, mersin bitkisi ve meyvesi yetiştiriciliği konusunda daha fazla bilgiye sahip olunması ile daha kaliteli ve aynı zamanda içerik bakımından zengin bitkilerin (yaprak, meyve vb. açısından) yetiştirilmesine olanak sağlanacaktır.

Kültürü yapılan bazı mersin çeşitlerinin, yerel pazarlarda alıcı bulmasına karşın Türkiye'deki yetiştirme alanı ve üretim miktarlarına ilişkin kayıtlara rastlanmamıştır. Mersin bitkisinin kültürünün yapılması hem kaliteli ürün bazında hem de doğadaki üretimin kontrollü olması anlamında önem arz etmektedir. Kültürünün yapılabilmesi için bitkinin istekleri, çevreyle ilişkisi, stres koşullarına dayanımı gibi konuların bilinmesi yetiştiricilikte avantaj sağlayacaktır.

Bitkiler yaşamları süresince tuzluluk, ultra viole ışınlar, düşük ve yüksek sıcaklıklar, kuraklık ve toksik metal iyonları gibi birçok çevresel strese maruz kalmaktadır. Bu stres faktörleri birçok canlılık olayını (büyüme, bitki gelişimi, çiçeklenme, meyve verimi ve üreme gibi) olumsuz etkilemektedir (Hayat ve ark., 2012). Wilkinson (1994)'a göre stresin sebebi ne olursa olsun, bitkiler hayatlarını devam ettirebilmek için fazlasıyla çaba gösterirler ve bu etkenlere karşı tepki oluştururlar. Strese karşı gösterilen direnç sonucunda bitkide biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler seviyede bir takım değişiklikler meydana gelmektedir (Sairam & Tyagi, 2004). Kendilerine karşı strese sebep olabilecek olumsuz bir faktörle karşılaşan bitkilerin yapılarında reaktif oksijen türevleri (ROS) olarak adlandırılan molekül veya atomlar oluşmaktadır. Kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklar gibi abiyotik stresler, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimini olumsuz etkilemektedir. Gelecekte tatlı su kıtlığının artacağı ve bu durumun bir sonucu olarak abiyotik streslerin yoğunluğunun bir şekilde görüleceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda gıda güvenliğini sağlamak için abiyotik streslere toleranslı ürün çeşitlerinin geliştirilmesi ihtiyacı mevcuttur (Gong ve ark., 2005).

Ülkemizde atıklarla kirletilmiş olan akarsuların sulama amaçlı olarak kullanılmaları sonucu bazı bölgelerimizin topraklarında çoğunlukla bor (B) kirliliği ve bu bölgelerde yetiştirilen bitkilerde görülen B toksisitesi problemleri oluşmaktadır (Eraydın, 2000; Çevik & Tarı, 2019). Bitkisel üretimi kısıtlayan B toksisitesi önemli miktarlarda ürün zararına sebep olacak bir beslenme problemi olarak görülmektedir. Bu yüzden olumsuz toprak şartlarına toleransı

yüksek olan bitki tür ve çeşitlerini değerlendirmek veya bitki besin maddelerinin birbirleri ile etkileşimlerden faydalanarak bu sorunla başetmek mümkün olacaktır (Soy & Güneş, 2003).

Bitki türlerinin yanı sıra türler içindeki genotipler de B gereksinimleri açısından önemli farklılıklar gösterir (Akan ve ark., 2022; Ödemiş & Uncu, 2022). Bir bitki için eksik olan B miktarı, başka bir bitki için toksik olabilmektedir (Brdar-Jokanović, 2020). Çift çenekli bitkiler nispeten daha düşük B gereksinimlerine sahiptir ve yüksek dozda B'a karşı daha az toleranslıdır (Berger, 1949). Tolerans mekanizmasında etkili olan bir takım kimyasallar stres durumunda bitki tarafından sentezlenir. Sekonder metabolit adı verilen bu maddeler, bitkinin dış koşullara uyum sağlaması bakımından oldukça önemli olup, birçok biyoteknolojik uygulama için de ilgi çekicidir (Wink, 2009). Bitkiler genellikle örtüaltında veya açık arazilerde yetiştirilmekte olup, bu bitkilerden bazı bileşenlerin ekstraksiyonları da sağlanmaktadır. Birçok tür için yeni çeşitler geliştirilip, geliştirilen çeşitlerin verimlerinin ve kalitesinin artmış olması önem teşkil etmektedir. Bu durumda in vitro tekniklerin (mikroçoğaltma, hücre kültürleri vs.) kullanılmasının oldukça önemli olduğu görülmektedir. Çoğu sekonder metabolit sentez reaksiyonları, besin miktarı, ışık, stres faktörleri, büyüme düzenleyiciler gibi abiyotik etmenlerle değiştirilebilir (Vuran & Türker, 2021). Doku kültüründe sekonder metabolit üretimi de biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin tesiri altındadır (Akula & Ravishankar, 2011). Sekonder metabolitler tutkal, boya, elyaf, yağ, ilaçlar, aroma ve parfüm içerisinde olmak üzere çok miktarda endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Ayrıca biyolojik niteliklerinin bilinmesi ile yeni ilaç, insektisit, herbisitlerin ve antibiyotik arayışını da hızlandırmıştır (Zinkel & Russell, 1989; Dawson, 1994).

Bu bilgilerden yola çıkarak B'un optimum ve toksik miktarlarının kontrollü koşullarda belirlenmesi ileride yaşanabilecek su ve toprak kaynaklı B problemlerinde yol gösterici olacaktır. Bu nedenle, kontrollü koşulların sağlanabilmesi için bu çalışmada bitki doku kültürü yöntemi ile çalışma planlanmıştır. Ülkemizin mersin bitkisi ve meyvesi yetiştiriciliğine uygun koşulları göz önünde bulundurulduğunda, üstün özellikteki tiplerin çoğaltımı ve bu sayede yetiştiriciliğinin ekonomik düzeyde yapılabilmesi ile fayda sağlayacaktır. Aynı zamanda gündün güne artan B toksisitesi tehdidi ile karşı karşıya olan alanlarda değerlendirilebilecek bir alternatif ürün ortaya konulacaktır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmada materyal olarak, üreticiler tarafından aşılanaarak üretimi yapılmakta olan "tatlı mersin" isimli yerel çeşidin sürgün uçları kullanılmıştır. Eksplantlar, nisan ayında yaklaşık 2-3 cm boyunda alınıp, uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve dikimi yapılmıştır.

Yöntem

Materyal hazırlığı ve ortamların hazırlanması

Aktif büyüme dönemi olan Nisan ayında alınan 2-3 cm uzunluğundaki sürgün uçları buz kutuları içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Alınan eksplantlar önce %70'lik etil alkolde 1.5 dakika tutulduktan sonra alkolden arındırmak için 2 kere steril distile su ile yıkanmıştır. Sonraki aşamada eksplantlar ticari sodyum hipokloritin (NaOCl) (%5 Cl) %20'lik çözeltisi içerisinde 15 dakika süre ile sterilize edilmiş ve ardından 3 kez 5'er dakika steril distile suda çalkalanarak NaOCl' den arındırma işlemi yapılmıştır. Alt kültür için besin ortamları hazırlanırken (Çizelge 1) 4.43 g L⁻¹ hazır Murashige ve Skoog (MS) ortamı içerisine 30 g L⁻¹ sakkaroz eklenip iyice eritildikten sonra 1 mg L⁻¹ Benzilamino pürin (BAP) ve 0.1 mg L⁻¹ Indolbütirik asit (IBA) eklenen ortamın pH'sı, seyreltilmiş sodyum hidroksit (NaOH) ve/veya hidrojen klorürden (HCl) faydalanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. 6 g L⁻¹ agar eklendikten sonra agarın çözünmesi ve besi ortamına eşit bir şekilde dağılması için mikrodalga fırın kullanılmıştır. Her bir kültür kabına yaklaşık olarak 20 ml olacak şekilde paylaştırılmış, daha sonra üzerleri kapatılan kaplar, otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile bekletilerek sterilize edilmiştir.

Çizelge 1. MS besi ortamı içeriği (Murashige & Skoog, 1962)

Table 1. MS nutrient medium content (Murashige & Skoog, 1962)

| Kimyasal | Konsantrasyon (mg L ⁻¹) |
|--|-------------------------------------|
| Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃) | 1650 |
| Potasyum nitrat (KNO ₃) | 1900 |
| Potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄) | 170 |
| Magnezyum sülfat (MgSO ₄ 7H ₂ O) | 370 |
| Kalsiyum klorit (CaCl ₂ H ₂ O) 440 | 440 |
| Potasyum iyot (KI) | 0.83 |
| Borik asit (H ₃ BO ₃) | 6.2 |
| Çinko sülfat (ZnSO ₄ 7H ₂ O) | 8.6 |
| Mangan sülfat (MnSO ₄ 4H ₂ O) | 22.3 |
| Sodyum molibdat (Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O) | 0.25 |
| Bakır sülfat (CuSO ₄ 5H ₂ O) | 0.025 |
| Kobalt klorit (CoCl ₂ 6H ₂ O) | 0.025 |
| EDTA disodyum (Na ₂ EDTA) | 37.2 |
| Demir sülfat (FeSO ₄ 7H ₂ O) | 27.8 |
| Tiamin hidroklor (Thiamine HCl) | 0.1 |
| Pyridoksin | 0.5 |
| Nikotinik asit | 0.5 |
| Glisin | 2 |
| Myo-inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 100 |

Eksplantların dikilmesi ve yeterli çoğaltım materyalinin elde edilmesi

Eksplantların sterilizasyonundan sonra yaklaşık 1 cm boyundaki sürgün uçları steril kabin içerisinde hazırlanan besi ortamlarına dikilmiştir. *In vitro* sürgünler, çoğaltma ortamında alt kültüre alınarak deneme için yeterli sayıda bitkicik elde edilene kadar çoğaltma işlemine devam edilmiştir. Daha sonra elde edilen kültürlerden alınan bitkicikler, uygulama sırasında problem yaratmaması açısından fenolik madde salgısı duruncaya kadar herhangi bir bitki büyüme düzenleyici (BBD) içermeyen ortama (4.43 gr L⁻¹ MS + 30 gr L⁻¹ sakkaroz + 6 g L⁻¹ agar) dikilmiştir. Sürgün uçları yoğun fenolik madde salgısının devam ettiği 4 gün boyunca bu besin ortamında tutulmuş daha sonra deneme ortamlarına alınmıştır.

Deneme ortamlarının hazırlanması

Çalışmada 6 farklı borik asit (H₃BO₃) dozunu içeren besin ortamı kontrol grubu ile birlikte kullanılmıştır (Çizelge 2) ve uygulamalar yapılmıştır.

Çizelge 2. Araştırmada kullanılan borik asit dozları

Table 2. Boric acid doses used in the study

| Uygulamalar* |
|--|
| 6.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı (Kontrol) |
| 12.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |
| 18.6 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |
| 24.8 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |
| 31 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |
| 37.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |
| 43.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ içeren MS ortamı |

*Tüm besin ortamlarına 4.43 g L⁻¹ hazır MS, 6 g L⁻¹ agar, 30 g L⁻¹ sakkaroz, 1 mg L⁻¹ BAP ve 0.1 mg L⁻¹ IBA ilavesi yapılmıştır.

Kültür odasında ortam sıcaklığının $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit kalabilmesi için sıcaklık kontrol sistemi (klima ve termostat) yer almaktadır. Ayrıca zaman ayarlayıcı yardımıyla fotoperiyot 8 saat karanlık, 16 saat aydınlık olacak şekilde ayarlanmış ve $150\pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ yoğunlukta beyaz ışık kullanılmıştır.

Araştırma 3 tekerrürlü olarak düzenlenmiş, her bir tekerrürde 3 adet kültür kabı, her kaptaki 4 adet eksplant kullanılmıştır. Kültüre alınan bitkiler 16 saat aydınlık ve 25°C 'ye ayarlı iklim odasında inkübasyona tabii tutulmuştur. 25 gün bu şartlarda tutulan bitkicikler daha sonra aynı içerikteki ortamlara aktarılmıştır. 25 gün de yeni ortamlarında inkübasyona tabii tutulan bitkicikler analizler için gerekli büyümeyi 50 günün sonunda tamamlamıştır. Morfolojik ölçüm ve gözlemler yapıldıktan sonra biyokimyasal analizler için sürgünler -20°C 'de saklanmıştır.

Uygulamaların biyokimyasal içeriklere etkisi

Toplam fenolik madde içeriği

Toplam fenolik içeriğinin tayininde Singleton ve Rossi (1965)'nin Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Gallik asit standardına göre sonuçlar hesaplanmış ve mg GAE g^{-1} olarak ifade edilmiştir.

Toplam flavonoid madde içeriği

Toplam flavonoid madde içeriği Zhishen ve ark. (1999)'in belirttiği metodla tayin edilmiştir. Kateşin standardı yardımıyla sonuçlar hesaplanıp mg catechin g^{-1} olarak ifade edilmiştir.

Karotenoid miktarının belirlenmesi

Karotenoid konsantrasyonu; Arnon (1949)'a göre belirlenmiştir. Toplam karotenoid içeriği, taze ağırlık üzerinden Lichtenthaler ve Wellburn (1983)'e göre mg g^{-1} cinsinden hesaplanmıştır.

Prolin miktarının belirlenmesi

Prolin miktarı Bates ve ark. (1973)'nin methoduna göre analiz yapılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{g ml}^{-1}$ şeklinde ifade edilmiş ve D-Proline standardı yardımı ile hesaplanmıştır.

Toplam çözünebilir protein içeriği

Hartree (1972)'nin belirttiği metoda göre toplam protein tayini yapılmıştır. Bovin serum albümin (BSA) standardizasyonu ile sonuçlar hesaplanmış ve mg g^{-1} cinsinden ifade edilmiştir.

Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu Jiang ve ark. (2010)'nın bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit miktarı Sergiev ve ark. (1997)'nin belirttiği yöntemle göre yapılmıştır.

Antioksidan enzim aktiviteleri

Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi

Askorbat peroksidaz analizi Nakano ve ark. (1981)'in belirttiği yöntemle göre analiz edilmiştir. Sonuçlar $\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ protein olarak ifade edilmiştir.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi

Katalaz enzim aktivitesi Beers ve ark. (1952)'nin belirttiği metoda göre yapılmıştır. Sonuçlar U (ünite) g^{-1} protein olarak ifade edilmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Jiang ve ark. (2010)'nın belirttiği yöntemle göre belirlenmiştir. Sonuçlar U (ünite) mg^{-1} protein olarak ifade edilmiştir.

Peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Peroksidaz enzim aktivitesi Jiang ve ark. (2010)'nın bildirdiği yöntemle göre belirlenmiştir. Sonuçlar $\Delta A_{460} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak ifade edilmiştir.

Toplam antioksidan kapasitesi

Toplam antioksidan kapasitesi Kumaran & Karunakaran (2006) tarafından bildirilen DPPH yöntemine göre yapılmıştır. Sonuçlar mg TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) g^{-1} olarak ifade edilmiştir.

İstatistik analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme deseninde göre ve 3 tekerrürlü olarak planlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Minitab 17 paket programı ile varyans analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Tukey çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiş ve önemli çıkan farklılıklar harfler ile gösterilerek belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Borik asit (H_3BO_3) içeren *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkiciklerin, toplam fenolik, flavonoid ve karotenoid miktarları Çizelge 3'te sunulmuştur. Uygulanan H_3BO_3 konsantrasyonları arasında, en yüksek toplam fenolik içeriği $7.6 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ile 43.4 mg L^{-1} B uygulaması; en düşük toplam fenolik içeriği ise kontrol ve 12.4 mg L^{-1} H_3BO_3 uygulamalarından (sırasıyla, 4.6 ve $5.0 \text{ mg GAE g}^{-1}$) elde edilmiştir. Yapılan araştırma sonucu göstermiştir ki, uygulanan H_3BO_3 miktarı arttıkça toplam fenolik miktarı da buna paralel olarak artmıştır. Uygulanan H_3BO_3 konsantrasyonları arasında, en yüksek flavonoid miktarı $1 \text{ mg catechin g}^{-1}$ ile 43.4 mg L^{-1} B uygulamasından; en düşük flavonoid içeriği ise kontrol ($0.6 \text{ mg catechin g}^{-1}$) ve 12.4 mg L^{-1} ($0.7 \text{ mg catechin g}^{-1}$) H_3BO_3 uygulamalarından elde edilmiştir. Yapılan araştırma sonucu göstermiştir ki, uygulanan H_3BO_3 miktarı arttıkça flavonoid miktarı da buna paralel olarak artmıştır. En yüksek karotenoid miktarı (19.7 mg g^{-1} TA) 31 mg L^{-1} H_3BO_3 içeriğine sahip bitkiciklerden elde edilmiştir. En düşük karotenoid içeriğine ($12.27 \text{ mg catechin g}^{-1}$) sahip uygulama grubu ise 37.2 mg L^{-1} H_3BO_3 uygulanan bitkiciklerden elde edilmiştir. Yapılan araştırma sonucu göstermiştir ki, uygulanan H_3BO_3 miktarı arttıkça karotenoid miktarı önce artmış; en yüksek düzeyde H_3BO_3 uygulanan bitkiciklerde ise kontrol grubuyla aynı seviyeye geldiği görülmüştür. B'un alkoller ile kompleks oluşturabilme özelliğinin yanı sıra, B elementi farklı fenoliklerin hidroksil gruplarına da bağlanabilmektedir. Yapılan çok sayıda çalışma sonucunda, B fazlalığına oluşturulan cevapta, fenolik bileşiklerin arttığı ve B toksisitesini gidermeye karşı olası bir mekanizmanın olduğu bildirilmiştir (Landi ve ark., 2015; Pardossi ve ark., 2015). Daha önce yapılan bu çalışmalar ile bulgularımız benzerlik göstermektedir. B konsantrasyonu arttıkça toplam fenolik bileşiklerin strese tepki olarak arttığı sonucunu doğrulamaktadır. Antioksidan olarak ve optik filtreler gibi görev yapan flavonoidler yüksek enerji akışları sonucu meydana gelen hasarlardan bitkiyi korurlar (Stetsenko ve ark., 2020). Flavonoidler aynı zamanda reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimini indükleyerek metal iyonlarını şelatlar ve böylece bitkinin metal stresi karşısında savunmasını destekleyebilir (Khalid ve ark., 2019). Flavonoidler bitkilerin fotosistemindeki klorofillerin aşırı uyarımına karşı koruma ve ROS sinyallerinin algılanması yanında ROS'ların uzaklaştırılmasında da çeşitli rollere sahiptir. Ayrıca, flavonoidlerin, metal şelatlayıcı olarak da bazı metalleri etkisiz hale getirme ve B taşınmasında da kritik bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Landi ve ark., 2014; Kayıhan & Çiftçi, 2016). Bitkiye uygulanan H_3BO_3 miktarı arttıkça bitkide oluşan stres sonucunda bitki yükseltelen B stresine tepki olarak yukarıdaki literatürlerle aynı doğrultuda flavonoid sentezini arttırmıştır. Kontrol grubundan en yüksek H_3BO_3 uygulamasına gidildikçe linear olarak flavonoid seviyesinin arttığı da Çizelge

3'te açıkça görünmektedir. Fotosentetik pigmentlerin ve sistemlerin diğer grubunu da karotenoidler oluşturmakta ve pigment-protein bileşimlerini stabil tutma, fazla ışığı termal ısıya dönüştürme suretiyle yayararak aktif oksijen türleri karşısında fotosentetik araçları korumada rol alırlar (Dankov ve ark., 2009). Model bitki *Arabidopsis*'de B toksistesine bağlı olarak toplam karotenoid miktarının önemli oranda azaldığı Dallı (2022) tarafından bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise karotenoid miktarında parabolik bir değişime rastlanmıştır. H_3BO_3 miktarı arttıkça önce en yüksek değere ulaşmış ($31 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ uygulamasında) ve en düşük değere $37.2 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ uygulamasında indikten sonra; en yüksek H_3BO_3 seviyesinde ise kontrolle aynı değere tekrar dönmüştür.

Çizelge 3. Farklı miktarlarda H_3BO_3 içeren *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkiciklerin biyokimyasal analiz sonuçları
Table 3. Biochemical analysis results of plants grown in *in vitro* conditions containing different amounts of H_3BO_3

| UYGULAMALAR | TOPLAM FENOLİK (mg GAE g ⁻¹) | TOPLAM FLAVANOİD (mg catechin g ⁻¹) | TOPLAM KAROTENOİD (mg g ⁻¹ TA) |
|---|---|--|--|
| Kontrol ($6.2 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$) | 4.61±0.02 ^d | 0.63±0.00 ^e | 14.67±0.54 ^c |
| $12.4 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 5.03±0.19 ^d | 0.66±0.00 ^e | 15.70±0.38 ^c |
| $18.6 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 5.90±0.16 ^c | 0.71±0.02 ^d | 19.12±0.95 ^{ab} |
| $24.8 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 6.39±0.06 ^c | 0.75±0.00 ^d | 16.86±1.13 ^{bc} |
| $31 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 6.46±0.39 ^{bc} | 0.80±0.00 ^c | 19.73±0.88 ^a |
| $37.2 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 7.10±0.09 ^{ab} | 0.87±0.02 ^b | 12.27±0.49 ^d |
| $43.4 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ | 7.58±0.41 ^a | 0.98±0.02 ^a | 16.39±1.19 ^c |

*Aynı sütunda farklı haflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($P \leq 0.05$).

Farklı dozlardaki H_3BO_3 içeren *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkiciklerin, prolin, protein, MDA ve hidrojen peroksit miktarları Çizelge 4'te verilmiştir. H_3BO_3 konsantrasyonları arasında, en yüksek prolin içeriği aynı istatistik grubta yer alan 11.6 ve $11.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ile 43.4 mg L^{-1} ve 37.2 mg L^{-1} B uygulanan bitkiciklerden; en düşük prolin içeriği ise $3.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ile kontrol grubundaki bitkiciklerden elde edilmiştir. B konsantrasyonları arasında, en yüksek protein miktarı 2.3 mg g^{-1} ile $43.4 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ içeriğine sahip bitkiciklerden elde edilmiştir. En düşük protein içeriği ise 0.6 mg g^{-1} ile kontrol grubunda saptanmıştır. En yüksek MDA değeri 26.5 nmol g^{-1} ve en yüksek hidrojen peroksit miktarı $0.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ ile $43.4 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ uygulamasından elde edilirken; en düşük MDA 4.9 nmol g^{-1} ve en düşük hidrojen peroksit $0.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ TA ile kontrol grubundaki ortamlardan elde edilmiştir. Prolin bitkilerde doğal olarak sentezlenen, stres altında koruyucu roller üstlenen, son derece önemli aminoasitlerden biri olarak kabul görmektedir. Stres koşullarında hücrel dokularda fazlaca bulunan aminoasitlerden olan prolinin, bitkilerde serbest O_2 radikallerinin yok edilmesinde görev aldığı bildirilmektedir (Knörzer ve ark., 1999). Farklı bitkiler ile yapılan çalışmalarda stresle artan prolin miktarı ile birlikte strese karşı toleransın da artacağı tespit edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak; farklı bitkilerde farklı seviyelerde arttıkları görülmüştür (Cervilla ve ark., 2007; Rani ve ark., 2008; Giansoldati ve ark., 2012; Landi ve ark., 2013; Hua ve ark., 2021). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda da B konsantrasyonu yani stres arttıkça bitkilerin içerdiği prolin miktarının da paralel bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular Eraslan ve ark. (2005)'nin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Proteinler, abiyotik strese karşı, bitkilerin hücrel adaptasyonu açısından sinyal verme, gen ifadesinin düzenlenmesi, enerji, redoks düzenleme, ozmolit, savunma, mekanik, stres, fitohormon ve sekonder metabolizmaları da dâhil pek çok hücrel işlevde merkezi bir role sahiptirler (Kosová ve ark., 2013). Yapılan bu çalışmada uygulanan H_3BO_3 dozu arttıkça streste üretilen proteinlerin miktarının artmasıyla ilişkili olarak toplam protein miktarında da artış saptanmıştır. Buna göre en yüksek protein içeriği $11.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ ile $43.4 \text{ mg L}^{-1} H_3BO_3$ uygulamasında en düşük ise 0.6 ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir. MDA, bitkilerde strese yol açan çevresel faktörlere cevap olarak değiştiği için oksidatif lipid hasarının göstergesidir (Hodges ve ark., 1999). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürün olan MDA miktarında meydana gelen değişimler ise membranda meydana gelen hasarlar hakkında bilgi

vermektedir. Yapılan bu çalışmada B toksisitesine maruz kalan mersin bitkilerindeki MDA miktarında, 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ uygulanan grupta kontrole göre 5.4 kat artış gözlenmiştir. B toksisitesi gibi abiyotik stresler genellikle süperoksit radikalleri (O₂), hidroksil radikalleri (OH⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi sonunda nükleik asitler, proteinler ve lipidlerin zararlanmasıyla birlikte hücrenin ölümüne meydan verebilecek ROS birikimine neden olan oksidatif stresi tetiklemektedir (Molassiotis ve ark., 2006; Hua ve ark., 2021). Farklı bitkilerde ve farklı seviyelerde yapılan çalışmalarda hidrojen peroksit (H₂O₂) seviyesinin arttığı (Cervilla ve ark., 2007; Rani ve ark., 2008; Giansoldati ve ark., 2012; Landi ve ark., 2013; Acar, ve ark., 2018; Hua ve ark., 2021) görülmüş ve bu sonuçlar bizim çalışmamızla uyum içindedir.

Çizelge 4. Farklı dozlardaki H₃BO₃ içeren *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkiciklerin, prolin, protein, MDA ve hidrojen peroksit miktarları

Table 4. The amount of proline, protein, MDA and hydrogen peroxide data of plants grown in *in vitro* conditions containing different amounts of H₃BO₃

| UYGULAMALAR | PROLİN (µg ml ⁻¹) | PROTEİN (mg g ⁻¹) | MDA (nmol g ⁻¹) | HİDROJEN PEROKSİT (µmol g ⁻¹ TA) |
|--|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|
| Kontrol (6.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃) | 3.28±0.62 ^d | 0.63±0.06 ^g | 4.89±0.19 ^e | 0.29±0.00 ^g |
| 12.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 5.91±0.08 ^b | 1.18±0.01 ^f | 7.67±0.45 ^{de} | 0.33±0.01 ^f |
| 18.6 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 4.61±0.59 ^c | 1.55±0.03 ^e | 10.99±1.90 ^d | 0.38±0.01 ^e |
| 24.8 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 4.62±0.19 ^c | 1.66±0.00 ^d | 16.03±1.81 ^c | 0.41±0.00 ^d |
| 31 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 4.49±0.49 ^c | 1.80±0.01 ^c | 22.67±1.55 ^b | 0.45±0.01 ^c |
| 37.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 11.02±0.27 ^a | 2.14±0.03 ^b | 21.10±0.92 ^b | 0.49±0.00 ^b |
| 43.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 11.62±0.09 ^a | 2.28±0.03 ^a | 26.50±1.47 ^a | 0.54±0.01 ^a |

*Aynı sütunda farklı haflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

Çalışmadan elde edilen antioksidan enzim aktiviteleri sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda tüm parametreler için (APX, SOD, CAT, POD, toplam antioksidan) H₃BO₃ miktarıyla birlikte artış tespit edilmiştir. Yapılan APX analizi sonucunda uygulamalar arasında en düşük değer aynı istatistik grupta yer alan kontrol uygulaması (7.5 mol min⁻¹ g⁻¹) ve 12.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ uygulanan bitkiciklerden elde edilirken; en yüksek APX ortalamaları 37.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ (17.9 mol min⁻¹ g⁻¹) ve 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (19.2 mol min⁻¹ g⁻¹) uygulamalarında gözlemlenmiştir. SOD analiz değerleri incelendiğinde, en düşük değer ortalama kontrol grubunda (1.3 U mg⁻¹) saptanırken; en yüksek değer ise 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (6.5 U mg⁻¹) uygulanan grupta tespit edilmiştir. CAT analiz sonucunda en düşük ortalama kontrol grubunda (1.6 U mg⁻¹), en yüksek 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (2.8 U mg⁻¹) uygulamasında; POD için bu ortalama değerler en düşük kontrol grubunda (0.5 ΔA₄₆₀ min⁻¹ mg⁻¹ protein), en yüksek 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (1.9 ΔA₄₆₀ min⁻¹ mg⁻¹ protein); toplam antioksidan içeriği için ise yine en düşük kontrol grubunda (2.5 mg TEAC g⁻¹) en yüksek ise 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ (15.4 mg TEAC g⁻¹) uygulamasından elde edilmiştir.

Bitkiler, çevrelerindeki koşulların değişmesi sonucunda meydana gelen oksidatif strese cevap verebilmek adına hızlı ve son derece iyi ayarlanmış antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. SOD, CAT, APX en bilinen antioksidanlardır (Gill & Tuteja, 2010). Daha önce farklı B içerikleriyle ilgili yapılan çalışmalarda B miktarı arttıkça; CAT, APX ve SOD aktiviteleri ve miktarı da artmıştır (Cervilla ve ark., 2007; Landi ve ark., 2013; Acar ve ark., 2018). Bu çalışmadan elde edilen bulgularla daha önce yapılan çalışmalar uyum içerisinde olup; mersin bitkisinde B toksisitesi artıkça bitkinin savunma mekanizması devreye girerek enzim aktivitelerini de arttırdığı sonucuna varılmıştır. Çeşitli bitki türlerinde yapılan çalışmalarda abiyotik stres koşulları altında APX enzim aktivitesinde ve gen ekspresyonunda artışlar meydana geldiği gözlenmiş ve bu artışların stres savunmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Beauchamp & Fridovic, 1971; Polidoros ve ark., 1999; Zlatev ve ark., 2006). Bunların aksine, Eraslan ve ark. (2007) *Lactuca sativa* ve Han ve ark. (2009)'da *Citrus grandis* ile yaptıkları araştırmada ise uzun süre B muamelesine maruz kalan bitkilerde APX

aktivitelerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Bu farklılığın bitkinin genetik yapısından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 5. Farklı dozlardaki H₃BO₃ içeren *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkiciklerin antioksidan enzim aktiviteleri
Table 5. Antioxidant enzyme activities of plants grown in *in vitro* conditions containing different amounts of H₃BO₃

| UYGULAMALAR | APX (mol min ⁻¹ g ⁻¹) | SOD (U mg ⁻¹) | CAT (U mg ⁻¹) | POD (ΔA ₄₆₀ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | TOPLAM ANTIOKSİDAN (mg TEAC g ⁻¹) |
|--|---|------------------------------|------------------------------|--|---|
| Kontrol (6.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃) | 7.45±0.46 ^e | 1.34±0.34 ^e | 1.57±0.01 ^f | 0.47±0.03 ^d | 2.52±0.58 ^f |
| 12.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 8.83±0.57 ^e | 1.89±0.05 ^{de} | 1.67±0.02 ^e | 0.59±0.07 ^c | 4.14±0.00 ^{ef} |
| 18.6 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 10.78±0.68 ^d | 2.64±0.60 ^d | 1.75±0.00 ^e | 0.97±0.01 ^b | 5.48±0.58 ^{de} |
| 24.8 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 13.39±0.83 ^c | 3.97±0.47 ^c | 1.83±0.02 ^d | 1.31±0.17 ^b | 6.68±0.57 ^d |
| 31 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 15.68±0.88 ^b | 5.14±0.05 ^b | 2.01±0.01 ^c | 1.58±0.04 ^{ab} | 8.95±0.39 ^c |
| 37.2 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 17.88±0.66 ^a | 5.71±0.40 ^{ab} | 2.11±0.04 ^b | 1.73±0.18 ^a | 12.32±1.09 ^b |
| 43.4 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃ | 19.15±0.57 ^a | 6.51±0.25 ^a | 2.75±0.03 ^a | 1.85±0.06 ^a | 15.42±1.04 ^a |

* Aynı sütunda farklı haflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

Farklı yollarla doğaya yayılan B ve bileşikleri yağışlarla birlikte yer altı su kaynaklarına veya direkt olarak akarsularla birleşerek bu suların kalitesi bakımından kötü sonuçlara neden olabileceği için, özellikle bitkiler açısından önemli bir elementtir. Sulama suları fazla oranda B ihtiva ettiklerinde bitkiler açısından son derece önem arz etmektedir. Çağımızda hayli fazla alanda kullanımı olan B, stratejik öneminin yanı sıra tarımsal açıdan da değerlendirildiği zaman, ortama, dolaylı olarak bitkilere ve çevredeki canlılara şiddetli hasar verebilecek kapasiteye sahiptir. Bu nedendir ki, stratejik değeri dolayısıyla geri kazanımı, tarımsal açıdan bakıldığında da olumsuz etkileri dolayısıyla giderimi şeklinde ortamdaki uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır. Eğer ortamdaki uzaklaştırılması mümkün değilse, B stresine dayanıklı türlerin yetiştiriciliğinin yapılması yönüne gidilmelidir. Çalışmamız sonucunda mersin bitkisi B toksisitesine karşı geliştirdiği içsel mekanizmalar sayesinde B stresine toleranslı olarak değerlendirilebilir. Bitkide B stresi sonucu antioksidan ve antioksidan olmayan enzim aktivitelerinde, biyokimyasal salgılarda artış görülmesine rağmen bitki gelişiminde ciddi bir problem görülmemiştir. Bitkinin kardeşlenmesi, yaprak sayısı, klorofil miktarı gibi önemli gelişim parametrelerinde B miktarı arttıkça azalma görülmüş ancak gelişimi durduracak düzeyde bir zararlanmaya rastlanmamıştır.

Türkiye topraklarının B açısından zengin olması, bitkilerin B stresine daha fazla maruz kalmalarına yol açmaktadır. Kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde B stresine fazla rastlandığı bilinmekte ve küresel iklim değişikliği sebebiyle ülkemizde kurak ve yarı kurak alanlara oldukça yoğun rastlandığından bu durumda B'a dayanıklı bitkilerin yetiştiriciliğine yönelmekte fayda vardır.

In vitro kültür ortamında farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ bileşiğinin mersin bitkisinde bazı fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkilerini tespit etmek amacı ile yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda listelenmiştir.

1. APX, SOD, CAT, POD ve toplam antioksidan değerleri kontrol grubunda (6.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren standart MS ortamı) en düşük seviyede iken, 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren ortamda en yüksek değerleri göstermiştir.
2. Prolin miktarı bakımından en yüksek değerler 37.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ ve 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren ortamlardan elde edilirken en düşük değer yine kontrol ortamındaki bitkilerden elde edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek prolin değeri 37.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ ve 43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren ortamdan sonra 12.4 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren ortamda saptanmıştır.

3. Toplam fenolik, flavanoid, protein gibi strese tolerans mekanizmasında görev alan maddelerin miktarları da antioksidan enzim aktiviteleriyle (APX, CAT, SOD, POD vb.) paralel olarak kontrol grubunda (6.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren standart MS ortamı) en düşük seviyedeysen, en fazla miktarda B içeren ortamda (43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃) en yüksek değerleri göstermiştir.
4. Karotenoid miktarı bakımından yapılan değerlendirmede, en düşük değerler kontrol grubu (6.2 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren standart MS ortamı) ve en fazla miktarda B içeren ortamda (43.4 mg L⁻¹ H₃BO₃) saptanırken, 31 mg L⁻¹ H₃BO₃ içeren ortamda en yüksek karotenoid değeri (19.7 mg g⁻¹) alınmıştır.
5. Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'nın stresin yoğunluğunun artmasıyla birlikte arttığı, buna paralel olarak en yüksek H₃BO₃ içeren ortamda en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir.

Sonuçlar bütünüyle ele alındığında mersin bitkisinin, içsel mekanizmalarla strese başa çıktığı böylece B toksisitesine karşı toleranslı olduğu sonucuna varılmıştır. Küresel iklim değişikliği sebebiyle görülen kuraklık ve B toksisitesinin de kurak ve yarı kurak bölgelerde daha yoğun görüldüğü, aynı zamanda ülkemizde B madenlerinin ve kullanım alanının fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde gün geçtikçe B ile kirlenen topraklarla daha fazla karşılaşılacağı kaçınılmaz bir gerçek olarak karşımızdadır. Bu bakımdan B'a toleranslı bitki tür ve çeşitlerinin belirlenmesi ve bu alanlarda yetiştiriciliğinin yapılması ile B ile kirlenen toprakların bitkisel üretim alanı dışında kalması engellenmiş olacaktır.

Ancak yine de *in vitro* şartlarda yapılan bu çalışmada her ne kadar mersin bitkisinin B stresine toleranslı olduğu tespit edilmiş olsa da, kesin olarak B'a toleranslı olduğunu söyleyebilmemiz için, bahçe şartlarında da daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler. Bu çalışma birinci yazarın yüksek lisans tezinin bir bölümüdür.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

ETİK ONAY BEYANI

Bu makalede insan veya hayvan deneklerle herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle etik onaya gerek duyulmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Acar, Y.S., İşkil, R., & Erden, Y. (2018). Bor stresi altında *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi. *Journal of Boron*, 3 (3), 145-150. <https://doi.org/10.30728/boron.409349>
- Akan, S., Taşkın, M.B., Horzum, Ö., & Akça H. (2022). Azot ve bor gübrelemesinin kırmızı pancarın depolama sürecinde besin elementi konsantrasyonlarına etkisi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27 (1), 115-124. . <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1054932>
- Akula, R., & Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (11), 1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24 (1), 1.
- Aydın, C., & Özcan, M.M. (2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 79 (2), 453-458.

- Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39 (1), 205-207.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Beers, R.F., & Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195 (1), 133-140.
- Berger, K.C. (1949). Boron in soils and crops. *Advances in Agronomy*, 1, 321-351. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60752-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60752-X)
- Brdar-Jokanović, M. (2020). Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (4), 1424. <https://doi.org/10.3390/ijms21041424>
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., & Ruiz, J.M. (2007). Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany*, 100 (4), 747-756. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm156>
- Çevik, İ.H., & Tari, A.F. (2019). Sulama suyundaki farklı bor düzeylerinin pamuğun (*Gossypium hirsutum* L.) gelişimine etkisi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24 (Özel Sayı), 16-23.
- Dallı, E. (2022). *Arabidopsis thaliana*'da tuz ön uygulaması ile bor tolerans kazanımında antosiyaninin çoklu fonksiyonel rollerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 101 s.
- Dankov, K., Busheva, M., Stefanov, D., & Apostolova, E.L. (2009). Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96 (1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.004>
- Dawson, F.A. (1994). The amazing terpenes. *Naval Stores Review*, 104, 6-12.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. (2007). Boron toxicity alters nitrate reductase activity, proline accumulation, membrane permeability, and mineral constituents of tomato and pepper plants. *Journal of Plant Nutrition*, 30 (6), 981-994. <https://doi.org/10.1080/15226510701373221>
- Eraydın, E. (2000). Topraklarda bor adsorpsiyonu üzerine bazı anyonların etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, 70 s.
- Erlaçın, S., & Erciyas, E. (1978). *Myrtus communis* L. (Mersin bitkisi) yapraklarının tanen yönünden incelenmesi. *Doğa Bilim Dergisi*, 2 (1), 75-79.
- Giansoldati, V., Tassi, E., Morelli, E., Gabellieri, E., Pedron, F., & Barbaferri, M. (2012). Nitrogen fertilizer improves boron phytoextraction by *Brassica juncea* grown in contaminated sediments and alleviates plant stress. *Chemosphere*, 87 (10), 1119-1125. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.005>
- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., & Zhang, C. (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169 (2), 313-321. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.023>
- Han, S., Tang, N., Jiang, H.X., Yang, L.T., Li, Y., & Chen, L.S. (2009). CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Science*, 176 (1), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.10.004>
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry*, 48 (2), 422-427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2)
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 7 (11), 1456-1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>

- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., & Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207 (4), 604-611.
- Hua, T., Zhang, R., Sun, H., & Liu, C. (2021). Alleviation of boron toxicity in plants: Mechanisms and approaches. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51 (24), 2975-3015. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1807451>
- Jiang, T., Jahangir, M.M., Jiang, Z., Lu, X., & Ying, T. (2010). Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 56 (3), 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.01.011>
- Kayihan, D.S., Kayihan, C., & Çiftçi, Y.Ö. (2016). Excess boron responsive regulations of antioxidative mechanism at physio-biochemical and molecular levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.016>
- Khalid, M., Bilal, M., & Huang, D.F. (2019). Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens-A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18 (1), 211-230. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62555-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4)
- Knörzer, O.C., Lederer, B., Durner, J., & Böger, P. (1999). Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiologia Plantarum*, 107 (3), 294-302. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100306.x>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášilová, P., & Prášil, I.T. (2013). Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum*, 57 (1), 105-112.
- Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2006). Antioxidant activities of the methanol extract of *Cardiospermum halicacabum*. *Pharmaceutical Biology*, 44 (2), 146-151. <https://doi.org/10.1080/13880200600596302>
- Landi, M., Guidi, L., Pardossi, A., Tattini, M., & Gould, K.S. (2014). Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Planta*, 240 (5), 941-953.
- Landi, M., Pardossi, A., Remorini, D., & Guidi, L. (2013). Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.08.008>
- Landi, M., Tattini, M., & Gould, K.S. (2015). Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4-17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>
- Lichtenthaler, H.K., & Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., & Therios, I. (2006). Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*, 56 (1), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.002>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Nakano, H., Yamauchi, J., & Hashimoto, S. (1981). Sunflower spiral antenna. *IEICE Transactions (1976-1990)*, 64 (12), 763-769.
- Oğur, R. (1994). Mersin bitkisi (*Myrtus communis* L.) hakkında bir inceleme. *Çevre Dergisi*, 10 (1), 21-25.
- Ödemiş, B., & Uncu, S. (2022). Determining effects of foliar boron applications on yield and fruit quality of apricot trees for reducing water stress. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27 (1), 47-60. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1009679>

- Pardossi, A., Romani, M., Carmassi, G., Guidi, L., Landi, M., Incrocci, L., & Ziliani, M. (2015). Boron accumulation and tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) with green or purple leaves. *Plant and Soil*, 395 (1), 375-389. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2571-9>
- Pezeshki, S.R. (1994). *Plant response to flooding*. In: Wilkinson, R.E. (Ed.). *Plant-environment interactions* (s.289-321). New York, USA.
- Polidoros, A.N., & Scandalios, J. G. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, 106 (1), 112-120.
- Rani, C.H.A.M.P.A., Sharma, P.K., Kumar, B., Angrish, R., & Datta, K.S. (2008). Alleviation of boron-salt toxicity by calcium in wheat through associated changes in antioxidant defense system. *Indian Journal of Plant Physiology*, 13 (1), 21-28.
- Sairam, R.K., & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 407-421.
- Serce, S., Ercisli, S., Sengul, M., Gunduz, K., & Orhan, E. (2010). Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *Pharmacognosy Magazine*, 6 (21), 9. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.59960>
- Sergiev, I., Alexieva, V., & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 51 (3), 121-124.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.
- Soy, M., & Güneş, A. (2003). Fosforun domates (*Lycopersicon esculentum* L.) bitkisinde bor toksisitesini önlemede etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 9 (3), 273-277.
- Stetsenko, L.A., Pashkovsky, P.P., Voloshin, R.A., Kreslavski, V.D., Kuznetsov, V.L.V., & Allakhverdiev, S.I. (2020). Role of anthocyanin and carotenoids in the adaptation of the photosynthetic apparatus of purple-and green-leaved cultivars of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to high-intensity light. *Photosynthetica*, 58 (4), 890-901. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.048>
- Vuran, N.E., & Türker, M. (2021). Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik uygulamalar. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33 (3), 487-498. <https://doi.org/10.7240/jeps.900129>
- Wink, M. (2010). Annual plant reviews, functions and biotechnology of plant secondary metabolites. *John Wiley & Sons*, 1-20.
- Yeğin, A.B., & Halil, U. (2015). Mersin (*Myrtus communis* L.) meyvelerinin fenolik bileşik içerikleri. *Derim*, 32 (1), 81-88. <https://doi.org/10.16882/derim.2015.27431>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 (4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zinkel, D.F., & Russell, J. (1989). *Naval Stores. Production, Chemistry, Utilization*. Pulp Chemicals Association. Inc. New York, NY. 1059 p.
- Zlatev, Z.S., Lidon, F.C., Ramalho, J.C., & Yordanov, I.T. (2006). Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum*, 50 (3), 389-394.