



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BRASSİNOSTEROİDLERİN ARPADA (*HORDEUM VULGARE*  
L.) KÖK BÜYÜMESİ, ANTIOKSİDANT SİSTEM VE HÜCRE  
BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gönül KARTAL**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**

**Mayıs, 2008**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BRASSİNOSTEROİDLERİN ARPADA (*HORDEUM VULGARE*  
L.) KÖK BÜYÜMESİ, ANTIOKSİDANT SİSTEM VE HÜCRE  
BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gönül KARTAL**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**

**Mayıs, 2008**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 27/05/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi




Danışman Adı (Danışman)  
Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Jüri Adı  
Prof.Dr. Güler TEMİZKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Jüri Adı  
Prof.Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Jüri Adı  
Prof.Dr. Keriman GÜNAYDIN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Jüri Adı  
Prof.Dr. Ahmet ZEHİR  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-1369 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Tez çalışmam boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı değerli hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında yetiştirmeme katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyeleri ve yardımcılarına teşekkürü borç bilirim.

Eğitimimin her aşamasında bana destek olan aileme, özellikle beni manevi olarak sürekli destekleyen anneme, tezimin yazım aşamasında bana yardım eden kardeşim Gülümser KARTAL'a çok teşekkür ederim.

**Mayıs, 2008**

**Gönül KARTAL**

## İÇİNDEKİLER

|   |     |
|---|-----|
| ÖNSÖZ .....   | i   |
| İÇİNDEKİLER .....   | ii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....  | v   |
| TABLO LİSTESİ .....   | vi  |
| SEMBOL LİSTESİ .....  | vii |
| ÖZET .....  | x   |
| SUMMARY .....   | xi  |
| 1. GİRİŞ .....  | 1   |
| 2. GENEL KISIMLAR .....   | 3   |
| 2.1. ARPANIN TAKSONOMİSİ.....                                   | 3   |
| 2.2. ARPANIN EMBRİYOLOJİSİ VE MORFOLOJİSİ.....                  | 3   |
| 2.3. BİTKİLERDE SENTEZLENEN BRASSİNOSTEROİDLER.....             | 8   |
| 2.4. BRASSİNOSTEROİDLERİN BİYOSENTEZİ.....                      | 12  |
| 2.4.1. Erken C6 Oksidasyon Yolu.....                            | 14  |
| 2.4.2. Geç C6 Oksidasyon Yolu .....                             | 14  |
| 2.5. BRASSİNOSTEROİDLERİN NUKLEUSA İLETİMİ VE TAŞINMALARI ..... | 15  |
| 2.6. BRASSİNOSTEROİDLERİN GEN ANLATIMINA ETKİLERİ .....         | 19  |
| 2.7. BRASSİNOSTEROİDLERİN ANTİVİRAL ETKİLERİ .....              | 19  |
| 2.8. BRASSİNOSTEROİDLERİN FİZYOLOJİK ETKİLERİ .....             | 20  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.9. BRASSİNOSTEROİDLERİN ANTIOKSİDANT ETKİLERİ .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.10. BRASSİNOSTEROİDLERİN PROTEİN MİKTARINA ETKİLERİ.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.11. BRASSİNOSTEROİDLERİN HÜCRE BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.1. ARPA TOHURLARININ ÇİMLENDİRİLMESİ .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.2. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ ARPA KÖKLERİNDEN PREPARAT HAZIRLANMASI, MİTOTİK İNDEKSİN VE MİTOTİK ANORMALİLERİN BELİRLENMESİ .....</b> | <b>29</b> |
| <b>3.3. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ KÖKLERDE HİSTOLOJİK ANALİZLERİN YAPILMASI.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3.3.1. DAPI Boyama.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>3.3.2. İKI Boyama (Lugol Boyama).....</b>  | <b>30</b> |
| <b>3.4. TOTAL ÇÖZÜLEBİLİR PROTEİN ANALİZLERİ VE OKSİDATİF STRES ENZİMLERİNİN AKTİVİTE TAYİNLERİ.....</b>                                    | <b>30</b> |
| <b>3.4.1. Total Çözülebilir Protein İzolasyonu.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3.4.2. Total Çözülebilir Protein Miktarı Analizleri ve Oksidatif Stres Enzimlerinin Aktivite Tayinleri.....</b>                          | <b>31</b> |
| <b>3.4.2.1. Protein Miktarının Ölçümü .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.4.2.2. Katalaz Aktivitesi .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>3.4.2.3. Peroksidaz Aktivitesi .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.4.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4. BULGULAR .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.1. BRASSİNOSTEROİDLERİN KÖK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.2. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ ARPA KÖK PREPARATLARI, MİTOTİK İNDEKS VE MİTOTİK ANORMALİLER.....</b>                                    | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3. BRASSINOSTEROİD UYGULANMIŞ KÖKLERDE HİSTOLOJİK ANALİZLER .....</b>             | <b>39</b> |
| <b>4.4. TOTAL ÇÖZÜLEBİLİR PROTEİN MİKTARI VE OKSİDATİF STRES ENZİM ANALİZLERİ.....</b> | <b>43</b> |
| <b>4.4.1. Total Çözülebilir Protein Miktarı Analizi.....</b>                           | <b>43</b> |
| <b>4.4.2. Oksidatif Stres Enzim Analizleri.....</b>                                    | <b>43</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>EKLER .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>  | <b>63</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 1.1  | : 28-Homobrassinolid'in kimyasal yapısı.....                      | 2  |
| Şekil 2.1  | : Arpa başaklarının sıralanması .....                             | 4  |
| Şekil 2.2  | : Tek bir arpa çiçeğinin ve braktelerinin yapısı (başakçık) ..... | 4  |
| Şekil 2.3  | : Arpa tohumunun ventral (a) ve dorsal (b) görünümleri .....      | 5  |
| Şekil 2.4  | : Arpa tohumu anatomisi.....                                      | 6  |
| Şekil 2.5  | : Arpa tohumunun çimlenme anatomisi .....                         | 6  |
| Şekil 2.6  | : BR hormonlarının kimyasal formülleri .....                      | 9  |
| Şekil 2.6  | : BR hormonlarının kimyasal formülleri .....                      | 10 |
| Şekil 2.7  | : Steroid hormonlarının yapısı.....                               | 11 |
| Şekil 2.8  | : Brassinolidin biyosentezi .....                                 | 13 |
| Şekil 2.9  | : BRI1 ve BAK1 reseptör kinazlarının yapıları.....                | 15 |
| Şekil 2.10 | : BR sinyalleşmesinin yeni modeli.....                            | 17 |
| Şekil 2.11 | : BR'nin hücre içinde ve dışında taşınması.....                   | 18 |
| Şekil 3.1  | : Çalışma sırasında izlenen ana aşamalar .....                    | 29 |
| Şekil 3.2  | : 'Guaiacol' (2-metoksifenol)'un kimyasal yapısı.....             | 33 |
| Şekil 4.1  | : Çimlenen arpa tohumları (48 saat) .....                         | 35 |
| Şekil 4.2  | : Çimlenen arpa tohumları (72 saat) .....                         | 37 |
| Şekil 4.3  | : 1 µM BR uygulanmış arpa kök uçlarında mitoz .....               | 39 |
| Şekil 4.4  | : Kontrol ve 1 µM BR gruplarında mitoz bölünme .....              | 39 |
| Şekil 4.5  | : Arpa kök uçlarında mitotik anormaliler .....                    | 39 |
| Şekil 4.6  | : DAPI ile boyanmış arpa kök ucu (1 µM BR) .....                  | 40 |
| Şekil 4.7  | : DAPI ile boyanmış arpa kök ucu (kontrol) .....                  | 41 |
| Şekil 4.8  | : IKI (Lugol) ile boyanmış arpa kök ucu (1 µM BR) .....           | 42 |
| Şekil 4.9  | : IKI (Lugol) ile boyanmış arpa kök ucu (kontrol).....            | 42 |
| Şekil 4.10 | : BR'nin protein miktarına etkisi.....                            | 43 |
| Şekil 4.11 | : BR'nin katalaz aktivitesine etkisi.....                         | 45 |
| Şekil 4.12 | : BR'nin peroksidaz aktivitesine etkisi.....                      | 45 |
| Şekil 4.13 | : BR'nin süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi .....            | 46 |

## TABLO LİSTESİ

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tablo 4.1</b> | : Arpa tohumu kök boyu uzunlukları (48 saat).....  | 36 |
| <b>Tablo 4.2</b> | : Arpa tohumu kök boyu uzunlukları (72 saat).....  | 37 |
| <b>Tablo 4.3</b> | : Arpa tohumu kök hücrelerinin mitotik indeksleri .....  | 38 |
| <b>Tablo 4.4</b> | : BR'nin katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerine ve total çözülebilir protein miktarına etkisi ..... | 44 |

## SEMBOL LİSTESİ

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>2,4-D</b>          | : 2,4-diklorofenoksiasetik asit                            |
| <b>ABA</b>            | : absisik asit   |
| <b>Anova</b>          | : farklılık analizi ‘analysis of variance’                 |
| <b>APOD</b>           | : askorbat peroksidaz                                      |
| <b>BAK1</b>           | : BRI1-associated receptor kinase 1                        |
| <b>BAP</b>            | : benzoamino purin   |
| <b>BES1</b>           | : BRI1-EMS-supressor 1                                     |
| <b>BGR filtresi</b>   | : mavi, yeşil ve kırmızı filtre ‘blue, green, red’         |
| <b>BIM</b>            | : BES1-interacting Myc-like protein                        |
| <b>BIN2</b>           | : brassinosteroid insensitive 2                            |
| <b>BKI1</b>           | : BRI1 kinase inhibitor 1                                  |
| <b>BL</b>             | : brassinolid  |
| <b>BPCS</b>           | : biotin-tagged photoaffinity castasterone                 |
| <b>BR</b>             | : brassinosteroid  |
| <b>BRI1</b>           | : brassinosteroid-insensitive 1                            |
| <i>bri1-1</i>         | : <i>brassinosteroid-insensitive 1-1</i> geni              |
| <b>BRS1</b>           | : BRI1-suppressor 1  |
| <b>BSA</b>            | : bovine serum albumine                                    |
| <b>BSU1</b>           | : brassinosteroid insensitive 1 suppressor 1               |
| <b>BY-2</b>           | : bright yellow-2  |
| <b>BZR1</b>           | : brassinazole-resistant 1                                 |
| <i>cbb3</i>           | : BR biyosentezinden sorumlu gen ‘ <i>cabbage3</i> ’       |
| <b>CDC2b</b>          | : sikline bağımlı kinaz 2b ‘cyclin-dependent kinase’       |
| <b>C değeri</b>       | : belli bir türün haploid genomundaki DNA miktarı          |
| <b>cm</b>             | : santimetre   |
| <b>C°</b>             | : santigrad derece   |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | : karbondioksit  |
| <b>CT</b>             | : C-terminal   |
| <b>cv</b>             | : kültür varyetesi ‘cultivar’                              |
| <b>CycD3</b>          | : D3 tipi siklin geni                                      |
| <b>DAPI</b>           | : 4',6-diamidino-2-fenilindol                              |
| <b>dak</b>            | : dakika   |
| <i>det2</i>           | : BR biyosentezinden sorumlu gen ‘ <i>deetiolated2</i> ’   |
| <i>det2-1</i>         | : BR biyosentezinden sorumlu gen ‘ <i>deetiolated2-1</i> ’ |
| <b>DNA</b>            | : deoksiribonukleik asit                                   |
| <i>dwf1-6</i>         | : BR biyosentezinden sorumlu gen ‘ <i>dwarf1-6</i> ’       |
| <b>E-box</b>          | : DNA’daki CACGTG dizilerinden oluşan kutu                 |
| <b>EBR</b>            | : 24-epibrassinolid  |
| <b>EC</b>             | : ‘Enzyme Commission’                                      |
| <b>EDTA</b>           | : etilendiamintetraasetik asit                             |
| <b>EKS</b>            | : 24-epikastasteron  |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>ER</b>                         | : endoplazmik retikulum  |
| <b>g</b>                          | : yer çekimi ivmesi 'gravity'  |
| <b>GA</b>                         | : gibberellik asit   |
| <b>Ga1-3</b>                      | : gibberellin biyosentezinden sorumlu gen                              |
| <b>Ga2-1</b>                      | : gibberellin biyosentezinden sorumlu gen                              |
| <b>Ga3-1</b>                      | : gibberellin biyosentezinden sorumlu gen                              |
| <b>GH3</b>                        | : Arabidopsis'te IAA'ya yanıtta sorumlu protein 'glycosyl hydrolase 3' |
| <b>gr</b>                         | : gram   |
| <b>GR</b>                         | : glutasyon redüktaz   |
| <b>HBR</b>                        | : 28-homobrassinolid   |
| <b>HCl</b>                        | : hidrokolik asit  |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>             | : su   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : hidrojen peroksit  |
| <b>IAA</b>                        | : indol asetik asit  |
| <b>IAA14</b>                      | : 'auxin-responsive AUX/IAA family gene'                               |
| <b>IAA2</b>                       | : auxin-responsive 'indoleacetic acid-induced gene 2'                  |
| <b>ID</b>                         | : island domain  |
| <b>IKI</b>                        | : iodine potassium iodide  |
| <b>JM</b>                         | : juksta membran   |
| <b>KAT</b>                        | : katalaz  |
| <b>KS</b>                         | : kastasteron  |
| <b>KV</b>                         | : kızamık virusu   |
| <b>LRR</b>                        | : leucine rich repeat  |
| <b>MF</b>                         | : monoformazan   |
| <b>mg</b>                         | : miligram   |
| <b>mM</b>                         | : milimolar  |
| <b>MS</b>                         | : Murashige and Skoog besi yeri  |
| <b>N</b>                          | : normal   |
| <b>NaCl</b>                       | : sodyum klorür  |
| <b>NADP<sup>+</sup></b>           | : nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksiteilmiş)                  |
| <b>NaOH</b>                       | : sodyum hidroksit   |
| <b>NBT</b>                        | : p-nitrobluetetrazolium chloride                                      |
| <b>ng</b>                         | : nanogram   |
| <b>NIT3</b>                       | : 'nitrate reductase3' proteini  |
| <b>nm</b>                         | : nanometre  |
| <b>*O</b>                         | : singlet oksijen  |
| <b>OD</b>                         | : optik dansite  |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>  | : süperoksit radikali  |
| <b>OH<sup>-</sup></b>             | : hidroksil radikali   |
| <b>P</b>                          | : olasılık 'probability'   |
| <b>P-BES1</b>                     | : BES1'in fosforile olmuş biçimi                                       |
| <b>PBS</b>                        | : fosfat buffered saline   |
| <b>P-BZR1</b>                     | : BZR1'in fosforile olmuş biçimi                                       |
| <b>pg</b>                         | : pikogram   |
| <b>pH</b>                         | : hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması 'power of hydrogen'      |
| <b>POD</b>                        | : peroksidaz   |
| <b>ppm</b>                        | : parts per million  |
| <b>PS I</b>                       | : photo system I   |
| <b>PS II</b>                      | : photo system II  |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>RLK</b>               | : receptor-like kinase  |
| <b>RNA</b>               | : ribonukleik asit  |
| <b>SD</b>                | : standart sapma 'standart deviation'                                   |
| <b><i>sly1</i></b>       | : giberrellin sinyalini pozitif olarak düzenleyen gen ' <i>sleepy</i> ' |
| <b>SOD</b>               | : süperoksit dismutaz   |
| <b>TRIP1</b>             | : TGF $\beta$ -receptor-interacting protein 1                           |
| <b>TTL</b>               | : trans-tryretin-like protein   |
| $\Delta A_{240}$         | : 240 nm dalga boylu ışıpta ölçülen absorbansın zamanla değişimi        |
| $\Delta A_{470}$         | : 470 nm dalga boylu ışıpta ölçülen absorbansın zamanla değişimi        |
| $A_{560}$                | : 560 nm dalga boylu ışıpta ölçülen absorbans                           |
| <b><math>\mu</math>l</b> | : mikrolitre  |
| <b><math>\mu</math>M</b> | : mikromolar  |

## ÖZET

### BRASSINOSTEROİDLERİN ARPADA (*HORDEUM VULGARE* L.) KÖK BÜYÜMESİ, ANTIOKSİDANT SİSTEM VE HÜCRE BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Brassinosteroidler (BR) bitkilerde endojen olarak bulunan steroid özellik ve yapıdaki hormonlardır. BR'lerin bitkilerde mitoz evresindeki hücrelerin sayısını artırmasının yanı sıra hücre genişlemesi, ksilem farklılaşması, tohum çimlenmesi, vejetatif büyüme ve apikal dominansı etkileme gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu hormonlar bitkiye abiyotik stres durumlarında dayanıklılık kazandırır.

Bu çalışmada arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer 160) tohumları 1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M ve 0.1  $\mu$ M BR hormonu içeren çözeltide filtre kağıtları arasında karanlıkta bitki büyüme kabiniinde 25°C'de çimlendirildi. Kontrol grubu için yalnızca distile su kullanıldı. BR'nin kök gelişimi üzerine ve kök uçlarındaki sitogenetik etkileri araştırıldı. 48 saatlik kök uçları iyotlu potasyum iyodür (IKI) ile ve %45'lik asetik asit hidrolizinden sonra '4',6-diamidino-2-fenilindol' DAPI ile boyanarak fluoresan mikroskop altında incelendi. BR etkisinde bırakılan kök uçlarında genişlemeye ve aktif bölünmeye rastlandı. Çimlenen arpa tohumu köklerinden aseto orsein boyama teknikleri ile preparatlar yapıldı. 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M BR hormonu içeren çözeltiler içerisinde çimlenen arpa tohumlarında BR'nin 48 saat içerisinde artan kontrasyona bağlı olarak kök uzunluğunu ve mitoz bölünme evresinde bulunan hücre sayısını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdığı gözlemlendi. Bunun yanısıra BR'nin arpada total çözülebilir protein miktarına, katalaz (EC 1.11.1.6), peroksidaz (EC 1.11.1.7) ve süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) enzim aktivitelerine etkileri belirlendi. Arpa kök ucunda BR uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin azaldığı, süperoksit dismutaz aktivitesinin ise 0.5 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda BR uygulanan gruplarda azaldığı tespit edildi. Total çözülebilir protein miktarının kontrol grubuna göre 0.1 ve 0.5  $\mu$ M konsantrasyonda artış, 1  $\mu$ M konsantrasyonda ise azalma gösterdiği belirlendi. Sitogenetik ve sitohistolojik analizler sonucu elde edilen bulguların BR'lerin etki mekanizmasının ve arpa kök gelişiminin anlaşılmasına ve uygulamada malt sanayine katkılar sağlanması beklenmektedir.

## SUMMARY

### EFFECTS OF BRASSINOSTEROIDS ON BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) ROOT GROWTH, ANTIOXIDANT SYSTEM AND CELL DIVISION

Brassinosteroids (BRs) are endogenous plant hormones which have steroidal character and structure. BRs affect several biological processes, including cell expansion, xylem differentiation, seed germination, vegetative growth and promotion of apical dominance. Brassinosteroids confer resistance to plants against various abiotic stresses.

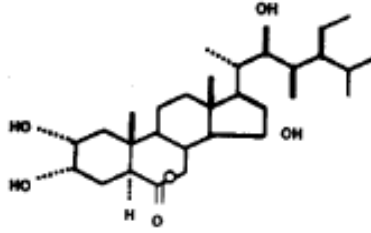
In this study, barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer 160) seeds were germinated in the dark at 25°C temperature in plant growth cabin, between filter papers which contain three different concentrations of BRs; 1 µM, 0.5 µM and 0.1 µM and using only distilled water for control groups. Effects of BRs on root growth were investigated and cytogenetic effects in root tips were also studied. Barley root tips obtained from germination of barley seeds during 48 hours were stained with iodine potassium iodide (IKI) and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) after the hydrolysis with 45 % acetic acid. Then they were analysed with fluorescent microscope (DM4000 B, Leica). Cell expansion and active cell division were observed in BR applied root tips. Preparations were made from germinated root tips with aceto orcein staining techniques. Root length of barleys which were germinated in solutions of 0.1 µM, 0.5 µM and 1 µM BR and number of cells in mitosis increased at significant level with respect to increasing dose of BR when compared with control group during 48 hours. In addition to this, effects of BRs on total soluble protein content, catalase (EC 1.11.1.6), peroxidase (EC 1.11.1.7) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activities were investigated in barley root tips. Comparing the control group, with the one which was treated with BR, showed a decrease in catalase and peroxidase activities. 0.5 and 1 µM concentration of BR caused decrease in superoxide dismutase activity comparing to untreated control. It was observed that the total soluble protein concentration was increasing at 0.1 and 0.5 µM BR and decreasing at 1 µM BR compared to untreated control. It is anticipated that data obtained from cytogenetic and histogenetic assays contribute to the understanding of BR mechanisms and root growth of barley and also could contribute to the malt industry.

## 1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) *Poaceae* ailesinden *Triticeae* sınıfının bir üyesi olan önemli bir tahıl bitkisi olmasının yanısıra biyokimyacılar, fizyologlar, genetikçiler ve moleküler biyologlar için çok önemli bir model organizmadır. Arpa diploid kromozom sayısı  $2n=14$  olan, ılıman iklim bölgesinde yetişen, taneleri hayvan yemi, ekmek ve bira yapımında kullanılan bir bitkidir. Arpanın genom boyutu haploid genom başına yaklaşık olarak  $5.36 \times 10^9$  bç, nuklear DNA 1C değeri 5.5 pikogram (pg), nuklear DNA 2C değeri 10.9 pg, nuklear DNA 4C değeri ise 21.9 pg'dır (Bennett ve diğ., 2000). Arpa dünyada tahıllar içinde üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer almaktadır (FAO, 2008). Türkiye'de ise üretim bakımından buğdaydan sonra 2. sıradadır (Toprak Mahsulleri Ofisi, 2008). Arpa 35 yılı aşkın bir süredir İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki genetik temelli çalışmalarda model sistem olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada arpa kökleri üzerine sitogenetik etkileri araştırılan brassinosteroidler (BR) steroid özellikte bitki hormonlarıdır. Bu hormonlar oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen olarak adlandırılan bitki hormonu gruplarından sonra altıncı ve yeni bir bitki hormonu grubunu oluşturmaktadır. BR'lerin bitkilerde mitoz evresindeki hücrelerin sayısını artırmasının (Howell ve diğ., 2007) yanı sıra hücre genişlemesi, ksilem farklılaşması (Cano-Delgado ve diğ., 2004), tohum çimlenmesi, vejetatif büyüme, apikal dominansı (Steber ve McCourt, 2001, Chen ve diğ., 2004) ve senesensi (Sağlam-Çağ, 2007) etkileme gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu hormonlar bitkiye abiyotik stres durumlarında da dayanıklılık kazandırır (Kagale ve diğ., 2007). BR'ler hücre zarında konumlanmış olan brassinosteroid reseptör proteinleri tarafından algılanırlar ve hücrenin nukleusuna kadar ulaşacak olan bir sinyal yolunun başlatılmasını sağlarlar. Hücre nukleusuna kadar ulaşan sinyal ilgili genin/genlerin anlatımını etkileyerek bitkide çeşitli özelliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. BR'nin özellikle hücre bölünmesi ile ilişkili genlerin anlatımlarını artırarak hücre bölünmesini etkiledikleri bildirilmiştir (Li ve Jin, 2006).

Tarım ürünleri besin ihtiyacının karşılanmasında çok önemli bir yer tutar. Temel besin ihtiyaçlarının karşılanmasında veriminin ve ekonomik değeri yükseltici özelliklerin artırılmasına yönelik çalışmaların yapılması en önemli araştırma alanını oluşturur. Bu tez çalışmasında daha önce elde edilen bulguların ışığında brassinosteroid hormonlarının arpa (*Hordeum vulgare* L.) üzerine sitogenetik etkileri belirlendi. Çalışmada bir BR hormonu çeşidi olan 28-Homobrassinolid (HBR) kullanıldı. Arpa tohumları 0.1, 0.5, 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 28-Homobrassinolid (Şekil 1.1) içeren çözeltiler içerisinde çimlendirildi. Kontrol grubu için distile su kullanıldı. Bu tez çalışması süresince yapılan analizler sırasında BR'nin arpa tohumları çimlenmesine, kökteki mitotik indekse, bölünme anormalilerine, katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz enzimleri aktivitelerine ve total çözülebilir protein miktarına olan etkileri belirlendi. Bu tez çalışması ile BR hormonlarının arpa kökleri üzerine olan sitogenetik etkileri ilk kez değerlendirildi.



Şekil 1.1 28-Homobrassinolid'in kimyasal yapısı (Rao ve diğ., 2002)

BR etkileri bir çok farklı bitki türünde değişik amaçlarla araştırılmasına karşın arpada tohum çimlenmesi üzerine kapsamlı bir çalışmanın bulunmayışı ve arpanın malt sanayinde çimlenme özelliklerinin önemli olması ve İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde arpanın uzun yıllardan bu yana model organizma olarak kullanılması bu tez çalışmasında arpa bitkisinin seçilmesine temel oluşturmuştur.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. ARPANIN TAKSONOMİSİ

**Alem:** *Plantae*

**Altalem:** *Tracheobionta*

**Üstşube:** *Spermatophyta*

**Şube:** *Magnoliophyta – Angiospermae*

**Sınıf:** *Triticeae – Monocotyledoneae*

**Altsınıf:** *Commelinidae*

**Takım:** *Cyperales*

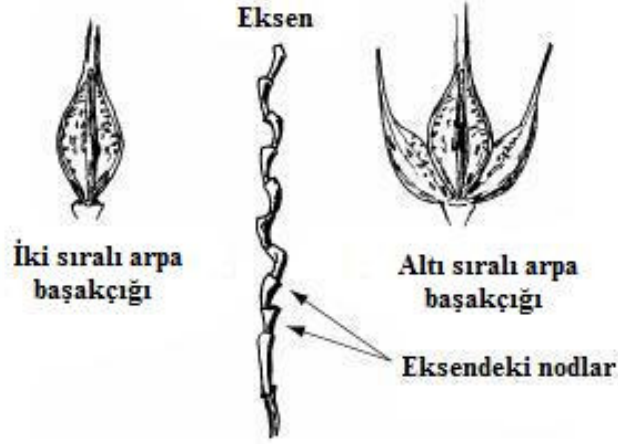
**Aile:** *Poaceae*

**Cins:** *Hordeum – arpa*

**Tür:** *Hordeum vulgare* (Gramene, 2008)

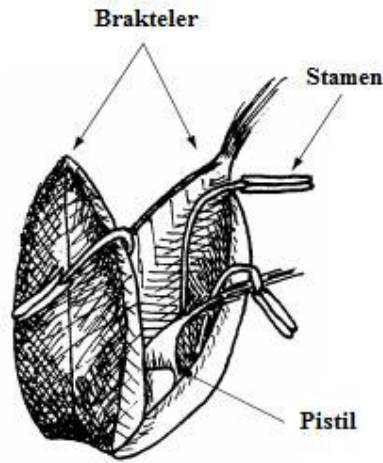
### 2.2. ARPANIN EMBRİYOLOJİSİ VE MORFOLOJİSİ

Arpa tek yıllık bir uzun gün bitkisidir. Fakat değişik gün uzunluklarına da uyabilir. Tahıllar içerisinde en çok kardeşlenenlerden olup olağan durumda 5 - 8 kardeş verir. Bitki boyu ortalama 35-100 santimetre (cm) kadardır. Başakları ortalama 8 - 15 cm boyunda olup 2, 4 ve 6 sıralıdırlar. Çiçeği kavuz ve kapçık sarar, kavuzlu arpalarda bunlar daneye yapışiktir ve harmanda ayrılmazlar. Danenin ortalama % 10 - 13 kadarı kavuzdur. Dane yapısında % 9 – 13 protein, % 67 kadar da karbonhidrat bulunur.



Şekil 2.1 Arpa başaklarının sıralanması (The Brewers The Market Guide, 2008)

Arpa serin iklim tahılları içerisinde buğdaydan sonra en çok ekimi yapılandır. Arpa daha çok hayvan yemi olarak kullanılır. Yem olarak değeri mısırın % 95'i kadardır. Yemlik arpalarda protein oranının fazla olması istenir. Kavuzun fazla olması besleyicilik değerini düşürür. Kullanıldığı önemli alanlardan biri de malt sanayidir. Bira üretimi için gerekli olan malt iki sıralı beyaz arpalardan elde edilmektedir. Biralık arpalarda protein oranının düşük olması gereklidir (% 9 -10,5). Yurdumuzda yetiştirilen arparın çoğunu biralık arpar oluşturmaktadır. Tarımsal işlemlerin gereği gibi yapılması durumunda arpanın maltlık kalitesi daha da yükselerek, ihraç etme olanakları da artacağından, ülkemize döviz getiren tarım ürünlerinden birinin de arpa olması beklenmektedir (Selçuklu Ziraat Odası, 2007).



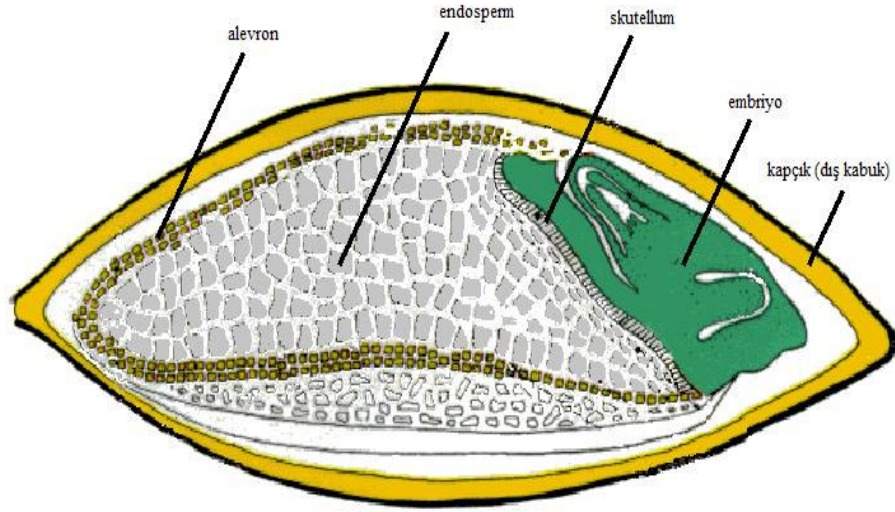
Şekil 2.2 Tek bir arpa çiçeğinin ve braktelerinin yapısı (başakçık) (The Brewers The Market Guide, 2008)

Başığın merkezi eksen olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Bu eksen nodyumlar ve internodyumlarla birlikte eksen nodyumlarında birleşen daha sonra içinde tohum gelişecek olan başakçıktan oluşur. Bir arpa başakçığı brakte (tek bir çiçeğe veya çiçek durumlarına ait koruyucu bazen renkli, indirgenmiş yapraksı yapılar) ile çevrelenen tek bir çiçekten oluşur (Şekil 2.2). Bir arpa çiçeği hem dişi (pistil) hem de erkek (stamen) organlarını taşır; arpa kendine tozlaşır. Tozlaşmadan sonra döllenmiş ovaryum gelişirken olgun bir tohumun kapçığı olacak olan brakteler oluşur (The Brewers TheMarket Guide, 2008).



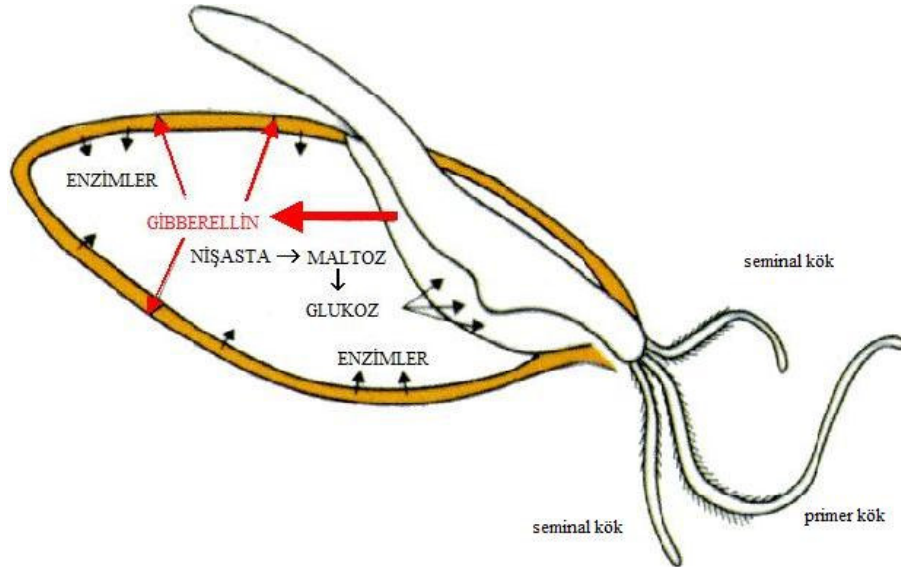
Şekil 2.3 Arpa tohumunun ventral (a) ve dorsal (b) görünüşleri (The Maltsters Association of Great Britain, 2007)

Döllenmeden sonra olgunlaşıp gelişmiş tohum taslağı ve içerisinde oluşan embriyodan meydana gelen yapı tohum olarak adlandırılır (Şekil 2.3). En dışta yer alan testa iki integumentten oluşmuştur ve mekaniksel olarak çok kuvvetlidir. Endosperm denilen besli dokuda karbonhidrat depo edilir. Embriyo ise ince çeperli, çok sıkı düzenlenmiş, canlılığını koruyan parenkima hücrelerinden meydana gelmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Arpa tohumu anatomisi (Carlsberg Research Center, 2008)

Tohum çimlenme sürecinde kullanılan ve endospermde yer alan maddeler taşıyıcılar, bunlar nişasta, yağ, protein ve hemiselüloz gibi bileşiklerdir. Monokotillerde endosperme bakan embriyonik doku tabakasına skutellum denir. Aynı zamanda kotiledon olarak da yorumlanan skutellum sindirici enzimler salgılar, besin maddelerini absorbe eder ve bunları gelişen fideye aktarır.



Şekil 2.5 Arpa tohumunun çimlenme anatomisi (Carlsberg Research Center, 2008)

Çimlenme biyolojik anlamda, elverişli koşullarda tohum embriyosundan normal bir bitki meydana getirebilme yeteneğinde olan yapıların ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir deyimle, tohum gömleğinden (testa) radikulanın belirmesi çimlenme olayının başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Kuru tohumlar sulu bir ortama konulduğunda çimlenme sürecinin birbirini izleyen dört kademedен oluştuğu ortaya çıkmaktadır: Suyun imbibisyonu (emilmesi), enzim sistemlerinin oluşması, büyümenin başlaması ve kök belirimi ile fidenin büyümesi. Uyku halindeki bir tohum su alınca embriyoda var olan gibberellik asitler alevron tabakasına hareket eder. Alevron tabakasında sentez edilen hidrolazlar (örneğin  $\alpha$ -amilaz) endosperme geçer. Yine alevron tabakasında sentezlenen nukleaz ve proteaz gibi hidrolazlar endosperme geçerek nukleazlar purin nukleotidleri serbest bırakıp sitokinin sentezinin öncü maddesini sağlarlar; proteazlar ise indol asetik asidin (IAA) öncü maddesi olan triptofanı serbest bırakırlar. Endospermden gelen sitokininler ve IAA embriyoda hücre bölünmesini ve hücre uzamasını hızlandırır. Büyüyen embriyo tohum gömleğini parçalar; koleoptil negatif geotropizma göstererek yukarı, radikula pozitif geotropik olarak aşağı doğru büyür. Fide toprak yüzeyine çıkarak ışıkla karşılaşır ve fotosentetik sistem gelişir. Böylece tohum bir dormant periyodu ardışık son derece karışık olan olaylar zincirini izleyerek çimlenmekte ve genç bir fideyi oluşturmaktadır (Önder ve Yentür, 1999) (Şekil 2.5).

Arpa tohumlarının çimlendirilmesi ile oluşan ve bira yapımında kullanılan malt arpanın ekonomik yönden önemli bir bitki olmasını sağlamaktadır. Malt eldesi için öncelikle, ıslatılan arpalar çimlendirilir. Maltlama tahıl tohumlarının çimlendirilip sonra bitki oluşmadan kurutulması işlemidir. Tipik maltlama işleminde taze tohumlar yıkanır ve filizlenme için bir süre ıslatılır. Filizin büyümesi için sabit oranda nem sağlanır. Filizin tohumun boyu kadar boy alması için beklenir (arpa için 4-6 gün). "Yeşil malt" 38-49°C'de 24 saat sonra da 60-71°C'de, nem oranı % 6'ya inene kadar bekletilir. Tohumların maltlanması, tohumdaki nişastayı şekere dönüştürecek enzimleri geliştirir. Arpa, yüksek enzim içeriği nedeniyle en yaygın olarak kullanılan malttır (Moake, 1997).

Bu çalışmada kullandığımız Zafer 160 arpa varyetesi, 1932 yılında Yeşilköy Zirai Araştırma Enstitüsünde seleksiyon metodu ile ıslah edilmiştir. 6 sıralı, seyrek başaklı,

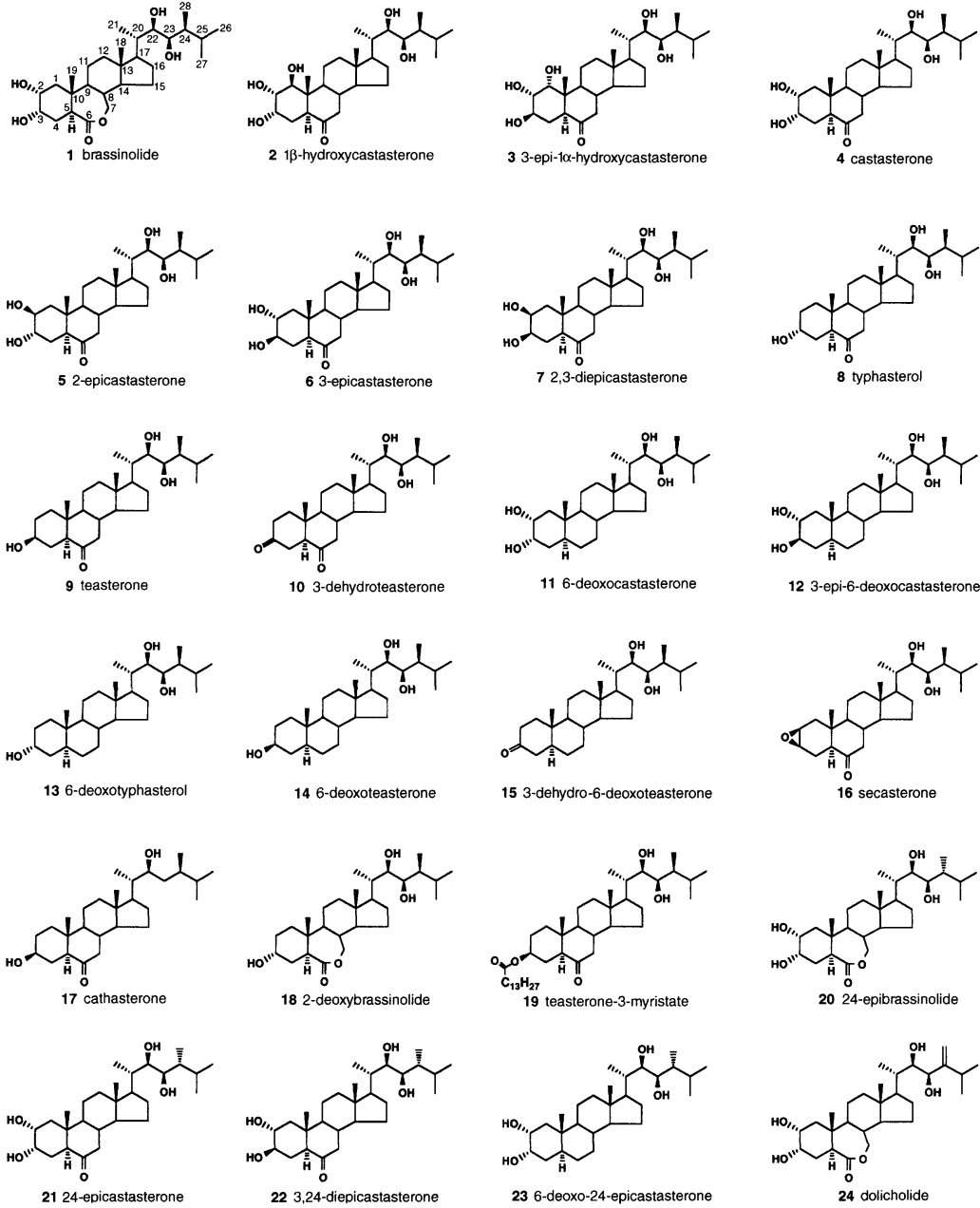
kılıçlıklı, tane dökmeven, kavuzlu taneli, 1000 tane ağırlığı 52 gram (gr), kışa, kurağa dayanıklı, orta erkenci, verimli, bütün hastalıklara dayanıklı, biralık kalitesi orta derecede bir arpa çeşididir (Uysal ve Yıldırım, 2003).

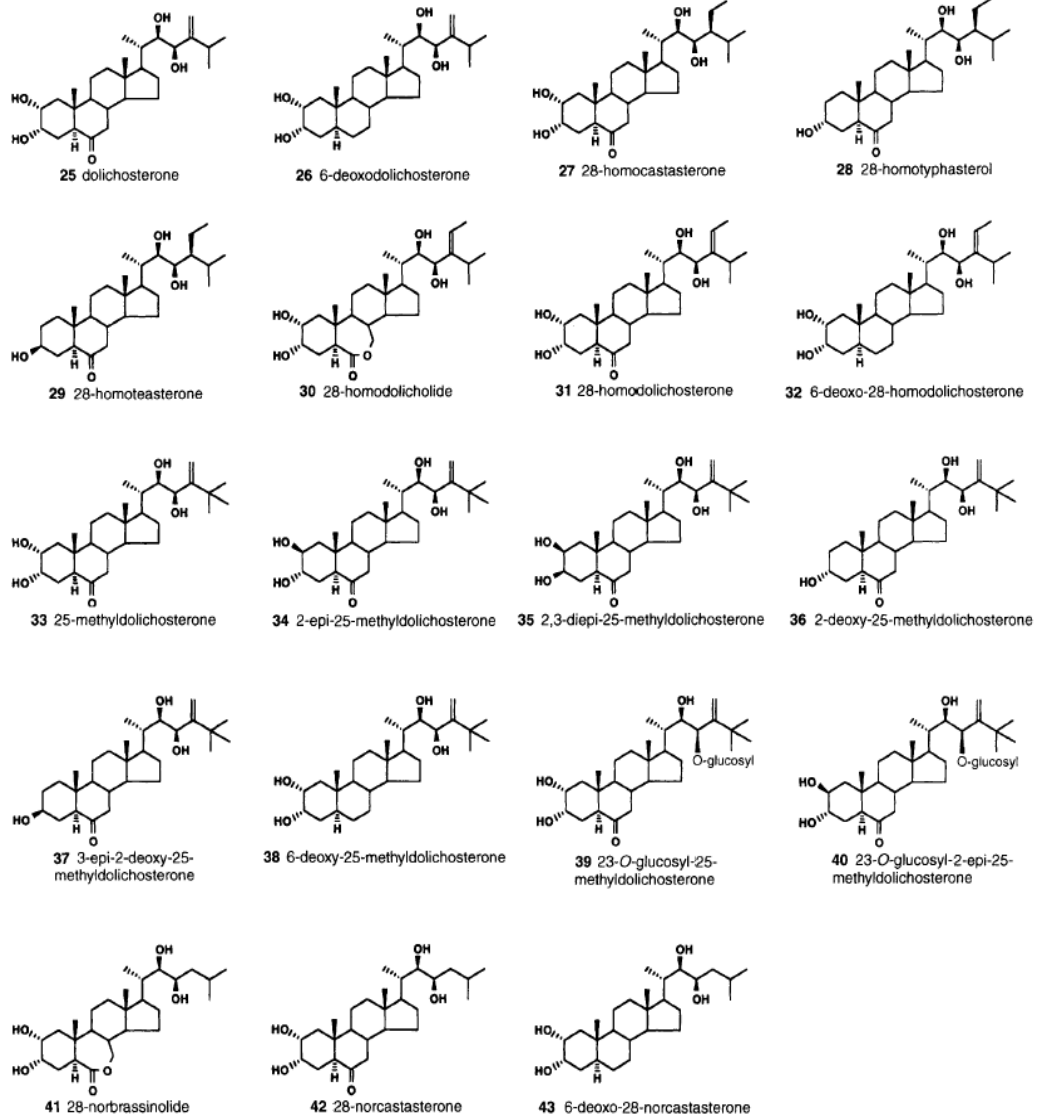
Arpa ile yapılan ilk temel genetik araştırmalar İstanbul Üniversitesi Botanik ve Genetik Kürsüsü'nde 'Basic Genetic Studies for Obtaining High Quality Barley Lines' projesi ile (Bilge ve diğ., 1981) başlatılmıştır. Çalışmada Zafer 160 arpa tohumlarına ekimden önce X ve gama ışınları, etil alkol, streptomisin, terramisin, penisilin G, sodyum siyanit ve etilmetan sülfonat solusyonları uygulanmıştır. X ve gama ışınlarının mitotik hücre bölünmeleri üzerine etkileri ve radyasyon uygulanmış tohumların protein içerikleri Olgun (1985) tarafından araştırılmıştır. Daha sonraki yıllarda doku kültürü (Gözükırmızı ve diğ., 1990), gen transferi (Gürel ve Gözükırmızı, 2000, 2003) moleküler markır (Arı ve diğ., 1995, Albayrak ve Gözükırmızı, 1999, Altınkut ve Gözükırmızı, 2003), 'DNA array' (Öztürk ve diğ., 2002) ile sürdürülmüştür. Günümüzde İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde arpa bitkisi çok değişik amaçlı projelerde özellikle stres fizyolojisi çalışmalarında (Arıcan ve Gözükırmızı, 2008) kullanılmaktadır.

### **2.3. BİTKİLERDE SENTEZLENEN BRASSİNOSTEROİDLER**

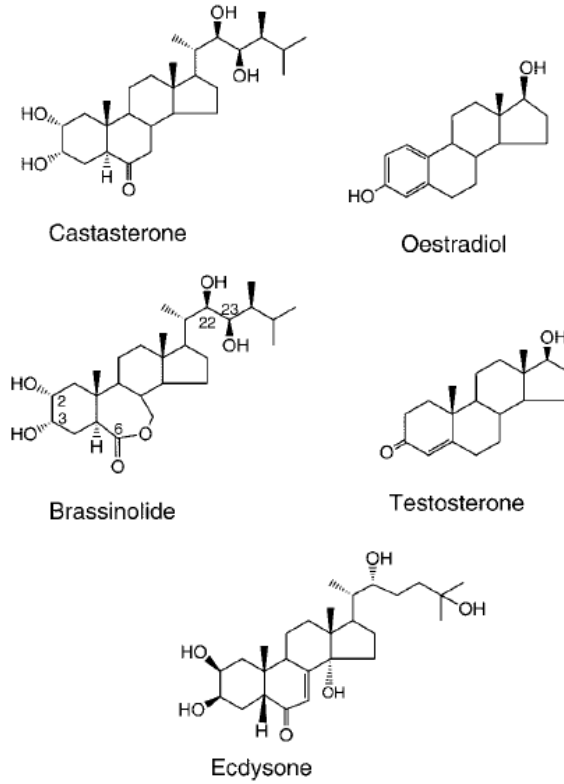
Mitchell ve diğ. (1970) kolza (*Brassica napus* L.) bitkisi polenlerinden BR izole ederek büyümeyi uyarıcı etkisini bildirdiler ve 1979'da Grove ve diğ. brassinolid (BL) hormonunu saflaştırarak hayvan steroid hormonlarına benzerlik gösteren yapısını belirlediler. Günümüzde bitkiler aleminde 40'tan fazla sayıda farklı brassinosteroid hormonu tanımlanmıştır (Şekil 2.6). Bu hormonların 9'u monokotil 23'ü dikotil olmak üzere 32 tanesi angiospermlerde (kapalı tohumlular), 4'ü gimnospermlerde (açık tohumlular), biri algde ve biri de eğrelti otunda bulunmuştur (Fujioka ve Sakurai, 1997a). Brassinosteroidler arasında kastasteron (KS) 'castasterone' en yaygın dağılım gösterir (33 tür) bunu 22 tür ile brassinolid 'brassinolide', 18 tür tifasterol 'typhasterol', 13 tür tisteron 'teasterone', 12 tür 6-deoksokastasteron '6-deoxocastasterone' ve 10 tür 28-norkastasteron '28-norcastasterone' izler. Doğal brassinosteroidler arasında brassinolid bir çok sistemde biyolojik olarak en aktif formdur (Fujioka ve Sakurai,

1997b). Doğal olarak meydana gelen BR'ler C-3 konumuyla birlikte C-2, C-6, C-22 ve C-23 konumlarında birer oksijen atomu taşır (Bishop ve Yokota, 2001) (Şekil 2.6).





Şekil 2.6 BR hormonlarının kimyasal formülleri (Fufioka ve Sakurai, 1997)



Şekil 2.7 Steroid hormonlarının yapısı (Bishop ve Konec, 2002)

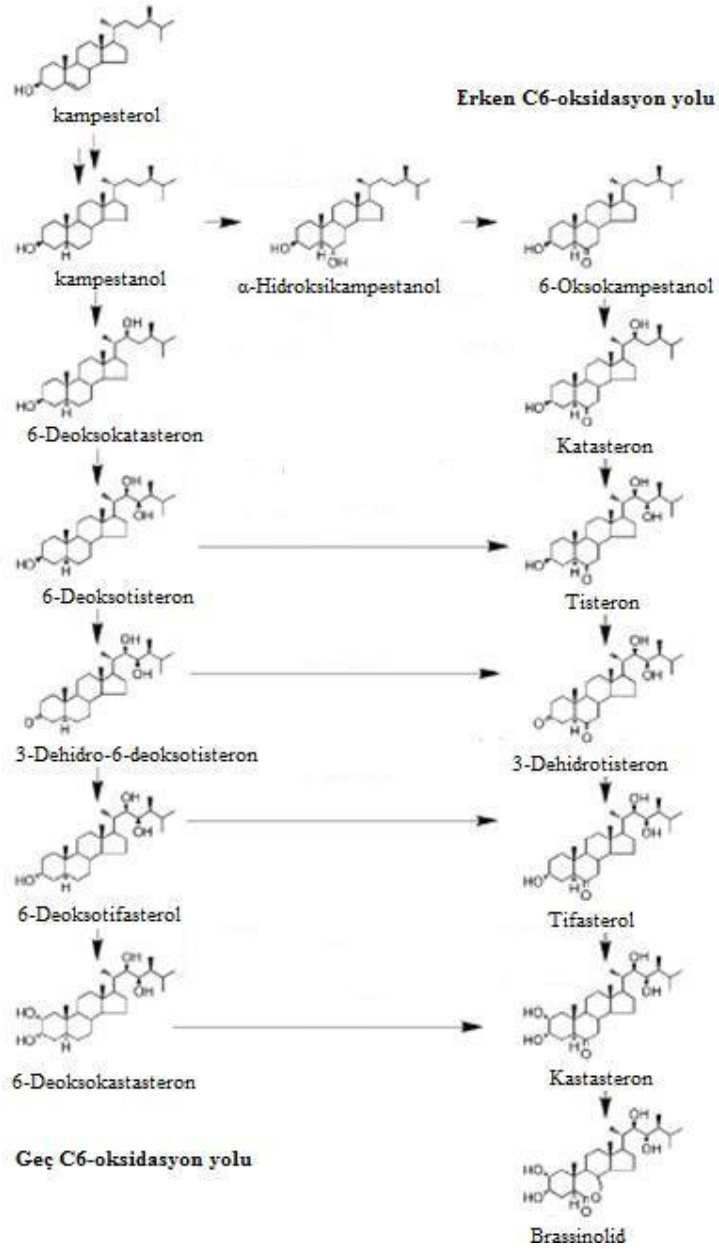
Bitki steroid hormonları brassinolid ve kastasteronun kimyasal yapısının memeli eşey hormonları östradiol ve testosteron, ve böcek steroid hormonu ekdizon ile karşılaştırılması.

BR'ler yaklaşık 60 fitosteroid familyasının üyelerinden biridir (Bajguz and Tretyn, 2003). Hayvan hücrelerindeki steroid hormonları (Şekil 2.7) sitoplazmada bulunan nuklear steroid reseptörlere bağlanarak algılanırlar. Reseptör kompleksi aktive olunca nukleusa aktarılır; hormondan sorumlu genlerin anlatımlarını uyarır veya baskılar (Beato ve diğ. 1995). Fizyolojik yanıtın oluşması, genomda meydana geldiği için buna genomik sinyalleşme denir. Steroid hormonları transkripsiyon ya da protein sentezi inhibitörleri varlığında ve nukleusu bulunmayan hücrelerde hücresel yanıt oluşturabilir. Bu mekanizma genom aracılı olmadığı için genomik olmayan sinyal iletimi olarak tanımlanır. Genomik olmayan sinyal iletimi mekanizmalarının bazıları nuklear steroid reseptörleri ve diğer sinyal iletim molekülleri arasında doğrudan meydana gelen bir etkileşime işaret eder. Genomik olmayan steroid sinyal iletim yolu ikincil 'mesenger' düzeylerindeki, iyon akışında henüz tanımlanmamış steroid taşıyıcı proteinler ve plazma membranına bağlı reseptörler aracılığı ile protein kinaz aktivitelerindeki değişiklikler ile uyarılabilir (Wehling, 1997, Falkenstein ve diğ., 2000). *Arabidopsis*

genom projesi ile hayvansal nuklear steroid reseptörlerinin bitkilerde bulunmadığı düşüncesini doğrulamaktadır (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Bir kolesterol iskeleti ile hidroksil gruplarının süstitüsyonları (yer değiştirme reaksiyonu) ve fonksiyonal grupların eklenmesiyle oluşan BR yapısı hayvanlardaki steroid hormonlarına benzer. Fonksiyonal grup değişikliği yanıt derecesini etkiler (Back ve Pharis, 2003).

#### **2.4. BRASSİNOSTEROİDLERİN BİYOSENTEZİ**

BR biyosentezi sterol biyosentezi ve BR'ye özün yol olmak üzere temel iki bölümden oluşur. BR metabolik genlerinin anlatım analizleri BR 'homeostasi'sinin yalnızca BR'ye özün biyosentezinde ve inaktivasyonunda gerekli olmayan aynı zamanda sterol biyosentezi için de gereken çoklu genlerin 'feedback' (geri-besleme) anlatımları aracılığı ile sürdürüldüğünü göstermektedir (Tanaka ve diğ., 2005). BR'ler kolesterolden tüevlenen hayvan ve böcek steroidal hormonlarına benzer biçimde bitki sterollerinin belli bileşenlerinden tüevlenebilir. Bitki sterollerinde arasında kampesterolün ve analoglarının BL'nin biyosentetik öncüsü olduğu öne sürülmektedir. BL biyosentezinin erken aşaması *Catharanthus roseus*'un kültürlenmiş hücreleri kullanılarak aştırılmıştır (Suziki ve diğ. 1995b). Kültürlenmiş hücrelerin temel bir bitki sterolu olan kampesterol içerdii bulunmuştur.



Şekil 2.8 Brassinolidin biyosentezi (Bishop ve Koncz, 2002)

BL'nin erken ve geç C-6 oksidasyon adımlarını kapsayan BR biyosentezinin basitleştirilmiş şeması.

Kampesterol metabolitlerini araştırmak için, hücre kültürleri kullanılarak mevalonik asitin biyosentetik inhibitörü olan kompasin varlığında, işaretlenmiş olan mevalonik asitten işaretli kampesterol hazırlanmıştır (Endo ve diğ. 1976). Hücrelere etiketlenmiş kampesterol verilmiştir. Yapılan analiz sonucu hücrelerde kampestanol,  $6\alpha$ -hidroksikampestanol ve 6-oksokampestanol tanımlanmıştır. Bu metabolitlerin endojen olarak meydana geldikleri doğrulanmıştır. Daha sonra kampestanol ve  $6\alpha$ -hidroksikampestanol işaretlemesiyle yapılan deney kampesterolün 6-kampestanole

dönüştüğünü göstermektedir (Suzuki ve diğ. 1995b). Bu yol tisteronu oluşturacak olan 6-oksokampestanolün yan gruplarına visinal (komşu iki C atomuna bağlı iki aynı fonksiyonel grup) hidroksillerin girmesinden itibaren BL'nin biyosentetik yolunun erken kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle B halkasının 6. C atomunda oksidasyonundan sonra BR'lerin hidroksilasyonları ve epimerizasyonları yolu ile biyosentezlerinin yapıldığı kabul edilir. BL sentezine giden bu yol erken C6 yolu olarak kabul edilir (Fujioka ve Sakurai, 1997).

#### **2.4.1. Erken C6 Oksidasyon Yolu**

6-oksokampestanol yan gruplarda visinal grupların hidroksilasyonu yolu ile tisterona dönüşür. Bu dönüşüm 22. ve 23. C atomlarında adım adım hidroksilasyon ya da 22,23-epoksidasyonu (oksijen atomu içeren üç üyeli halkalı eter oluşumu) ve daha sonra epoksit halkasının hidrasyonu ile 22,23 ikili bağı oluşumu ile başılır. Kastasteronun tisterona dönüşümü döteryumla işaretli substratlarla kastasteronun doğrudan tisteron öncüsü olduğu gösterilmiştir. 6-oksokampestanolün kastasterona dönüşümü henüz doğrulanmamıştır. Döteryumla etiketlenmiş substratla yapılan deneyler tisteronun 3-dehidrotisteron yolu ile tifasterole epimerize olduğunu göstermektedir (Suzuki ve diğ. 1994). Tifasterolün kastasterona ve brassinolide dönüşümü döteryumla işaretlenmiş substratlarla yapılmıştır. Tifasterol genellikle kastasterona dönüşürken nadiren tifasterolün tisterona epimerizasyonu görülür. Kastasteronun BL'ye dönüşümü (Şekil 2.8) tritiumla işaretlenmiş kastasteronla gösterilmiştir (Yokota ve diğ. 1990). *C. roseus* fidelerinde sentezin tisteron→tifasterol→kastasteron→brassinolid şeklinde olduğu döteryumla işaretlenmiş substratlarla kanıtlanmıştır (Suzuki ve diğ. 1995a).

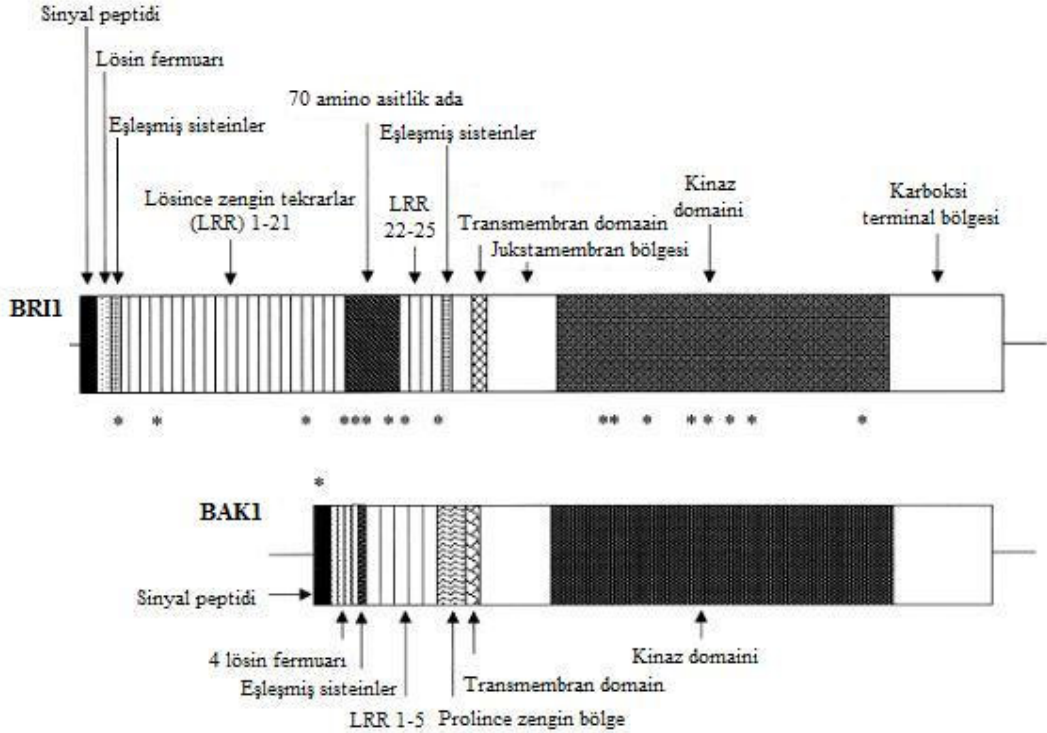
#### **2.4.2. Geç C6 Oksidasyon Yolu**

6-deoksokastasteron hücrelerde en fazla bulunan BR hormonudur (Choi ve diğ. 1996). Döteryumla işaretlenmiş substratla yapılan deneyler 6-deoksotisteronun 6-deoksotifasterole dönüştüğünü göstermektedir. Benzer şekilde 3-dehidro-6-deoksotisteron da 6-deoksotifasterole dönüşmektedir (Şekil 2.8). 6-deoksotisteron, tisteronun tifasterona dönüşmesine benzer biçimde 3-okso (3-dehidro-6-deoksotisteron) formu aracılığı ile 6-deoksotifasterole dönüşmektedir (Choi ve diğ. 1997). Daha sonra 6-deoksokastasteron kastasterona ve brassinolide dönüştürülmektedir (Choi ve diğ.

1996). 6-deoksotisteronun biyosentetik öncüsü hala bilinmemektedir. 6-deoksokatasteron, 6-deoksotisteronun olası öncüsüdür (Choi ve diğ. 1996).

## 2.5. BRASSİNOSTEROİDLERİN NUKLEUSA İLETİMİ VE TAŞINMALARI

Hayvan steroidlerinden farklı olarak genellikle nuklear steroid reseptörleri tarafından algılanılan bitki steroid hormonları hücre yüzeyinde lösine zengin tekrarlar (LRR) (leucine-rich repeat) taşıyan bir reseptör benzeri kinaz (RLK) ‘receptor-like kinase’ olan ‘brassinosteroid-insensitive 1’ (BRI1) tarafından tanınır (Şekil 2.9). BRI1’nin ekstrasellüler domaini 21. ve 22. LRR’ler arasında 70 amino asitlik bir ada domain ‘island domain’ (ID) ile kesintiye uğrayan 25 LRR’den, sitoplamık domaini ise bir jukstamembran (JM) bölgesi, Ser/Thr kinaz çekirdek ve C-terminal (CT) domainden oluşur. LRR iyi bilinen bir protein-protein etkileşim domainidir, BRI1’in BR’ler ile etkileşmek için bir protein ko-liganda ihtiyaç duyduğu zannedilmektedir (Li ve Chory, 1997).



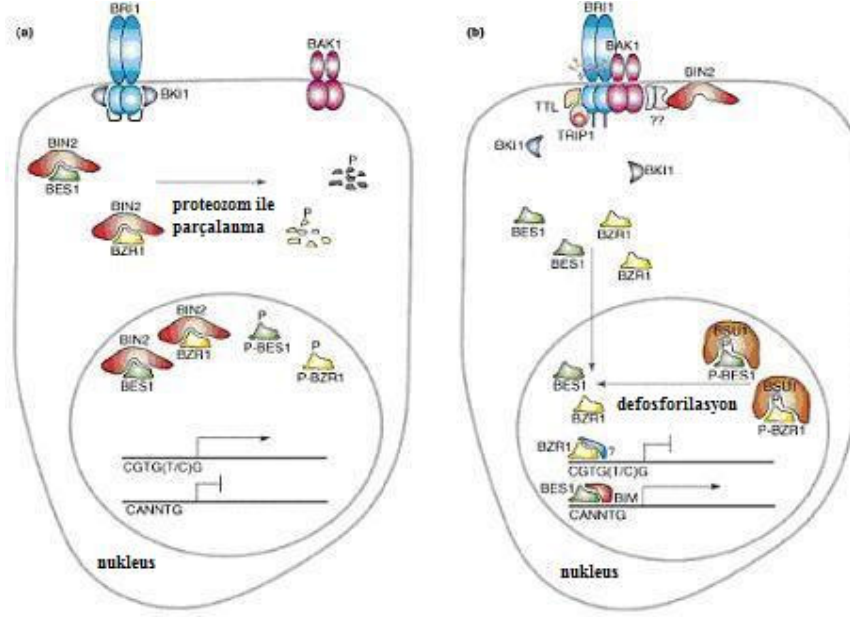
Şekil 2.9 BRI1 ve BAK1 reseptör kinazlarının yapıları (Clouse, 2002)

Arabidopsis'te BR sinyalinin taşınmasında gerekli olan iki lösine zengin tekrarlı reseptör kinazın yapıları. Brassinosteroid Intensive1 (BRI1) ve BRI1 Associated Receptor Kinase (BAK1) BR sinyallerinin iletimi için gereklidir ve hücre yüzeyinde heterodimer oluşturabilirler. Yıldızlar protein fonksiyonunu etkilediği bilinen mutasyonları göstermektedir.

Bu teori ekstrasellular *bri1* mutasyonu ile birlikte etkilenmeyen bir hücre içi *bri1* alleli mutantının aşırı ekspresyonunu baskılayan salgılanmış bir serin karboksipeptidaz olan 'BRI1-suppressor 1' (BRS1)'in bulunmasıyla desteklenmiştir (Li ve diğ., 2001). Bununla birlikte bir başka çalışma BRI1'in *Arabidopsis*'te *in vitro* da etiketlenmiş-ışığa-duyarlı BR analoglarına kovalent olarak bağlanabilen ve BR'lere bağlanabilen bir çok rekombinant BRI1 fragmenti olan temel bir protein olduğunu ortaya koymaktadır (Kinoshita ve diğ. 2005). Bu araştırmacılar brassinosteroidlerin bitki hücre zarındaki yapısal proteinlere bağlanması ile ilgili olan çalışmada en aktif brassinosteroid olan brassinolid'in biyosentetik öncüsü (kastasteron), biotin etiketli ışığa ilgi gösteren kastasteron (BPCS) 'biotin-tagged photoaffinity castasterone'u kullanarak BRI1'e aktif brassinosteroidlerin doğrudan bağlandığını kanıtlamışlardır. BPCS, <sup>3</sup>H-etiketli BL ve rekombinant BRI1 fragmentleri ile yapılan bağlanma deneyleri BR'lerin bağlanma domaininin, BRI1 ile birlikte LRR'nin karboksi terminal ucunun (ID-LRR22) ekstrasellular domaindeki LRR21 VE LRR22 arasında yer alan 70 amino asitlik ada domaininden oluştuğunu göstermektedir. Sonuçlar BRI1'in ekstrasellular domainindeki 94 aminoasidi kapsayan ID-LRR22'e brassinosteroidlerin bağlandığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlara göre BR'ler ID-LRR22'nin 94 aminoasidi ile tanımlanan BRI1'in ekstrasellular domaninin bir subdomaini aracılı ile algılanabilmektedir. BR sinyalleşme yolunda, beş ekstrasellular LRR ile birlikte bir reseptör kinaz LRR olan BAK1'in BR'lerin ko-reseptörü olduğu önerilmiştir (Li ve diğ. 2002, Nam ve Li, 2002). Bununla birlikte Kinoshita ve diğ. (2005)'nin yaptığı çalışmada bir *bak1* nul mutantında BRI1'e <sup>3</sup>H-BL bağlanması etki oluşturmamıştır. Bu sonuçlar BRI1 aracılığıyla BR algılanmasından sonra BAK1'in bir sinyal dönüştürücüsü olarak rol oynadığını öne çıkarmaktadır (Şekil 2.10).

BAK1 (BRI1 Associated Receptor Kinase) olarak adlandırılan BRI1'e yapısal organizasyon benzerliği gösteren ve BRI1 ile etkileştiği sanılan lösince zengin tekrarlar taşıyan ikinci bir reseptör kinaz olarak tanımlanmıştır (Nam ve Li, 2002). BRI1'in aksine BAK1 ekstrasellular domaininde yalnızca beş lösince tekrarlı dizi taşır ve BRI1'in 70 aminoasitlik adası eksiktir. BAK1 BRI1'in 'global gen anlatımı'na benzer biçimde bitkinin tüm dokularında anlatım yapar. İşaretlenmiş proteinlerle yapılan 'co-immuno-precipitation' deneyleri *Arabidopsis* bitkisinde ve maya hücrelerinde BRI1 ve

BAK1 arasında doğrudan bir fiziksel etkileşim olduğunu göstermektedir (Li ve diğ., 2002, Nam ve Li, 2002).

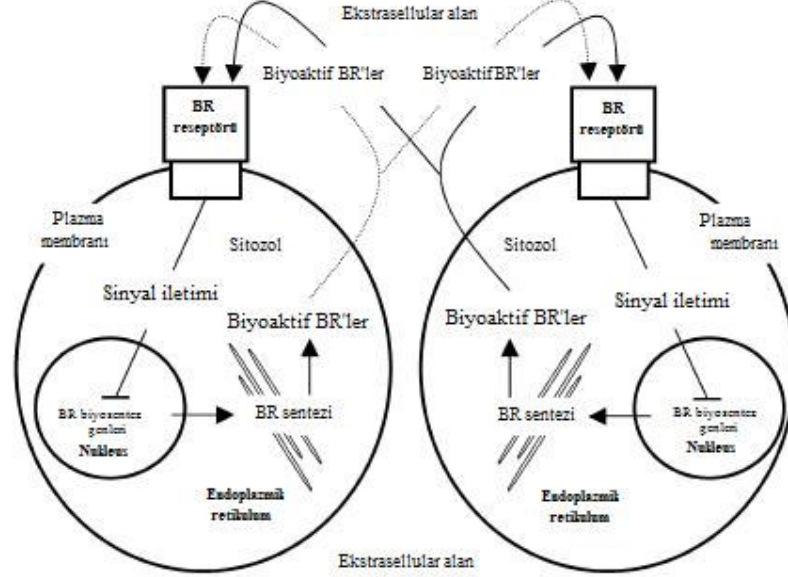


Şekil 2.10 BR sinyalleşmesinin yeni modeli (Li ve Jin, 2006)

- BR yokluğunda hücre membranında BKII ile birleşen BR reseptörü BRII, aktif olmayan bir dimerdir. BIN2 sitozolde BES1 ve BZR1'i fosforile ederek parçalanmalarını uyarır ve BES1 ve BZR1'in nükleusta DNA'ya bağlanma aktivitelerini engelleyen aktif bir kinazdır (P-BES1 ve P-BZR1 iki BIN2 substratının fosforile olmuş biçimini göstermektedir).
- BR varlığında ise BRII'in ekstrasellüler domainine BR bağlanır bu durum BRII'in C-terminal kinaz ucunun ket vurucu etkisini ortadan kaldıran bir biçim değişikliğine neden olur ve plazma membranından BAK1 ve TTL ile TRIP1 gibi diğer BRII substratlarının BRII ile birleşmesi sonucu BKI hızla ayrılır. Sonuç olarak BIN2'nin fosforilasyon aktivitesi büyük olasılıkla bir membran mekanizması (iki soru işaretli gösterilen proteinler) aracılığıyla engellenir. Böylece fosforile olmamış sitozolik BES1 ve BZR1 nükleusa taşınır, ayrıca BSU1'in etkisiyle üretilen defosforile olmuş BES1 ve BZR1 kopyaları ile birlikte ilgili genlerin anlatımlarını etkilerler.

Genellikle biyoaktif BR'ler polen gibi üreme ile ilgili organlarda taze ağırlığa göre ( $5-1000 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Mitchell ve diğ, 1970), tohumlarda ( $0.3-1600 \text{ ng g}^{-1}$ ) ve meyvelerde ( $0.2-3.5 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Bajguz ve Tretyn, 2003, Montoya ve diğ., 2005, Symons ve diğ., 2006, Nomura ve diğ., 2007) yüksek seviyede meydana gelir. Aksine gövde gibi vejetatif dokularda biyoaktif BR seviyesi genellikle çok düşüktür ( $0.12-2 \text{ ng g}^{-1}$ ), köklerde ise daha düşük ( $0.05 \text{ ng g}^{-1}$ ) olduğu bulunmuştur (Bancos ve diğ., 2002, Shimada ve diğ., 2003, Symons ve Reid, 2004). Gövde dokularında, kök ucu ve genç internodyumlar gibi aktif olarak büyüyen genç bölgelerde genellikle biyoaktif BR'ler çok miktarda birikir bu durum BR'nin hücre bölünmesi ve hücre uzamasının uyarılmasında etkili olabileceğini göstermektedir (Shimada ve diğ., 2003, Symons ve Reid, 2004). Endojen BR'nin

bitkilerde yaygın olarak bulunuşu BR'lerin bitkide sentezlendiği bölgeden hücre içinde başka bir bölgeye veya komşu hücreler gibi uzak mesafelere taşınıp taşınmadığı sorularını ortaya çıkarmaktadır. Şekil 2.11'de bu teoriler şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.11 BR'nin hücre içinde ve dışında taşınması (Symons ve diğ., 2008)

Kısa mesafede hücre içinde ve komşu hücreler arasında BR taşınması için önerilen model. Bu model BR'nin intrasellüler alanda sentezi, plazma membranına, aynı hücrenin ya da komşu hücrenin eksteriyör yüzeyinde yer alan BR reseptörlerine bağlanabildiği ekstrasellüler alanlara BR'lerin taşınmasını ana hatlarıyla şema halinde göstermektedir.

Elde edilen veriler endojen BR'lerin kök ve gövde arasında farklı organlara veya gövdede farklı organlar arasında taşınmadıklarını göstermektedir. BR'ler diğer bitki hormonları gibi (IAA ve ya absisik asit) uzak mesafelere taşınmaz, fakat BR'lerin IAA taşınması üzerine olan etkileri aracılığı ile bitkilerde uzun mesafelere sinyal iletiminde dolaylı bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. BR'lerin uzun mesafelere taşınmamlarına karşın, BR'ler hücre içinde sentezlenir fakat hücrenin dış yüzeyinde algılanır dolayısıyla BR'ler kısa mesafelere taşınır. Üretilen hücreden BR'nin dışarı taşınması sonucu BR hücrenin dış yüzeyinde durmaz, komşu hücrelerin yüzeyine doğru hareket eder, bu nedenle dokuda birbirleri ile ilişkili çok sayıda hücre aynı konsantrasyonda biyoaktif BR temin edebilir. Bu durum ilgili hücrelerde BR yanıtıyla sonuçlanır. Büyük olasılıkla hücrenin dış yüzeyinde reseptör bulunması, bu iletişimi kolaylaştırır. BR'ler hücreler arası BR taşınması olmaksızın aynı hücre tarafından hem üretilir hem de algılanırsa, ilişkili dokularda büyüme yanıtı zorlaşabilir (Symons ve diğ., 2008).

## 2.6. BRASSİNOSTEROİDLERİN GEN ANLATIMINA ETKİLERİ

BR ile uyarılan ilk gen *BRU1* (brassinosteroid up-regulated 1), soya fasulyesinden izole edilmiştir ve hücre uzaması sırasında hücre duvarı gevşemesini sağlayan ksiloglukan endotransferazı (KET) kodlamaktadır (Zurek ve Couse, 1994). Bu durum daha sonra *Arabidopsis*'te Xu ve diğ., (1996) tarafından da tanımlanmıştır. Buna göre, KET'lerin uyarılması BL ile uyarılan büyüme yanıtı sırasında hücre duvarı gevşemesi ile düzenlenir. Diğer BR ile uyarılan genler arasından *CDC2b* (sikline bağlı kinaz 'cyclin-dependent kinase')nin anlatımı ışık yokluğunda BR tarafından 'upregule' (hücredeki RNA ya da protein miktarının artması) edilmektedir, fakat ışık varlığından etkilenmemektedir (Yoshizumi ve diğ., 1999). Siklin geni *CycD3* (D tipi siklin geni 'CyclineD3') de BR tarafından uyarılabilir (Hu ve diğ., 2000). Hu ve diğ. (2000) söz konusu çalışmada *Arabidopsis* bitkisinin BR biyosentezi bakımından kusurlu olan *det2* mutantını kullanmıştır. Bu mutantta endojen BR düzeyi çok düşüktür (Fujioka ve diğ., 1997, Li ve diğ., 1996). *det2* hücrelerinde *CycD3* transkriplerinin 1 saat sonunda açık bir biçimde uyarıldığı gözlenmiş, 8 saat sonunda *CycD3* transkripleri maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bununla birlikte yabancı tip hücrelerdeki *CycD3* transkripleri 24-epibrassinolid (EBR) uygulamasından 2 saat sonra birikmeye başlamış ve 8 saatte 2.5 kat artış göstermiştir. Bu sonuçlar eksojen EBR'ye yabancı tip hücrelerin mutant hücrelerden daha az duyarlı olduğunu göstermektedir.

## 2.7. BRASSİNOSTEROİDLERİN ANTİVİRAL ETKİLERİ

Son yıllarda sentetik BR'lerle yapılan çalışmalarda BR'lerin antiviral etkileri de araştırılmıştır. Wachsmann ve diğ. (2002) 27 farklı BR türevinin kızamık virusu (KV) üzerine antiviral etkisi olduğunu kanıtlamıştır. Söz konusu çalışmada Afrika maymunu böbreği Vero hücrelerinde KV üzerine anti-viral etkisi olan ribavirin kontrol ilaç olarak kullanılmıştır. KV üzerine BR türevleri ribavirinden daha toksik etki göstermiştir. Romanutti ve diğ. (2007) sentetik bir BR türevi olan (22S,23S)-3 $\beta$ -bromo-5 $\alpha$ ,22,23-trihydroxystigmastan-6-one (6b)'nin 'vesicular stomatitis virus' (VSV)'un replikasyonu üzerine anti-viral etkilerini araştırmıştır. Buna göre Vero hücrelerinde 6b, VSV'nin protein sentezi ve viral olgun partikül oluşumunu engellerken, virus adsorpsiyonunu ve internalizasyonunu ve virusun erken RNA sentezini etkilememiştir. BR bu etkisini virusun replikasyonunu engelleyerek zamana bağlı olarak meydana getirmektedir.

## 2.8. BRASSİNOSTEROİDLERİN FİZYOLOJİK ETKİLERİ

Müssig ve diğ. (2003) BR'nin kök büyümesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmaya göre kök büyümesi üzerine pozitif ya da negatif brassinosteroid etkileri, uygulanan BR konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Düşük eksojen BR konsantrasyonu yabancı tip bitkilerde kök büyümesini uyarırken, BR-kusurlu mutantların kök boyunu normal hale getirmektedir. 24-epibrassinolidin (EBR) ve 24-epikastasteronun (EKS) düşük konsantrasyonları kök uzamasını *Arabidopsis* yabancı tip bitkide %50, BR-kusurlu mutantlarda (*dwf1-6* ve *cbb3*) %150 artırmıştır. Yüksek BR konsantrasyonu kök büyümesine ket vurmaktadır. Eşik düzeyi aşılsa BR ket vurucu etki yapmaktadır. Eşik düzeyi uygulanan BR'nin biyolojik aktivitesine ve genotipe bağlıdır. Eşik düzeyi konsantrasyonu olan 5nM EBR 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ile birlikte uygulandığında kök büyümesini yabancı tipte engellerken *cbb3* BR-kusurlu mutantında artırmıştır. Gen anlatım düzeyi üzerine BR'nin diğer bitki hormonları ile etkileşimi de araştırılmıştır. *dwf1-6* mutantının köklerinde yalnızca birkaç oksinle ilişkili genin transkript düzeylerinde değişiklikler oluşmuştur. Mutantta IAA biyosentezi için gerekli olan bir enzimi kodlayan *NIT3* geni yüksek transkripsiyon düzeyi gösterirken, *IAA14*, *IAA2* ve oksinden sorumlu olduğu sanılan GH3-benzeri bir gen ise düşük gen anlatımı göstermiştir. Bu gen anlatım verileri kökte BR ve oksin arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Etilene yanıt ve etilen biyosentezinden sorumlu bir çok gen ise daha düşük gen anlatım düzeyi göstermiştir. Gibberellik asit, absisik asit, sitokinin ve jasmonat biyosenteziyle, sinyalleşme ve bu hormonlara yönelik yanıt oluşmasıyla ilişkili genlerin anlatım düzeylerinde önemli bir değişiklik izlenmemiştir. *IAA14*, *IAA2* ve oksinden sorumlu olduğu sanılan GH3-benzeri bir gen *dwf1-6* mutantında yabancı tipten daha düşük gen anlatım düzeyi göstermiştir. Bu bulgular bize BR-kusurlu bitkilerin köklerinde oksin dağılımının değiştiğini, oksin duyarlılığının azaldığını ya da oksin seviyesinin azaldığını göstermektedir. BR-kusurlu mutantlarda eksojen olarak uygulanan gibberellinler kök uzamasını uyarır. Buna göre BR'nin kök uzamasını uyarıcı etkisi büyük ölçüde oksin ve gibberellin etkinliğinden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Etilen hormonu kök uzamasını engellemektedir. Oksin etilen biyosentezini uyarır ve artan etilen seviyesi polar oksin taşınmasını engelleyerek kök uzamasına ket vurur.

Steber ve McCourt (2001) BR'nin çimlenmeyi uyarıcı etkisini kanıtlamışlardır. Uzun yıllar boyunca çimlenmenin ve dormansinin absisik asit (ABA) ve gibberellin (GA) tarafından düzenlendiği kabul edilmiştir. Bu iki hormon bir birine antagonist etki yapmaktadır. Söz konusu çalışmada bir çok GA biyosentetik mutantta ve GA'ya duyarısız *sleepy1* mutantında BR'nin çimlenmeyi sağladığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar BR'nin çimlenmeyi uyardığını ve çimlenme olasılığını artırdığını, normal çimlenme için gerekli olduğunu göstermektedir. ABA tarafından BR biyosentezi bakımından mutasyonlu olan *det2-1*'in ve BR-duyarısız mutant olan *bri1-1*'in çimlenmesi yabancı tipin çimlenmesinden daha güçlü olarak engellenmektedir. Bu nedenle ABA'nın oluşturduğu çimlenmeyi engelleyici etkinin kaldırılması için BR sinyaline gereksinim duyulmaktadır. BR'nin çimlenmeye olan etkisinin belirlenebilmesi için GA biyosentezi bakımından mutantlı olan *gal-3*, *ga2-1* ve *ga3-1* genotiplerine artan konsantrasyonlarda EBR uygulanmıştır. Tohumlar hormon içermeyen 'Murashige and Skoog (MS)' besi yerine ekilmiştir. BR artan konsantrasyona bağlı olarak çimlenmeyi artırmıştır. BR mutantlarında ABA'nın yabancı tipe göre daha düşük konsantrasyonda tohum çimlenmesini engellediğini kanıtlamak için *det2-1* ve *bri1-1* üzerine artan konsantrasyonlarda ABA uygulanmıştır. Buna göre yabancı tiple karşılaştırıldığında çimlenmede *det2-1* ve *bri1-1* mutantlarında ABA'ya karşı artan duyarlılık gözlenmiştir. *det2-1* ve *bri1-1* mutantlarının çimlenmesi 0.6 µM ABA ile önemli derecede engellenmiştir. Buna karşın yabancı tipin çimlenmesi 1.2 µM ABA konsantrasyonuna kadar engellenememiştir. 5 gün sonunda 0.6 µM ABA uygulanan *det2-1* mutantı %3, *bri1-1* mutantı %12 ve yabancı tip %95 çimlenme göstermiştir.

Somatik embriyogenezis yolu ile brassinosteroidin pamuk hipokotilleri rejenerasyonu üzerine etkileri Aydın ve diğ. (2006) tarafından araştırılmıştır. On günlük pamuk fideleri eksplant olarak kullanılmıştır ve hipokotiller çıkarılmıştır ve kallus oluşumu için BAP ve kinetin ile birlikte B<sub>5</sub> vitamini eklenmiş MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Gelişen kalluslar kontrol grubu ile birlikte ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1 µM) BR içeren MS besiyerine aktarılmıştır. Kontrol materyalle karşılaştırıldığında BR uygulamasının taze kallus ağırlığını olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir ve BR uygulaması nedeniyle embriyogenezde artış gözlenmiştir. Gelişimlerinin farklı evrelerindeki embriyogenik kalluslardan ve somatik embriyolardan yapılan histolojik preparatlar BR uygulanmış kalluslar üzerinde erken embriyogenez sırasında

poliploidizasyon olduğunu ortaya koymuştur. Buna göre BR kallus gelişimini olumsuz olarak etkilerken somatik embriyo olgunlaşmasını uyarılmaktadır. Buğday yapraklarında epibrassinolidin (EBR) senesens üzerine etkisi Sağlam-Çağ (2006) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada deney çözeltisi olarak farklı konsantrasyonlarda EBR (0.001  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) içeren distile su kullanılmıştır. Bu çalışmada peroksidaz aktivitesinde artış, proteaz aktivitesinde ve klorofil içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra protein içeriği yalnızca 10  $\mu$ M konsantrasyonda BR uygulanan örnekte azalma göstermiştir. Sonuç olarak EBR'nin yüksek konsantrasyonda senesensi hızlandırdığı görülmüştür.

## 2.9. BRASSINOSTEROİDLERİN ANTIÖKSİDANT ETKİLERİ

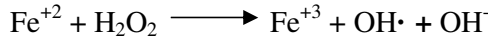
Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşmaktadır. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızmakta, moleküler oksijenle etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri, "antioksidant savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılındandan daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılındandan daha fazla reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır (Altınışık, 2008). Oksidatif etki, serbest radikallerin, özellikle aktif oksijen türlerinin [(süperoksit molekülü ( $O_2^-$ ), singlet oksijen ( $*O$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikallerini ( $OH$ )] oluşumunu içerir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup oldukça reaktifler. Bu radikaller; plazma membranı, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) membranlarında da oluşabilir. Bununla beraber, suyun kısıtlı olduğu periyotlarda, vejetatif bitki dokularında oksidatif stresin en yaygın nedeni kloroplastta gerçekleşen ışık-klorofil etkileşimleri olarak düşünülmektedir. Su kısıtlı hale gelirken, bitki daha fazla su kaybetmemek için, genelde stomalarını kapatır; bu da fotosentezle fiksasyon için gerekli  $CO_2$ 'nin alımının kısıtlanmasına neden olur. Bu durum kuantum verimini azaltır ve fotosentetik aparatın reaksiyon merkezlerindeki eksitasyon enerjisinin aşırılığına neden olur. Bu durumda  $NADP^+$  (fotosentezdeki  $e^-$  alıcısı) kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin  $NADP^+$  yerine oksijeni redükler; böylece,

fotosistem I (PS I)'in elektronları  $O_2$ 'ye transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali üretilir. Birçok türde kuraklık stresi altında artan süperoksit oluşumu lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doygunluğuna ve sonuçta membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur. Süperoksitin kendisi fazla reaktif değildir ve daha çok  $H_2O_2$  ve daha sonra  $OH^-$  oluşturmak suretiyle etkili olur. Hidrojen peroksit Calvin döngüsünün birçok enziminin inaktivasyonuna yol açmaktadır. Süperoksit ve hidrojen peroksitin hidroksil radikalini oluşturma tepkimesi sırasında artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da arttırabilir. Bunların yanı sıra, fotosistem II (PS II)'deki suyu parçalayan bölgede de serbest radikal oluşabilir. Bitkilerde, oksidatif zararın yol açtığı yıkıcı etkilerle mücadele etmek için; yağda çözünen ve membrana bağlı antioksidantlar [doğrudan lipid peroksidasyonunun serbest radikallerini (triplet klorofil ve singlet oksijen radikali ( $^*O$ ) gideren  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ - karoten], suda çözünen antioksidantlar [süperoksit ve hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyon ve askorbat] ve enzimatik antioksidantlar [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APOD) ve glutatyon redüktaz (GR)]'dan oluşan karmaşık bir antioksidant koruyucu sistemine sahiptirler. Kuraklık stresinde kalan bitkiler antioksidant savunma sistemlerin bazılarının ya da tamamının aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler. Bununla beraber, uzun ve kısa süreli hatta bazen kısa süreli stres durumunda bile, savunma mekanizmalarının kapasiteleri aşılır ve bu durum, gözle görülür zararlara ve hatta bitki ölümüne neden olabilir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

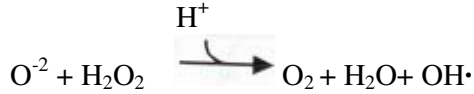
Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokromC ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur. Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon

reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol bir oynar. Çünkü  $Fe^{+2}$  veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en aktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikali Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler (Altınışık, 2008).

Fenton reaksiyonu:



Haber-Weiss reaksiyonu:



BR'nin antioksidant sistem üzerine etkileri Mazorra ve diğ. (2002) tarafından araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada domates yaprak diskleri kullanılarak katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) aktiviteleri üzerine iki farklı konsantrasyondaki (10.60 ve 2.12 nM) EBR'nin etkileri 25 ve 40°C'de analiz edilmiştir. SOD aktivitesi her iki konsantrasyon ve sıcaklık derecesinde uyarılırken, POD aktivitesi ise her iki konsantrasyonda da 25°C sıcaklık değerinden etkilenmemiştir, 40°C'de ise uyarılmıştır. Bununla birlikte KAT aktivitesinin ise doza ve sıcaklığa bağlı olduğu açık bir biçimde gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise EBR'nin tuz stresi uygulanmış *Brassica juncea* bitkisindeki antioksidant enzimlerine etkileri araştırılmıştır. Hayat ve diğ. (2007) *B. juncea* bitkisine kadmiyum stresi uygulamasından sonra EBR'nin antioksidatif stres enzimleri olan KAT, POD ve SOD'un aktivitelerini kontrollara göre arttırdığını bildirmiştir.

Özdemir ve diğ. (2004) tuz stresi uygulanmış pirinç bitkisinde EBR antioksidatif sisteme etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında dört farklı uygulama yapmışlardır. Bu gruplar deiyonize su (kontrol), 3 µM EBR, 120 mM NaCl ve 3 µM EBR+120 mM NaCl'den oluşturulmuştur. Buna göre 120 mM NaCl stresi etkisindeki bitkide artan peroksidaz aktivitesi, EBR+NaCl uygulanan grupta önemli derecede azalmıştır. Ancak EBR uygulanan grupla kontrol grubunu karşılaştırdığımızda SOD, KAT ve GR aktivitesinde önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Kontrol bitkilerinin askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesini EBR ve NaCl uygulanan grupla karşılaştırdığımızda sırası ile %31, %62 artış meydana gelmiştir. APOD enzimi aktivitesi EBR+NaCl uygulanan grupta ise kontrol grubuna benzerlik göstermiştir. Yalnızca NaCl uygulanan grupla karşılaştırıldığında APOD aktivitesinde önemli bir düşüş meydana gelmiştir. SOD aktivitesi kontrol grubunda diğer üç gruba göre oldukça yüksek bulunmuştur. EBR, NaCl ve EBR+NaCl grupları arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. CAT ve GR aktiviteleri kontrol grubunda diğer üç gruba göre yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunun APOD aktivitesi EBR uygulanan gruptan anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Ayrıca kontrollerle karşılaştırıldığında NaCl stresi uygulanan grupta azalma gözlenmiştir. Ali ve diğ., (2008) BR'nin bir tür fasulyede oksidatif stress üzerine etkilerini araştırmışlardır. Alüminyum stresi uyguladıkları bu bitki üzerine EBR'yi ve homobrassinolid (HBR)'yi püskürterek uygulamışlardır. BR'nin fasulye yapraklarında katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini arttırdığını belirlemişlerdir.

Kuraklık, soğuk ve toprak tuzluluğu bitkinin büyüme ve üretkenliğini etkileyen; çevresel stres faktörleridir. Kagale ve diğ., (2007) EBR'nin *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica napus* fidelerinde kuraklığa toleransı artırdığını göstermişlerdir. EBR'nin *A. thaliana* ve *B. napus*'ta kuraklıktan sorumlu genlerin anlatımlarını etkilediğini kanıtlamışlardır.

## 2.10. BRASSİNOSTEROİDLERİN PROTEİN MİKTARINA ETKİLERİ

Bajguz (2000) BR'nin yeşil bir alg olan *Chlorella vulgaris*'te protein ve nukleik asit miktarına etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada 24 ve 36 saat süresince konsantrasyonları

$10^{-12}$  ve  $10^{-8}$  M aralığında değişen farklı BR hormonları uygulanmıştır. Buna göre en fazla artış 36 saat süresince  $10^{-8}$  M brassinolid (BL) uygulanan grupta gerçekleşmiştir. Bu grupta BL kontrol grubuna göre proteini miktarını %296 oranında arttırmıştır. BR'nin algdeki uyarıcı etkisinin brassinolid > epibrassinolid > homobrassinolid > kastasteron > epikastasteron > homokastasteron şeklinde olduğu kanıtlanmıştır. Özdemir ve diğ. (2004) tuz stresi uygulanmış piriç bitkisinde 24-epibrassinolidin antioksidatif sisteme etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada daha önce belirttiğimiz gibi gruplar deiyonize su (kontrol), 3  $\mu$ M EBR, 120 mM NaCl ve 3  $\mu$ M EBR+120 mM NaCl olmak üzere dört gruptan oluşturulmuştur. Protein miktarı kontrol grubunda diğer üç gruba göre önemli derecede yüksek bulunmuştur.

## **2.11. BRASSİNOSTEROİDLERİN HÜCRE BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

BL'nin hücre bölünmesi üzerine uyarıcı ve ket vurucu etkileri (Hu ve diğ., 2000; Miyazawa ve diğ., 2003) rapor edilmiştir. Yüksek BR konsantrasyonu hücre bölünmesinin uyarılmasında daha az etkili olur ve hatta ket vurur (Hu ve diğ. 2000). Miyazawa ve diğ. (2003) BR'lerin hücre bölünmesi üzerine etkilerini tütün BY-2 hücre hattını kullanarak çalışmışlardır. Çalışmada BL'nin yalnızca kültürün erken evresinde ve oksin (2,4-D) yokluğunda hücre bölünmesini uyardığını bulmuşlardır. Hu ve diğ. (2000) hücre bölünmesi üzerine olan bu çelişkinin ortamdaki fitohormonların dengelenmemiş konsantrasyonu ya da bileşimiyle, mitoz faktörlerinin etkileşiminden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Hu ve diğ. (2000) BL'nin hücre bölünmesini uyaran siklin genlerinin transkripsiyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Howell ve diğ. (2007) BL'nin soğan bitkisinin kromozomları üzerine olan etkisini araştırmışlardır. BL'nin düşük konsantrasyonda (0,005 ppm) kök uzamasını ve mitoz sayısını kontrol grubuna göre iki katına çıkardığını, orta dozda (0,05 ppm) kök boyunu ve mitoz sayısını kontrollara göre önemli derecede fazlalaştırdığını; yüksek dozda (0,5 ppm) ise kök boyu ve mitoz sayısını kontrol değerlerine göre daha azalttığını göstermişlerdir. İstatistiksel analizler ortalama kök sayıları arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Kontrol material ile karşılaştırıldığında 0,005 ppm BL uygulanan kök hücrelerinde profaz evresindeki hücre sayısı yaklaşık olarak üçe katlanmıştır. Mitozun her evresindeki hücrelerin sayısı artmıştır. BR'nin pamuk bitkisi hücrelerine etkileri de Aydın ve diğ. (2006) tarafından araştırılmıştır. Gelişen kalluslar kontrol grubu ile

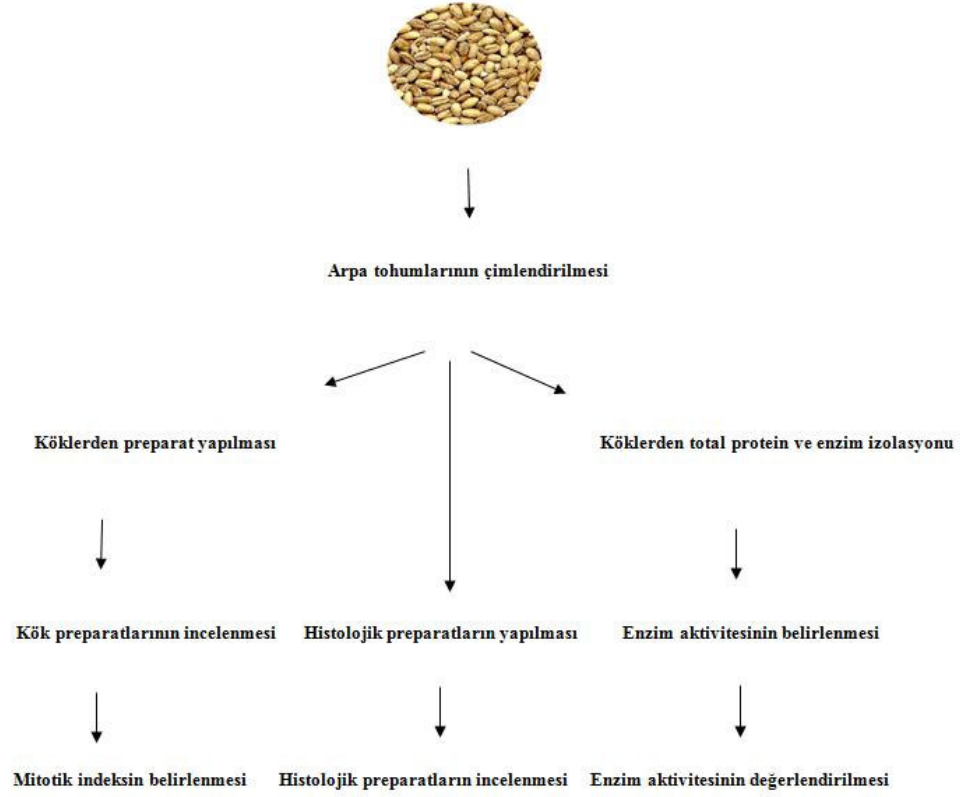
birlikte ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1  $\mu$ M) BR içeren MS besiyerine aktarılmıştır. Gelişimlerinin farklı evrelerindeki embriyogenik kalluslardan ve somatik embriyolardan yapılan histolojik preparatlar BR hormonu uygulamasının pamuk kalluslarında endoreduplikasyona ya da nükleer füzyona neden olduğunu göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada BR'nin nukleusta poliploidizasyon oluşturduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında bir brassinosteroid hormonu olan 28-Homobrassinolid'in arpada hücre bölünmesi, kök büyümesi, oksidatif stres enzimlerine, total çözülebilir protein miktarına olan etkileri araştırıldı ve farklı bitkilerde daha önce yapılan çalışmalardaki bulgularla karşılaştırılarak değerlendirildi.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. ARPA TOHULARININ ÇİMLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda kullandığımız *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer160 arpa tohumları 6 cm çapındaki cam petride beşer tane olacak şekilde distile suda kurutma kağıtları arasında çimlendirildi. Çimlendirme işlemi boyunca petriyer alüminyum folyo ile sarılı tutuldu. Alüminyum folyoya sarılan petriyer çimlendirme süresi boyunca fitotronda bekletildi. Kontrol grubunda çimlendirme için 2 ml distile su, deney grupları için ise konsantrasyonları 1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M ve 0,1 $\mu$ M HBR olacak biçimde her bir grup için 2'şer ml hormon çözeltileri kullanıldı. Çimlenen arpa tohumlarının kök boyları 48 ve 72 saat çimlenme sürelerinin sonunda ölçüldü. 48 ve 72 saat süresince çimlendirilen arpa tohumlarının kök boyları ve bir arpa tohumundan çıkan ortalama kök sayıları istatistiksel farklılığın belirlenmesi için Anova ve t testi kullanılarak kontrollerle karşılaştırıldı, total kök boylarının istatistiksel analizi için 100, seminal kök boyu uzunluğu analizi için 50, primer kök boyu analizi için 25 adet arpa kökü, bir tohumdan çıkan ortalama kök sayısının belirlenmesi için ise 25 adet arpa tohumu kullanıldı. 48 ve 72 saat çimlenme sürelerinin sonunda çimlenen arpa tohumlarının fotoğrafları çekildi. Yapılan çalışmalar Şekil 3.1.'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma sırasında izlenen ana aşamalar

### 3.2. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ ARPA KÖKLERİNDEN PREPARAT HAZIRLANMASI, MİTOTİK İNDEKSİN VE MİTOTİK ANORMALİLERİN BELİRLENMESİ

Materyal 48 saatlik süre sonunda hücre bölünme analizlerinde kullanılmak üzere fikse edildi. Fiksatifler etil alkol:asetik asitten hacmen 3:1 oranında taze olarak hazırlandı. Kök uçları keskin bir büstri ya da makas yardımı ile 1cm boyunda kesilerek fiksatife konuldu. Fiksatiften alınan kök uçları 1N HCl'de 3 dakika bekletilerek hidroliz edildi. Daha sonra kök uçlarındaki HCl kurutma kağıdı ile alındı. Bu kökler %2'lik aseto orseinde 30 dakika-1 saat boyunca bekletildi. Boyanmanın ardından kök ucu lam üzerine alındı ve kırmızı renkteki kök ucu büstri yardımı ile açık renkte boyanan bölgeden ayrıldı. Lam üzerindeki kırmızı renkteki kök ucu bir lamelle kapatıldı ve yavaşça ezildi. Hazırlanan kök preparatlarını daimi hale getirmek için kökler alkol serilerinden (sıra ile %50, %60, %70) geçirildi. Bu preparatlar ışık mikroskobu altında incelenerek her preparat için yaklaşık 400 hücre olmak üzere her deney grubu için

toplam 1200 civarında hücre sayılarak mitotik indeks hesaplandı. Anormallikler kontrolla karşılaştırmalı olarak incelendi ve tablolar halinde verildi. Önemli alanların mikro fotoğrafları çekildi.

### **3.3. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ KÖKLERDE HİSTOLOJİK ANALİZLERİN YAPILMASI**

#### **3.3.1. DAPI Boyama**

Karanlıkta çimlenen arpa kökleri taze olarak %45'lik asetik asit çözeltisi ile 10 dakika oda sıcaklığında muamele edildi. İki kere saf su ile durulanan kökler 5 dakika bir damla 1000 mg/ml DAPI boya ile karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra kökler lam üzerine alınarak lamel ile kapatıldı, kök şekline zarar verilmeyecek biçimde yavaşça ezildi ve floresans mikroskopta (DM4000 B, Leica) BGR (blue, green, red) filtresi ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

#### **3.3.2. İKI Boyama (Lugol Boyama)**

Hücre bölünmesi ile nişasta depolanması arasında ters bir ilişki bulunduğundan köklerde nişasta birikimini araştırmak amacı ile Lugol boyası (nişasta boyası) [5 gr iyot (I<sub>2</sub>) ve 10 gr potasyum iyot (KI) 100 ml distile su içerisinde çözüldü] kullanıldı. Lam üzerine konan taze arpa kök dokusu üzerine iki damla İKI damlatıldı ve üç dakika bekletilerek lamelle kapatıldı. Doku iyice yayıldıktan sonra boyanın fazlası lamelin diğer ucundaki kurutma kağıdına emdirildi. Işık mikroskobunda incelenen kök uçlarının fotoğrafları çekildi.

### **3.4. TOTAL ÇÖZÜLEBİLİR PROTEİN ANALİZLERİ VE OKSİDATİF STRES ENZİMLERİNİN AKTİVİTE TAYİNLERİ**

#### **3.4.1. Total Çözülebilir Protein İzolasyonu**

Enzim aktivite tayini için 48 saat boyunca alüminyum folyo ile sarılı olarak fitotronda çimlendirilen arpa tohumlarından yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda (kök ucundan itibaren) kesilerek çıkarılan ve daha sonra -70°C'de bekletilen bu kök uçları kullanıldı. BR hormonu uygulanmış olan deney grubu ve hormon uygulanmış olan kontrol grubu kök uçları bir birinden ayrı olarak steril havanda sıvı azot yardımı ile parçalandı. Daha sonra

bitki kökleri ekstraksiyon tamponu (50 mM PBS, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, %0.3 TritonX-100, %4 polivinilpirolidon) ile havanda iyice ezilmeye devam edildi. Her grupta 0.02 gram bitki materyali için 2 ml ekstraksiyon tamponu kullanıldı. İyice ezilen materyal ependorf tüplere alındı ve +4°C, 10,500 g ve 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı protein miktarının belirlemek ve enzim aktivite tayini için kullanıldı. Bu protein ekstraksiyon yöntemi Pan ve diğ. (2006)'den değiştirilerek uygulandı. Protein miktarı ise Lowry (Lowry ve diğ., 1951) yöntemi ile belirlendi. Standart olarak 'bovine serum albumine' (BSA) kullanıldı. Protein analizinde birbirinden bağımsız üç deney tekrarı yapıldı. Tüm sonuçlar istatistik analizleri yapılarak kontrolleri ile birlikte tablo ve grafikler halinde verildi.

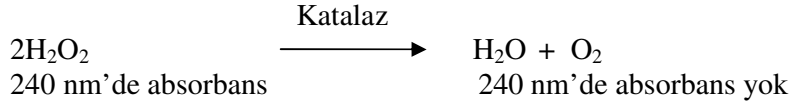
### **3.4.2. Total Çözülebilir Protein Miktarı Analizleri ve Oksidatif Stres Enzimlerinin Aktivite Tayinleri**

#### *3.4.2.1. Protein Miktarının Ölçümü*

0.1 ml protein içeren izolatlar 0.1 ml 2N NaOH ile 100°C'de 10 dakika hidroliz edildi. Daha sonra %2'lik (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sodyum karbonat), %1'lik (w/v) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (bakırsülfat pentahidrat), %2'lik (w/v) sodyum potasyum tartarat çözeltileri sıra ile hacmen 100:1:1 oranında karıştırılarak kompleks oluşturma belirteci oluşturuldu. Hidroliz edilen izolatlara 1 ml kompleks oluşturma belirteci eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika bekletildi. Daha sonra bu karışıma 0.1 ml folin belirteci vorteks kullanılarak ilave edildi ve oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Bekleme süresinin ardından 'microplate'teki kuyucuklara bu karışımlardan 200'er µl eklendi ve 550 nm'deki absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bitki köklerinin protein miktarlarının belirlenmesi için BSA standart olarak kullanıldı. Beş ayrı konsantrasyonda (5, 2.5, 1.25, 1 ve 0.625 mg/ml) BSA içeren çözeltiler hazırlandı. Daha sonra tüm protein özütleri ve protein standartları 'microplate'teki kuyucuklara yüklendi ve bu örneklerin 550 nm'deki absorbansı ölçüldü. Konsantrasyonları bilinen protein standartlarının optik dansitelerinden (OD) yararlanılarak konsantrasyon/OD grafiği çizildi ve grafiğin denklemi belirlendi. Elde edilen grafik denklemi yardımı ile tüm bitki kök özütlerinin OD değerleri kullanılarak kök özütlerinin protein konsantrasyonları hesaplandı.

#### *3.4.2.2. Katalaz Aktivitesi*

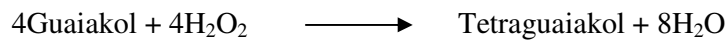
Katalaz (EC 1.11.1.6), hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar.



Hücrede oluşan hidrojen peroksidi hidroksil serbest radikali oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır. Yukarıdaki koşullara göre izole edilen bitki kök özütleri katalaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanıldı. Antioksidant savunma enzimlerinden biri olan katalazın aktivitesi, hidrojen peroksidin yıkımının, spektrofotometrik olarak, 240 nm'de izlenmesi temeline dayanan yöntemle belirlendi. 136 µl potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.2) ve 96 µl hidrojen peroksit (40 mM) içeren reaksiyon karışımına 8 µl total çözülebilir protein özütü eklenerek reaksiyon başlatıldı. Katalaz aktivitesi 240 nm'de gerçekleşen absorbanstaki düşüşün gözlemlenmesiyle belirlendi (Cho ve diğ., 2000). Spektrofotometrik okuma enzim ekstraktının eklenmesi ile yapıldı ve 392 saniye boyunca 49'ar saniye ara ile 9 kez okuma alındı ve bu süreler içindeki absorbens değişimi belirlendi. Daha sonra bu değerden yararlanılarak 1 mg proteinin 60 saniyede (1 dakika) meydana getirdiği absorbens değişim değeri hesaplandı. Absorbans değerindeki değişim  $\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$  protein olarak ifade edildi. 1 mg proteinin 1 dakikada meydana getirdiği absorbens değişim miktarındaki ( $\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$  protein) artış katalaz enzimi aktivitesindeki artışa işaret etmektedir. Katalaz aktivitesi ölçümlerinde üç deney tekrarı yapıldı.

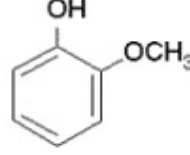
#### 3.4.2.3. Peroksidaz Aktivitesi

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimi, fenolik bileşikler ve/ve ya antioksidantlar gibi ko-substratların oksidasyonu aracılığı ile hidrojen peroksidi parçalar. POD, hücreyi serbest oksijen türlerinin zararlı etkilerinden koruyan bir enzimatik savunma sistemi bileşeni olup bu etkisini hidrojen peroksiti, substratlarının oksidasyonu aracılığıyla süpürmesiyle gösterir. Peroksidaz bu reaksiyonu:



şeklinde katalizler. 'Guaiacol' (2-metoksifenol) (Şekil 3.2.), sıklıkla peroksidaz analizlerinde hidrojen vericisi olarak kullanılır. Bir hidrojen vericisi olan guaiakol (gayakol) aracılığı ile peroksidaz tarafından hidrojen peroksidin bozunma oranının

spektrofotometrik olarak renk değişimi ile belirlenmesi temeline dayanır (Bergmeyer, 1974)

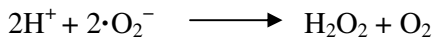


Şekil 3.2 'Guaiacol' (2-metoksifenol)'un kimyasal yapısı (Venus Chemicals, 2008)

Peroksidaz aktivitesi guaiakol oksidasyon metoduyla (Kochba ve diğ., 1997) belirlendi. Aktivite tayini için her kuyucuğa 240 µl reaksiyon karışımı (100 mM fosfat tamponu (pH 6.0), 8 mM 'guaiacol', 8 µl enzim ekstraktı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun 2.75 mM olması için 33 mM stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'dan 20 µl) eklendi. Absorbans artışı 470 nm'de 49 saniyede bir olmak üzere toplam 9 kez toplam 392 saniye kayıt edildi. Daha sonra bu değerden yararlanılarak 1 mg proteinin 60 saniyede (1 dakika) meydana getirdiği absorbans değişim değeri hesaplandı. Reaksiyon ham özütün eklenmesiyle başlatıldı. Absorbans değerindeki değişim ΔA<sub>470</sub>/dak/mg protein olarak ifade edildi. Absorbans değişim değerindeki artış POD aktivitesindeki artışa işaret etmektedir. Peroksidaz aktivitesi analizi birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrar edildi.

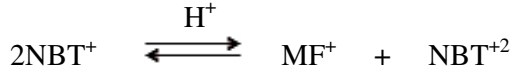
#### 3.4.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzimi canlı hücrelerde süperoksit radikalini süpürücü etkisi olan bir enzimdir.



SOD tarafından üretilen bu hidrojen peroksit katalaz ve peroksidaz enzimleri ile parçalanır. Süperoksit ve hidrojen peroksit reaksiyona girer ve hidroksil radikallerini oluşturur. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir (Chen ve Pan, 1996). Süperoksit dismutaz aktivitesi ışık etkisi altında 'nitrobluetetrazolium chloride'in redüksiyonunun süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile engellenmesi temeline dayanılarak belirlendi. Aşağıdaki şekilde gerçekleşen NBT'nin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucu monoformazan (MF) oluşur. Monoformazan 560 nm'de maksimum absorbans gösterir. SOD enzimi varlığında O<sub>2</sub><sup>-</sup> konsantrasyonu azaldığından NBT'den MF oluşumu yavaşlar. 560 nm'deki absorbansın artması süperoksit radikali ve MF

konsantrasyonundaki artışa işaret etmektedir. Dolayısıyla reaksiyonun meydana geldiği karışımda SOD enzimi aktivitesi azalmıştır (Moore ve Wang, 2006). Bu reaksiyondan faydalanarak bitki örneklerinden izole edilen enzim ekstraktlarının SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.



Analiz için toplam hacim 'microplate'teki her kuyucuk için 240 µl olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH 7.6), 0.1 mM Na-EDTA, 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 12 mM L-metionin, 75 µM 'p-nitrobluetetrazolium chloride' (NBT), 2 µM riboflavin, her kuyucuk için 7.2 µl ham özüt eklendi ve renk değişiminin meydana gelmesi için 1 saat bekletildi, daha sonra 560 nm'de spektrofotometrik okuma kaydedildi (Cakmak ve Marschner, 1992). Absorbans değerindeki artış SOD aktivitesindeki azalmaya işaret etmektedir. Süperoksit dismutaz aktivitesi analizi birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrar edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BRASSİNOSTEROİDLERİN KÖK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

48 ve 72 saat süresince çimlendirilen arpa tohumlarının bu süreler sonunda genel görünüşleri, kök boyları ve bir arpa tohumundan çıkan ortalama kök sayıları ve istatistik değerlendirmeleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Tablo 1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Çimlenen arpa tohumları (48 saat)

Kontrol grubu için distile su, deney grubu için 1, 0.5 ve 0.1 µM BR uygulanan arpa tohumları 48 saat karanlıkta çimlendirildi.

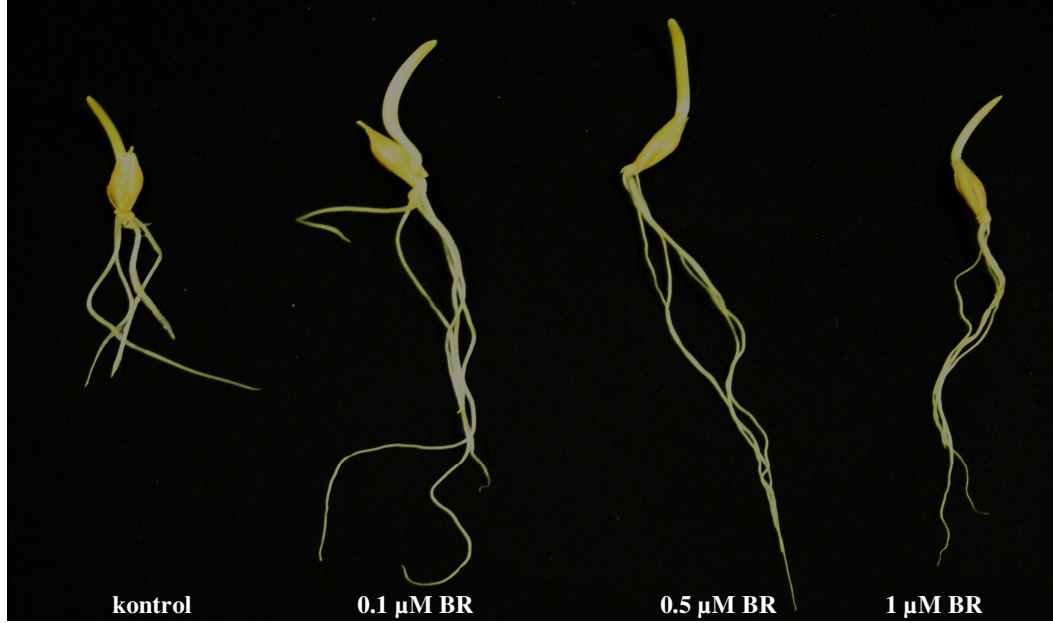
2 gün (48 saat) boyunca 0.1 µM, 0.5 µM ve 1 µM BR uygulanmış arpa tohumları kök boyları ile kontrol grubunun total kök boyları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu ( $P < 0.0001$ ), 48 saatlik çimlenme süresi sonunda bir tohumdan çıkan kök sayısı ise kontrol ile 0.1 µM BR arasında  $P$  ('probability' olasılık) değerinin 0.6939, kontrol ile 0.5 µM BR arasında 0.7921 ve kontrol ile 1 µM BR arasında 0.3665 olarak bulunmuştur. 48 saat boyunca çimlendirilen arpa tohumu primer köklerinin ortalama boylarının kontrol ve 0.1 µM BR arasındaki farklılığı ( $P = 0.0422$ ) istatistiksel olarak anlamlı, kontrol ve 0.5 µM BR arasında ( $P = 0.0036$ ) çok anlamlı, kontrol ve 1 µM BR arasında ise ( $P = 0.0001$ ) son derece anlamlı olduğu bulunmuştur. 48 saat boyunca çimlendirilen arpa tohumları seminal köklerinin ortalama boylarının kontrol ve 0.1 µM BR arasındaki farklılık ( $P < 0.0001$ ) istatistiksel olarak son derece anlamlı, kontrol ve 0.5 µM BR arasında ( $P = 0.0045$ ) çok anlamlı, kontrol ve 1 µM BR arasında ise ( $P < 0.0001$ ) son derece anlamlı olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Arpa tohumu kök boyu uzunlukları (48 saat)

2 gün (48 saat) karanlıkta çimlendirilen arpa tohumlarının çimlenmesi sonucu primer, seminal, tüm (total) köklerin ortalama uzunlukları ve bir tohumdan çıkan ortalama kök sayıları ölçüldü. Gruplar arasındaki varyans analizi Anova testi ile hesaplandı. Kontrol ile deney grupları arasındaki farklılığın (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M BR) anlamlılığı t testi ile belirlendi (Graphpad).  $\pm$  değeri standart sapmayı göstermektedir. \*P<0.0001; \*\*P=0.0001; \*\*\*P<0.005; \*\*\*\*P<0.05; \*\*\*\*\*P>0.5.

| 48 saat  | Kontrol         | 0.1 $\mu$ M BR       | 0.5 $\mu$ M BR       | 1 $\mu$ M BR         |
|--|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Primer köklerin ortalama uzunlukları (cm)      | 1.62 $\pm$ 0.6  | 2.17 $\pm$ 1.15****  | 2.38 $\pm$ 1.06***   | 2.49 $\pm$ 0.8**     |
| Seminal köklerin ortalama uzunlukları (cm)     | 1.10 $\pm$ 0.5  | 1.79 $\pm$ 0.9*      | 1.47 $\pm$ 0.7****   | 1.79 $\pm$ 0.8*      |
| Tüm (total) köklerin ortalama uzunlukları (cm) | 0.927 $\pm$ 0.5 | 1.740 $\pm$ 0.9*     | 1.900 $\pm$ 0.9*     | 1.930 $\pm$ 0.8*     |
| Bir tohumdan çıkan ortalama kök sayısı         | 3.880 $\pm$ 1.1 | 3.760 $\pm$ 1.0***** | 3.800 $\pm$ 1.0***** | 3.600 $\pm$ 1.0***** |

3 günlük (72 saat) çimlenme süresinin sonunda 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M BR uygulanmış arpa tohumları kök boyları ile kontrol grubunun total kök boyları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu (P<0.0001) bulunmuştur. 72 saat çimlenme süresinin sonunda bir tohumdan çıkan ortalama kök sayısının P değeri kontrol ile 0.1  $\mu$ M BR arasında 0.8625, kontrol ile 0.5  $\mu$ M BR arasında 0.4724 ve kontrol ile 1  $\mu$ M BR arasında ise 0.1528 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar bir tohumdan çıkan ortalama kök sayıları bakımından kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmadığını göstermektedir. 72 saat boyunca çimlendirilen arpa tohumları primer köklerinin ortalama boylarının kontrol ve 0.1  $\mu$ M BR arasındaki farklılığı P=0.0514, kontrol ve 0.5  $\mu$ M BR arasında P=0.0566, kontrol ve 1 $\mu$ M BR arasında ise P=0.0891 olduğu bulunmuştur. Buna göre kontrol grubuyla deney grupları arasında primer kök boyları bakımından istatistiksel bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.2 Çimlenen arpa tohumları (72 saat)

Kontrol grubu için distile su, deney grubu için 1, 0.5 ve 0.1 µM BR uygulanan arpa tohumları 72 saat karanlıkta çimlendirildi.

72 saat boyunca çimlendirilen arpa tohumları seminal köklerinin ortalama boylarının kontrol ve 0.1 µM BR arasındaki farklılık ( $P=0.0089$ ) istatistiksel olarak son derece çok anlamlı, kontrol ve 0.5 µM BR arasında ( $P=0.0054$ ) çok anlamlı, kontrol ve 1µM BR arasında ise ( $P=0.0006$ ) son derece anlamlı olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Arpa tohumu kök boyu uzunlukları (72 saat)

3 gün (72 saat) karanlıkta çimlendirilen arpa tohumlarının çimlenmesi sonucu primer, seminal, tüm (total) köklerin ortalama uzunlukları ve bir tohumdan çıkan ortalama kök sayıları ölçüldü. Gruplar arasındaki varyans analizi Anova testi ile hesaplandı. Kontrol ile deney grupları arasındaki (0.1 µM, 0.5 µM ve 1 µM BR) anlamlılık t testi ile belirlendi (Graphpad). ± değeri standart sapmayı göstermektedir. \* $P<0.0001$ ; \*\* $P=0.0006$ ; \*\*\* $P>0.005$ ; \*\*\*\* $P>0.05$ ; \*\*\*\*\* $P>0.1$ .

| 72 saat  | Kontrol     | 0.1 µM BR        | 0.5 µM BR        | 1 µM BR          |
|--|-------------|------------------|------------------|------------------|
| Primer köklerin ortalama uzunlukları (cm)      | 2.57 ± 0.8  | 3.18 ± 1.3*****  | 3.20 ± 1.4*****  | 3.14 ± 1.5*****  |
| Seminal köklerin ortalama uzunlukları (cm)     | 1.60 ± 0.6  | 2.04 ± 1.0***    | 2.14 ± 1.2***    | 2.23 ± 1.1**     |
| Tüm (total) köklerin ortalama uzunlukları (cm) | 1.610 ± 0.9 | 2.210 ± 1.1*     | 2.800 ± 1.6*     | 2.390 ± 1.3*     |
| Bir tohumdan çıkan ortalama kök sayısı         | 4.250 ± 1.0 | 4.200 ± 0.9***** | 4.040 ± 0.9***** | 3.800 ± 1.1***** |

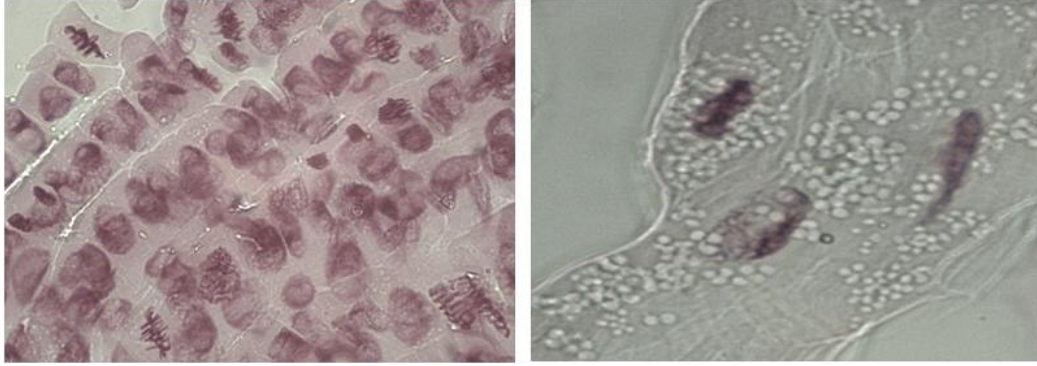
## 4.2. BRASSINOSTEROİD UYGULANMIŞ ARPA KÖK PREPARATLARI, MİTOTİK İNDEKS VE MİTOTİK ANORMALİLER

Aseto orsein boyama yöntemiyle boyanan arpa tohumu köklerinden yapılan preparatlar kullanılarak arpa tohumuna uygulanmış olan üç farklı konsantrasyondaki (0.1, 0.5, 1  $\mu$ M) BR hormonunun arpa bitkisi kök hücre bölünmesi üzerine olan etkileri yalnızca distile su kullanılarak çimlendirilen kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak belirlendi. Her grup için bir preparattan 400 hücre olmak üzere her grup için 3 preparat ile toplam 1200 hücre sayılarak belirlenen mitotik indeks Tablo 4.3’de verilmiştir. BR’nin arpa kök ucu hücrelerinde artan konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna göre mitotik indeksi arttırdığı ve bu artışın 1  $\mu$ M BR uygulamasında 48 saat sonunda kontrole göre yaklaşık 3.7 kat arttığı, anormallik gösteren hücrelere de yansıdığı belirlendi. Arpa kök uçlarından yapılan preparatlardan önemli alanlarda çekilen mikrofotografaları Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5’te verildi.

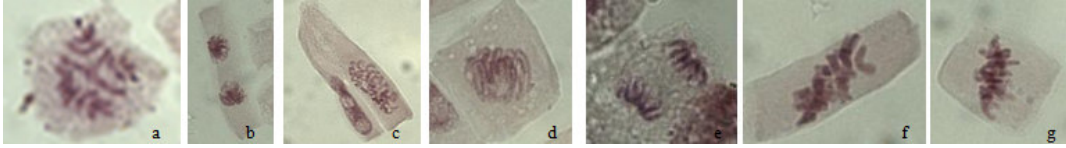
Tablo 4.3 Arpa tohumu kök hücrelerinin mitotik indeksleri (%)

|  | Kontrol | 0.1 $\mu$ M BR | 0.5 $\mu$ M BR | 1 $\mu$ M BR |
|--|---------|----------------|----------------|--------------|
| 48 saat çimlendirilen arpa tohumları kök ucu hücrelerinin mitotik indeksi      | 7.25    | 8.78           | 20.56          | 26.92        |
| 48 saat çimlendirilen arpa tohumları kök ucu hücrelerinin mitotik anormalileri | 2.0     | 3.0            | 4.0            | 9.0          |

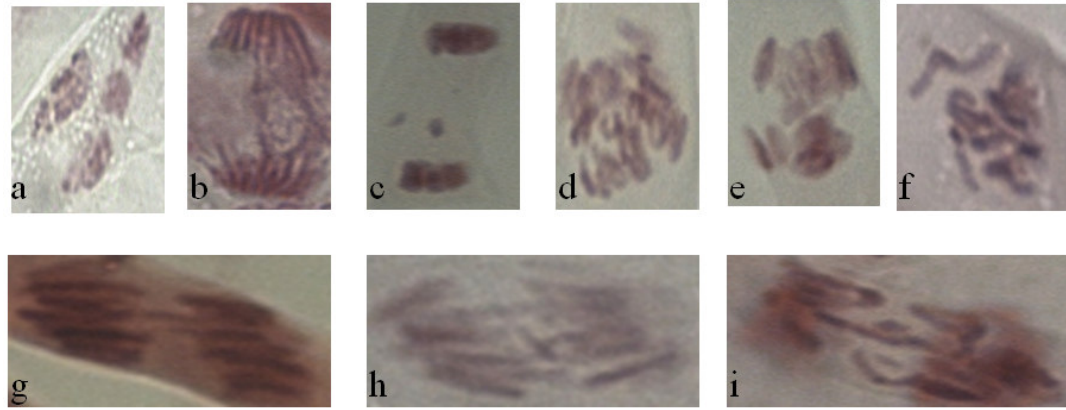
Histolojik preparatlarda yapılan analizlerde arpa kök ucu hücrelerinde BR’nin mitotik anormallikleri arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4.5, Tablo 4.3). Mikrofotografalarda da izlenebileceği gibi BR’nin mitozun farklı evrelerinde farklı bölünme anormallikleri (köprü oluşumu, fragment, çok nukleusluluk vb.) meydana getirdiği belirlendi.



**Şekil 4.3** 1  $\mu\text{M}$  BR uygulanmış arpa kök uçlarında mitoz  
1  $\mu\text{M}$  BR uygulanmış arpa kök uçlarında yoğun mitotik bölünmenin meydana geldiği bir bölge. Solda BR'nin artırdığı mitoz bölünmedeki hücreler; sağda BR'nin neden olduğu uzamış hücreler (1000X).



**Şekil 4.4** Kontrol ve 1  $\mu\text{M}$  BR gruplarında mitoz bölünme  
a) Kontrol profaz b) 1  $\mu\text{M}$  BR telofaz c) 1  $\mu\text{M}$  BR profaz d) 1  $\mu\text{M}$  BR profaz e) Kontrol anafaz f) 1  $\mu\text{M}$  BR metafaz g) metafaz (büyütme 1000X).

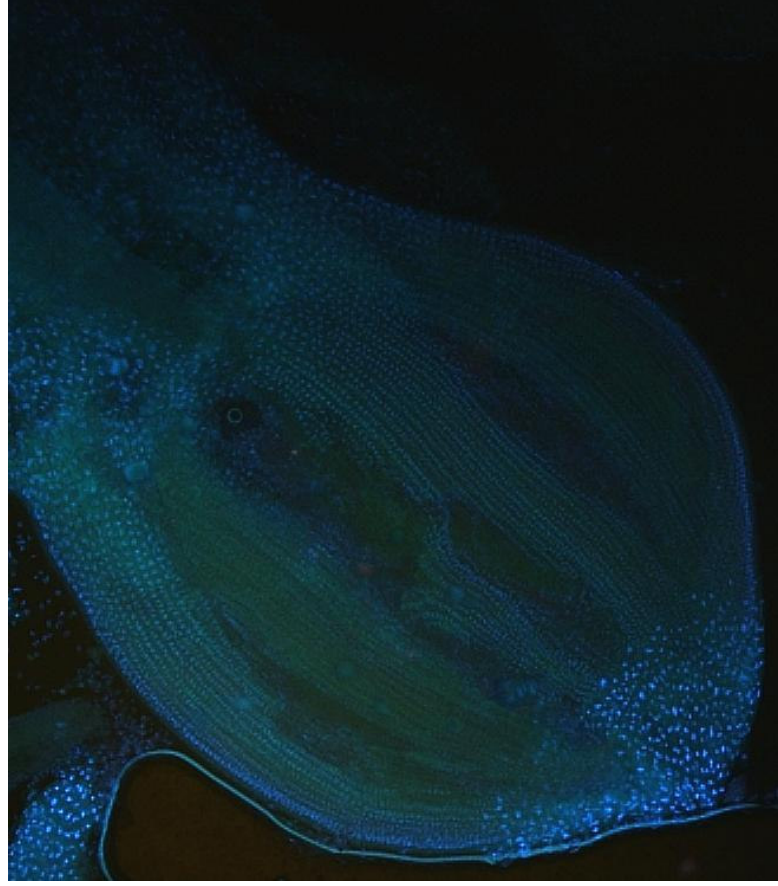


**Şekil 4.5** Arpa kök uçlarında mitotik anormaliler  
1  $\mu\text{M}$  BR uygulanmış arpa kök uçlarında mitotik bölünme sırasında gözlenen anormaliler a) Multinuclear hücre b) Anafazda köprü c) Telofazda gecikmiş kromozomlar d-f) Anafazda düzensizlik g-i) Anafazda köprü (büyütme 1000X).

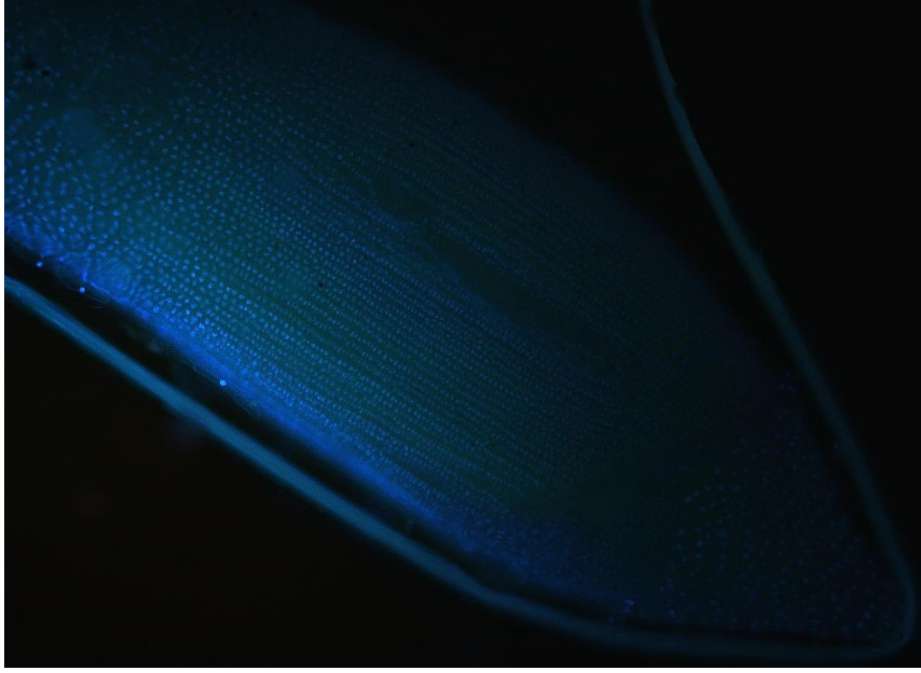
### 4.3. BRASSİNOSTEROİD UYGULANMIŞ KÖKLERDE HİSTOLOJİK ANALİZLER

48 saat boyunca karanlıkta 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda BR hormonu içeren distile suda ve kontrol olarak da yalnızca distile suda çimlendirilmiş köklerden taze olarak yapılan DAPI boyama işlemleri sonunda boyanan arpa tohumu köklerinin fotoğrafları fluoresan

mikroskobuyla (DM4000 B, Leica) 200X büyütmede incelendiğinde kök uçlarında kontrol materyale göre aşırı düzeyde genişlemeler izlendi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



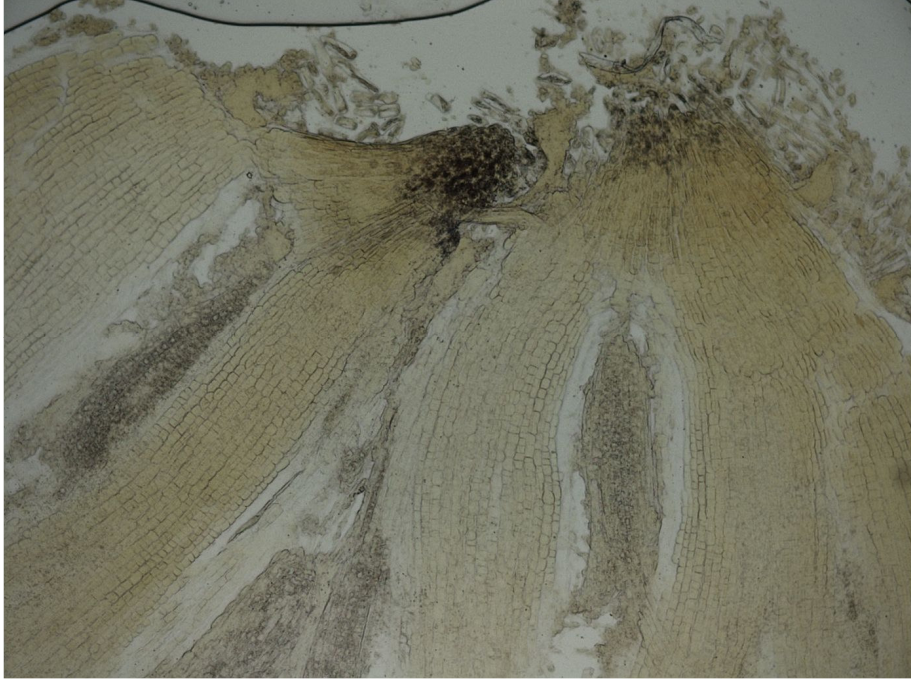
Şekil 4.6 DAPI ile boyanmış arpa kök ucu (1  $\mu$ M BR)  
1  $\mu$ M BR etkisinde 48 saat boyunca karanlıkta çimlendirilen ve taze olarak DAPI ile boyanan arpa kök ucu.



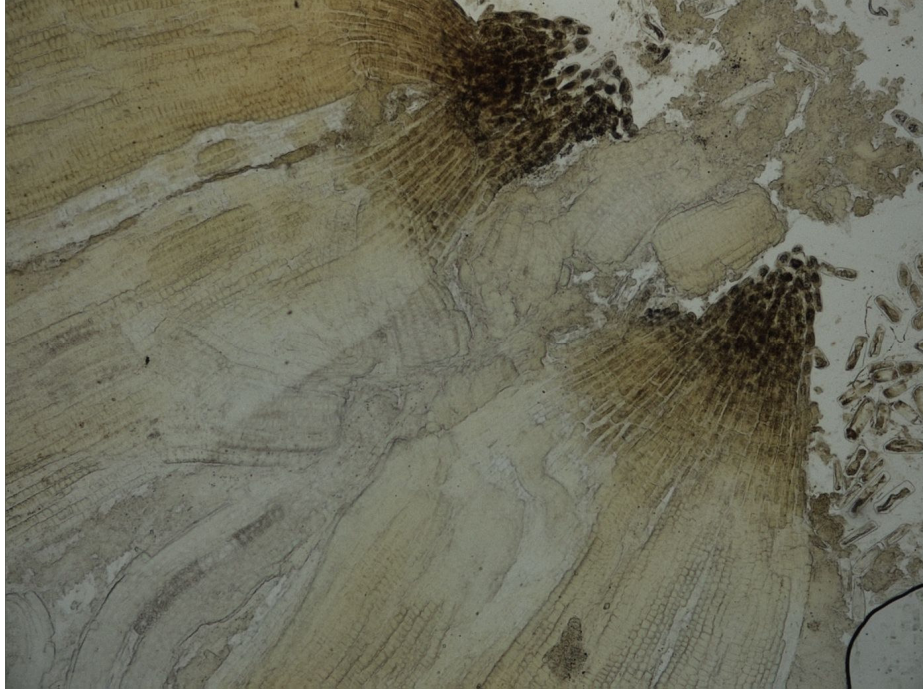
Şekil 4.7 DAPI ile boyanmış arpa kök ucu (kontrol)

Distile su içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta çimlendirilen ve taze olarak DAPI ile boyanan arpa kök ucu.

48 saat boyunca karanlıkta 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda BR hormonu içeren distile suda ve kontrol olarak da yalnızca distile suda çimlendirilmiş köklerden taze olarak yapılan İKI (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) boyama işlemleri sonunda boyanan arpa tohumu köklerinin fotoğrafları fluoresan mikroskopuyla (DM4000 B, Leica) 200X büyütmede incelendiğinde kök uçlarında kontrol materyale göre aşırı düzeyde nişasta depolanmasında azalma gözlemlendi.



**Şekil 4.8** IKI (Lugol) ile boyanmış arpa kök ucu (1  $\mu$ M BR)  
1  $\mu$ M BR etkisinde 48 saat boyunca karanlıkta çimlendirilen ve taze olarak IKI ile boyanan arpa kök ucu.

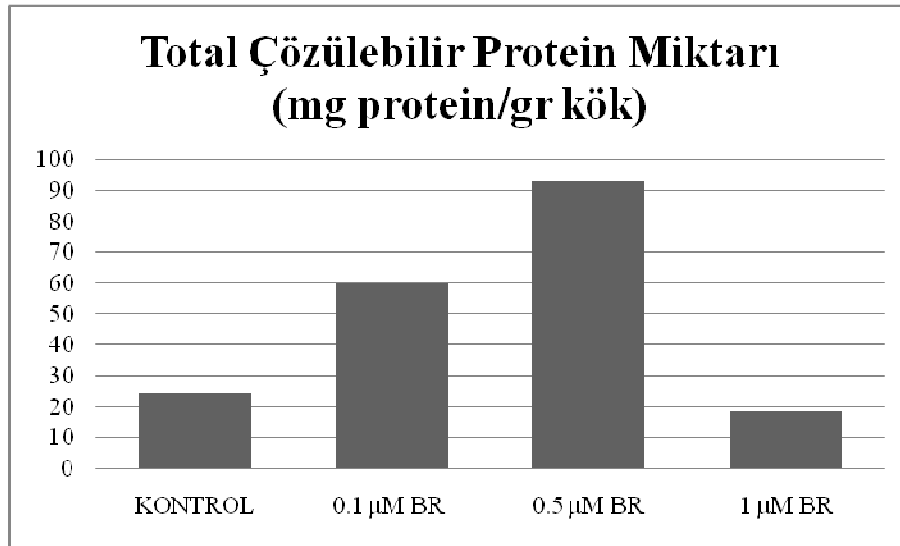


**Şekil 4.9** IKI (Lugol) ile boyanmış arpa kök ucu (kontrol)  
Distile su içerisinde 48 saat boyunca karanlıkta çimlendirilen ve taze olarak IKI ile boyanan arpa kök ucu.

#### 4.4. TOTAL ÇÖZÜLEBİLİR PROTEİN MİKTARI VE OKSİDATİF STRES ENZİM ANALİZLERİ

##### 4.4.1. Total Çözülebilir Protein Miktarı Analizi

Enzim aktivite tayini için öncelikle kontrol ve deney grubu kök uçlarından protein izolasyonu yapıldı. Daha sonra örneklerin spektrofotometre ile ölçülen absorbans değerlerinden Lowry yöntemiyle hesaplanan protein miktarları Şekil 4.10, Tablo 4.4'te verildi. Total çözülebilir protein miktarı bakımından kontrol grubu ile deney grupları (0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  BR) arasındaki farklılığın anlamlılık dereceleri sıra ile 0.0008, 0.0001 ve 0.0255 olduğu bulundu. Buna göre protein miktarları bakımından her üç grup (0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  BR) ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmaktadır ve BR hormonu arpa kök ucunda 0.1 ve 0.5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda kontrol grubuna göre protein miktarını artırırken, 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda protein miktarını azaltmıştır (Tablo 4.4). Grupların protein miktarı değerlerinden yararlanarak kontrol ve BR grupları için katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimleri aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 4.10 BR'nin protein miktarına etkisi

##### 4.4.2. Oksidatif Stres Enzim Analizleri

Kontrol ve BR grubunun katalaz ve peroksidaz aktiviteleri için sırası ile ' $\Delta A_{240}$  /dak/mg protein' ve ' $\Delta A_{470}$  /dak/mg protein' değerleri yani 1 mg proteinin  $\Delta A_{240}$  ve  $\Delta A_{470}$ 'de bir

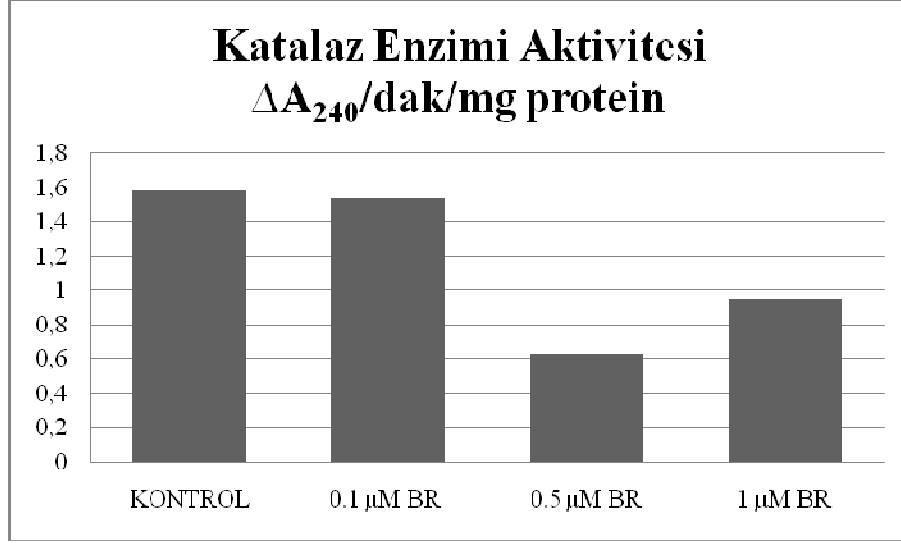
dakika boyunca meydana getirdiği absorbans değişim değerleri Tablo 4.4.'de verilmiştir ve bunun yanı sıra süperoksit dismutaz enzimi aktivite tayini için ise  $\Delta A_{560}$  değeri hesaplanmıştır. 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  BR uygulanmış arpa tohumlarının katalaz enzim aktivitelerinin kontrol grubuyla arasındaki farklılığın istatistiksel olarak sırası ile  $P=0.8017$ ,  $P=0.0022$ ,  $P=0.0103$  (Şekil 4.11, Tablo 4.4), peroksidaz aktivitelerinin sırasıyla 0.0298, 0.0270, 0.0008 (Şekil 4.12, Tablo 4.4), süperoksit dismutaz aktivitelerinin 0.1299, 0.0051, 0.0504 (Şekil 4.13, Tablo 4.4) olduğu hesaplandı.

Tablo 4.4 BR'nin katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerine ve total çözülebilir protein miktarına etkisi

Katalaz aktivitesindeki değişim 1 mg proteinin 240 nm'de 1 dakikada meydana getirdiği ortalama absorbans değişimi olarak verildi. Peroksidaz aktivitesindeki değişim 1 mg proteinin 470 nm'de 1 dakikada meydana getirdiği ortalama absorbans değişimi olarak verildi. Süperoksit dismutaz aktivitesi, süperoksit dismutaz enziminin 560 nm'de meydana getirdiği ortalama absorbans değeri olarak verilmiştir. Değerler, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak belirtildi. Tabloda belirtilen değerler Anova Testi ile hesaplandı. \*\*\*\* $P>0.1$ ; \*\*\* $P>0.01$ ; \*\* $P>0.001$ ; \* $P<0.001$ .

| 48 saat  | Kontrol          | 0.1 $\mu\text{M}$ BR  | 0.5 $\mu\text{M}$ BR | 1 $\mu\text{M}$ BR   |
|--|------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Katalaz Enzimi<br>$\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$<br>protein       | 1.58 $\pm$ 0.2   | 1.54 $\pm$ 0.1****    | 0.628 $\pm$ 0.05**   | 0.951 $\pm$ 0.07**** |
| Peroksidaz<br>Enzimi<br>$\Delta A_{470}/\text{dak}/\text{mg}$<br>protein | 8.28 $\pm$ 0.4   | 4.41 $\pm$ 1.9***     | 4.61 $\pm$ 1.8***    | 5.58 $\pm$ 0.1*      |
| Süperoksit<br>Dismutaz Enzimi<br>$\Delta A_{560}$                        | 0.159 $\pm$ 0.09 | 0.058 $\pm$ 0.004**** | 0.581 $\pm$ 0.09**   | 0.493 $\pm$ 0.1****  |
| Total Protein<br>Miktarı<br>(mg/gr kök)                                  | 24.1 $\pm$ 2     | 59.9 $\pm$ 10*        | 92.9 $\pm$ 6*        | 18.5 $\pm$ 2****     |

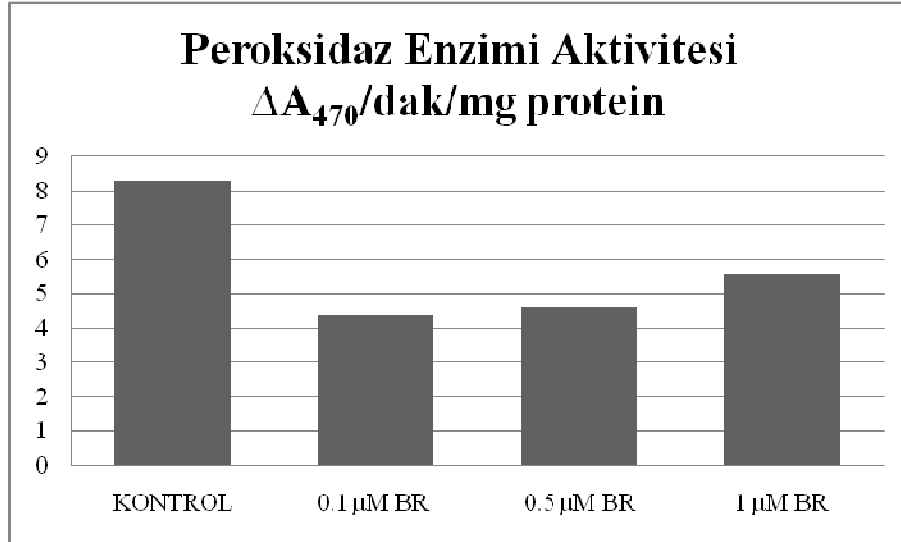
Buna göre BR hormonu arpa kök ucunda katalaz ve peroksidaz enzimi aktivitelerini kontrol grubuna göre azalttı ancak katalaz enzimi aktivitesinde meydana gelen değişimin uygulanan BR konsantrasyonundaki artışa bağlı olan doğrusal bir azalma olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.11 BR'nin katalaz aktivitesine etkisi

Katalaz aktivitesindeki değişim 1 mg proteinin 240 nm de 1 dakikada meydana getirdiği ortalama absorbanstaki artış olarak verilmiştir. Grafikte belirtilen değerler Anova Testi ile hesaplanmıştır. Absorbanstaki artış KAT enzimi aktivitesindeki artışa işaret etmektedir.

Ayrıca KAT enzimi aktivitesinde 0.1  $\mu\text{M}$  BR hormonu uygulanan grupla kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlendi.

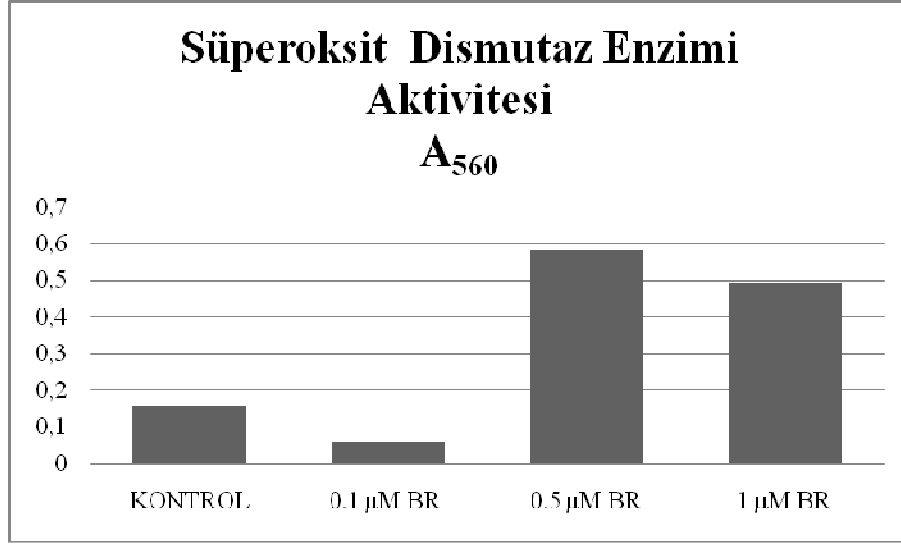


Şekil 4.12 BR'nin peroksidaz aktivitesine etkisi

Peroksidaz aktivitesindeki değişim 1 mg proteinin 470 nm de 1 dakikada meydana getirdiği ortalama absorbanstaki artış olarak verilmiştir. Grafikte belirtilen değerler Anova Testi ile hesaplandı. Kontrol ile deney grupları arasındaki anlamlılık (P) değeri t testi ile belirlendi. Absorbanstaki artış POD enzimi aktivitesindeki artışa işaret etmektedir.

Süperoksit dismutaz enzimi aktivitesinde 0.5 ve 1  $\mu\text{M}$  BR uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldi, 0.1  $\mu\text{M}$  BR

uygulanılan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız olan artış hesaplandı. Absorbansta meydana gelen artış SOD aktivitesinde azalmaya işaret etmektedir.



Şekil 4.13 BR'nin süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi

Değerler, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ile 560 nm'de meydana gelen ortalama absorban değeri olarak verilmiştir. Grafikte belirtilen değerler Anova Testi ile hesaplanmıştır. Absorbanstaki artış SOD enzimi aktivitesindeki azalmaya işaret etmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında arpa tohumları üç farklı konsantrasyonda (0.1, 0.5, 1  $\mu$ M) BR hormonu içeren çözeltiler içerisinde karanlıkta çimlendirilerek hormonun arpa bitkisinde kök gelişimi üzerine fizyolojik ve sitogenetik etkileri araştırıldı. BR'nin arpa kök büyümesini, mitotik indeksi arttırdığı, ve artan konsantrasyona bağlı olarak arpa kök ucu hücrelerinde kromozom anormalilerine neden olduğu belirlendi. Arpa kök ucunda KI ve DAPI boyama analizleri sonucunda 1  $\mu$ M BR'nin kontrol grubuna göre nişasta miktarını azalttığı ve kök çapında genişlemeye neden olduğu gözlemlendi. BR uygulaması total çözülebilir protein miktarını 0.1 ve 0.5  $\mu$ M konsantrasyonda artırırken 1  $\mu$ M konsantrasyonda azalttı, ayrıca katalaz, peroksidaz aktivitelerinde anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu. Buna karşın BR'nin yalnızca 0.5 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonda süperoksit dismutaz aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlendi.

BR'nin tohum çimlenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için çimlenen arpa tohumlarının 48 ve 72 saat sonunda kök boyları ve bir tohumdan çıkan total kök sayısı ile birlikte primer kök boyu ve seminal kök boyları ölçüldü. Yapılan ölçümlerde BR'nin total kök boyunu tüm üç grupta (0.1, 0.5, 1  $\mu$ M BR) kontrol grubuna göre arttırdığı, bir tohumdan çıkan total kök sayıları bakımından ise kontrol grubu ile diğer üç grup arasında istatistiksel bakımdan bir farklılık bulunmadığı, primer ve seminal kök boyları bakımından ise kontrol ve diğer üç grup arasındaki farklılığın anlamlı olduğu hesaplandı. BR arpa tohumlarının kök boyunu artan BR konsantrasyonuna bağlı olarak arttırdı. Kök büyümesi üzerine yapılan bir çalışmada (Müssig ve diğ., 2003) BR'nin kök büyümesi üzerine pozitif ya da negatif etkileri uygulanan BR konsantrasyonuna bağlı olarak meydana gelmiştir. Düşük eksojen BR konsantrasyonu yabani tip bitkilerde kök büyümesini uyarırken, BR-kusurlu mutantların kök boyunu normal hale getirmektedir. EBR'nin ve EKS düşük konsantrasyonları kök uzamasını *Arabidopsis* yabani tip bitkide %50, BR-kusurlu mutantlarda (*dwf1-6* ve *cbb3*) %150 artırmıştır. Yüksek BR konsantrasyonu kök büyümesine ket vurmuştur. Eşik seviyesi aşılsa BR ket vurucu etki yapmaktadır. Eşik seviyesi uygulanan BR'nin biyolojik aktivitesine ve genotipe bağlı olduğu belirlenmiştir. BL'nin kök büyümesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise (Howell ve diğ., 2007) soğan bitkisi kullanılmıştır. BL'nin soğan bitkisinde düşük konsantrasyonda (0,005 ppm) kök uzamasını kontrol grubuna göre iki

katına çıkardığını, orta dozda (0,05 ppm) kök boyunu kontrollara göre önemli derecede fazlalaştırdığını; yüksek dozda (0,5 ppm) ise kök boyunu kontrol değerlerine göre azalttığını belirtilmiştir. Ayrıca ortalama kök sayıları arasında önemli bir fark olmadığını rapor edilmiştir. BR'nin çimlenmeyi uyarıcı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Steber ve McCourt, 2001) bir çok GA biyosentezi bakımından mutant olan bitkide ve GA'ya duyarsız *sleepy1* mutanlığı olan bitkide BR'nin çimlenmeyi sağladığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlara göre BR'nin çimlenmeyi uyardığını ve çimlenme olasılığını artırdığını, normal çimlenme için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında yapılan deneylerde kullanılan konsantrasyonların tümü arpada kök gelişimini uyarmıştır. Literatürle karşılaştırmalı olarak değerlendirdiğimizde BR'nin kök gelişimi üzerine bir etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte bu etkinin yönünün kullanılan bitki materyali ve deney koşullarına bağlı olarak değişim gösterdiğini vurgulamak gerekir.

Arpa kök ucu hücrelerinin mitotik indekslerinin belirlenmesi için çimlenen tohum kökleri 48 saatin sonunda fikse edildi ve bu köklerden asetoorsein boyama ile preparatlar yapıldı. 48 saat süresince BR etkisinde çimlendirilmiş arpa kök ucu hücrelerinde BR'nin 0.1, 0.5, 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda kontrollara göre bölünen hücre sayısını arttırdığı belirlendi. Ayrıca arpa kök hücrelerinde meydana gelen anormal hücre bölünme miktarının da artan BR konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiği tespit edildi. İki boyama ile arpa köklerinden yapılan preparatlar 1  $\mu$ M BR'nin kontrol grubuna göre nişasta miktarının azalmasına neden olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra DAPI boyama ile boyanan 1  $\mu$ M BR ve kontrol grubu arpa kökleri arasında morfolojik olarak farklılık izlendi. 1  $\mu$ M BR uygulanan grupta kök ucunda kontrol grubuna göre genişleme gözlemlendi. BR hormonunun hücre bölünmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Howell ve diğ., 2007) BL'nin düşük konsantrasyonda (0,005 ppm) mitoz sayısını kontrol grubuna göre iki katına çıkardığı, orta dozda (0,05 ppm) mitoz sayısını kontrollara göre önemli derecede fazlalaştırdığı; yüksek dozda (0,5 ppm) ise mitoz sayısını kontrol değerlerine göre azalttığını bildirilmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında 0,005 ppm BL uygulanan kök hücrelerinde profaz evresindeki hücre sayısının yaklaşık olarak üç katlandığı ve ayrıca mitozun her evresindeki hücrelerinin sayısının arttığı belirtilmiştir. BR'nin hücre bölünmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada (Miyazawa ve diğ., 2003) tütün BY-2 hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmada 2,4-D içeren ve içermeyen besi ortamına  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M konsantrasyonlarda BL eklenmiştir ve hormon eklenmeyen bir grup (0 M BL) oluşturulmuştur. 2,4-D içermeyen ortama BL eklendiğinde hücre sayısı doza bağlı olarak artış göstermiştir. Durağan fazdaki BY-2 hücreleri hormon içermeyen ortama kültür edildiğinde hücre bölünme oranı azalmıştır. Hormon içermeyen ortama BL hormonu eklendiğinde durağan fazdaki hücreler doza bağlı olarak çoğalmıştır. 2,4-D içeren ortama BL uygulaması doza bağlı olarak önemli bir artış meydana getirmemiştir. Buna göre BL'nin kültürün yalnız erken evresinde ve 2,4-D yokluğunda hücre bölünmesini uyardığı kaydedilmiştir. Ayrıca söz konusu olan çalışmada (Miyazawa ve diğ., 2003) hücre siklusu ile ilişkili genler olan B-tipi siklin (*CYM*) ve *histon H4* genlerinin anlatımlarının arttığı ve BL uygulanan hücrelerin 2,4-D uygulananlardan morfolojik olarak farklı olduğu belirlenmiştir. 2,4-D uygulanmış ortama kültür edilmiş hücreler ile BL içeren ortamda kültüre alınmış hücreler arasında kültürün ikinci gününde morfolojik farklılıklar gözlenmiştir. BL uygulanmış hücreler hormon uygulanmamış kültürlerle karşılaştırıldığında BL'nin daha küçük hücrelerin oluşmasına ve nişasta granüllerinin sayısının azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. BL uygulanmış hücrelerin morfolojileri zengin sitoplazma ve daha az ve daha küçük nişasta granülleri içermeleri nedeniyle 2,4-D uygulanmış olanlardan tamamıyla farklı bulunmuştur. Bu sonuçlar nişasta miktarının BL'nin dozuna bağlı olarak önemli miktarda azaldığını göstermektedir. Bu çalışmaların yanı sıra brassinosteroidin pamuk bitkisi üzerine etkileri Aydın ve diğ. (2006) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada on günlük pamuk fideleri eksplant olarak kullanılmıştır ve hipokotiller çıkarılmıştır ve kallus oluşumu için BAP ve kinetin ile birlikte B<sub>5</sub> vitamini eklenmiş MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Gelişen kalluslar kontrol grubu ile birlikte ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1 µM) BR içeren MS besiyerine aktarılmıştır. Gelişimlerinin farklı evrelerindeki embriyogenik kalluslardan ve somatik embriyolardan yapılan histolojik preparatlar BR uygulanmış kalluslar üzerinde BR'nin erken embriyogenez sırasında poliploidizasyona neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara benzer biçimde BR'nin çimlenmekte olan arpa tohumu köklerinde artan BR konsantrasyonuna bağlı olarak hücre bölünmesini arttırdığı, anormal kromozomal yapıların oluşumuna neden olduğu ayrıca 1µM BR'nin kontrol grubuna göre nişasta miktarını azalttığı gözlenmiştir. Bu bulguların yanısıra BR'nin ilk kez arpa kök ucunda genişlemeye neden olduğu ve artan BR konsantrasyonuna bağlı olarak

mitoz bölünme anormalilerine neden olduğu belirlendi. Arpa tohumlarına eksojen olarak uygulanan BR hormonu gelişen köklerin hücre zarından algılanarak nukleusa kadar ulaşır ve gen/genlerin anlatımını uyararak arpa kök gelişimini arttırmakta olduğu ileri sürülebilir.

BR hormonunun çeşitli stres faktörlerine karşı bitkiye tolerans sağladığı daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Hayat ve diğ., 2007, Kagale ve diğ., 2007, Mazorra ve diğ., 2002, Özdemir ve diğ., 2003). Bu tez çalışmasında 48 saat boyunca BR hormonu etkisine bıraktığımız arpa tohumlarının kökleri kullanılarak KAT, POD ve SOD enzimlerinin aktiviteleri araştırılarak BR'nin arpa bitkisine olası stres durumlarına karşı savunma sağlayıp sağlamadığı belirlendi. Katalaz enzimi, hidrojen peroksidin hücreye olan zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için onu süpüren bir enzimdir. Doğrudan hidrojen peroksitle reaksiyona girmektedir. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için, bir miligram proteinin 1 dakikada 240 nm'de meydana getirdiği absorbans değişikliği hesaplanmıştır ve absorbans değişiminde meydana gelen artış söz konusu grupta katalaz enzimi miktarındaki artışa işaret etmektedir. Bu tez çalışmasında BR hormonu etkisine bırakılan arpa bitkisi köklerinden yapılan katalaz aktivitesi analizleri ile istatistiksel anlamda önemli bir azalma olduğu görüldü. Katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre BR uygulanan üç grupta da bir azalma gösterdi ancak artan konsantrasyona bağlı olarak değişen doğrusal bir enzim aktivite azalması meydana gelmedi. Bunun yanısıra BR'nin katalaz aktivitesinde 0.1 µM konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya neden olmadığı belirlendi. Peroksidaz enzimi, hücreyi serbest oksijen türlerinin zararlı etkilerinden koruyan bir enzimatik savunma sistemi bileşeni olup bu etkisini hidrojen peroksiti, substratlarının ('guaiacol' gibi bir substrat) oksidasyonu aracılığıyla süpürmesiyle gösterir. Pan ve diğ. (2006) meyankökü bitkisinde peroksidazın bu özelliğini ele alınarak yaptıkları çalışmada, bir miligram proteinin dakikadaki 470 nm'de absorbansı şeklinde ölçülen peroksidaz aktivitesindeki değişimin kuraklık stresi altında arttığı gözlemlendi. Bu tez çalışmasında BR etkisi altındaki arpa tohumu kökleri ile yapılan analiz çalışmalarında peroksidaz aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir azalma meydana gelmiştir. BR uygulanan tüm üç grupta da POD aktivitesinde kontrol grubuna göre azalma belirlendi. Süperoksit dismutaz enzimi canlı hücrelerde süperoksit radikalini süpürücü etkisi olan bir enzimdir. Süperoksit radikalinin hücreler için zararlı olan bir bileşik

olması nedeniyle SOD enzimi bitkilerin savunma mekanizmaları için önemlidir. SOD enziminin süperoksit radikali ile katalizi sonucu meydana gelen hidrojen peroksit KAT ve POD enzimlerince parçalanır. Süperoksit dismutaz aktivitesi ışık etkisi altında 'nitrobluetetrazolium chloride'in redüksiyonunun süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) ile engellenmesi temeline dayanılarak belirlendi ve meydana gelen renk değişimi 560 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edildi. BR'nin 0.5 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonda süperoksit dismutaz aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edildi. BR'nin antioksidant sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada (Mazorra ve diğ., 2002) ise domates yaprak diskleri kullanılarak KAT, SOD ve POD aktiviteleri üzerine iki farklı konsantrasyondaki (10.60 ve 2.12 nM) EBR'nin etkileri 25 ve 40°C'de analiz edilmiştir. SOD aktivitesi her iki konsantrasyon ve sıcaklık derecesinde uyarılırken, POD aktivitesi ise her iki konsantrasyonda da 25°C sıcaklık değerinden etkilenmemiştir, 40°C'de ise uyarılmıştır. Bununla birlikte KAT aktivitesinin ise konsantrasyona ve sıcaklığa bağlı olduğu açık bir biçimde gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise EBR'nin tuz stresi uygulanmış *Brassica juncea* bitkisinde antioksidant enzimlerine etkileri araştırılmıştır. Hayat ve diğ. (2007) *B. juncea* bitkisine kadmiyum stresi uygulamasından sonra EBR'nin antioksidatif stres enzimleri olan KAT, POD ve SOD'un aktivitelerini kontrollara göre arttırdığını rapor etmiştir. Özdemir ve diğ. (2004) tuz stresi uygulanmış pirinç bitkisinde EBR antioksidatif sisteme etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarını dört gruptan oluşturmuşlardır. Gruplar deiyonize su (kontrol), 3  $\mu$ M EBR, 120 mM NaCl ve 3  $\mu$ M EBR+120 mM NaCl'den oluşturulmuştur. Buna göre 120 mM NaCl stresi etkisindeki bitkide artan peroksidaz aktivitesi, EBR+NaCl uygulanan grupta önemli derecede azalmıştır. Ancak EBR uygulanan grupla kontrol grubunu karşılaştırdığımızda SOD, KAT ve GR aktivitesinde önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Kontrol bitkilerinin APOD aktivitesini EBR ve NaCl uygulanan grupla karşılaştırdığımızda sırası ile %31, %62 artış meydana gelmiştir. APOD enzimi aktivitesi EBR+NaCl uygulanan grupta ise kontrol grubuna benzerlik göstermiştir. Yalnızca NaCl uygulanan grupla karşılaştırıldığında APOD aktivitesinde önemli bir düşüş meydana gelmiştir. SOD aktivitesi kontrol grubunda diğer üç gruba göre oldukça yüksek bulunmuştur. EBR, NaCl ve EBR+NaCl grupları arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. KAT ve GR aktiviteleri kontrol grubunda diğer üç gruba göre yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunun APOD aktivitesi EBR uygulanan gruptan anlamlı bir

farklılık göstermemiştir. Bunun yanısıra kontrollerle karşılaştırıldığında NaCl stresi uygulanan grupta azalma gözlenmiştir. Kuraklık, soğuk ve toprak tuzluluğu bitkinin büyüme ve üretkenliğini etkileyen; çevresel stres faktörleridir. Kagale ve diğ., (2007) EBR'nin *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica napus* fidelerinde kuraklığa toleransı artırdığını bildirmişlerdir. EBR'nin *A. thaliana* ve *B. napus*'ta kuraklıktan sorumlu genlerin anlatımını etkilediğini kanıtlamışlardır. Brassinosteroidlerin oksidatif stres enzimlerine olan etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise buğday yapraklarına epibrassinolid (EBR) (Sağlam-Çağ, 2006) uygulanmıştır. Çalışmada deney solüsyonu olarak farklı konsantrasyonlarda EBR (0.001  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) çözeltileri ve kontrol uygulaması için distile su kullanılmıştır. Çalışmaya göre peroksidaz aktivitesinde artış protein içeriğinde ise yalnızca 10  $\mu$ M BR uygulanan konsantrasyonda azalma tespit edilmiştir. Bu bilgiler oksidatif stres enzimlerinin kullanılan deney materyali ve uygulama yöntemine bağlı olarak etkilendiklerini ve farklı yanıtlar verdiğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında BR'nin KAT ve POD aktivitelerini azalttığı, SOD aktivitesini ise 0.5 ve 1  $\mu$ M BR konsantrasyonlarında azalttığı belirlendi.

Tarım ürünlerinin beslenmede önemli bir yer tutması nedeniyle artan dünya nüfusuna bağlı olarak tarımsal ürünlere olan ihtiyaç artmaktadır. Ancak dünyada ve ülkemizde tarım alanlarına ayrılan bölgelerin giderek azalması beslenme için gereken payın azalmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra hızla değişen iklim koşulları (küresel ısınma vs.) da ürün eldesini ve verimini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle çok daha az alanda yüksek verimle tarım ürünlerinin yetiştirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Ziraai alanda bitki verimini arttırmak için uzun yıllardan bu yana hormonlar ve bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır. Brassinosteroid hormonlarından önce tanımlanmış olan oksin, sitokinin, absisik asit, etilen ve gibberellin hormonlarının bitkiler üzerine etkileri yoğun biçimde araştırılmıştır. Ancak brassinosteroid hormonlarının tanımlanmasından bu yana bu hormonlarla ilgili çok az şeyin bilinmesi ve bir çok yönde etkilerinin bulunması konuya ilgiyi arttırmıştır. Arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer 160) bira sanayiinde malt eldesi için kullanılmasından ve hayvan yemi olmasından dolayı ziraai bakımdan önemli bir bitkidir. Bu nedenle BR'nin arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer 160) bitkisinde oluşturduğu etkilerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Arpanın uzun yıllardan bu yana yetiştirilip tarımının yapılması ve dünyada geniş dağılım gösteren bir bitki olması bu bitkiye olan önemi arttırmaktadır. Arpanın

özellikle bira sanayiinde kullanılması ve hayvan yemi olarak ekonomik değerinin olması arpa tarımına duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Bira sanayiinde arpa tohumları çimlendirilmekte, elde edilen kökçükler tohumdan ayrılmakta ve kalan tohum kısmı malt eldesi için kullanılmaktadır. BR'nin 48 ve 72 saat gibi çok kısa sürelerde kök boyunu kontrol grubuna göre artan BR konsantrasyonuna bağlı olarak önemli miktarlarda arttırması, arpa tohumlarından malt elde etme aşaması için gerekli olan zamanın kısaltılmasını sağlayacaktır. BR hormonunun arpa tohumları üzerine olan bu etkisi, malt elde etmek için gereken süreyi kısaltarak malt sanayiine katkıda bulunmayı sağlayabilir.

Bu tez çalışması BR'nin arpada (*Hordeum vulgare* L. cv. Zafer 160) tohum çimlenmesine ve kök boyu uzamasına, hücre bölünmesine ve anormal kromozomlu mitoz oluşumuna, abiyotik stres hormonları olan katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerine etkilerinin belirlendiği ilk çalışmadır.

## KAYNAKLAR

ALI, B., HASAN, S.A., HAYAT, S., HAYAT, Q., YADAV, S., FARIDUDDIN, Q., A., AHMAD, 2008, A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek), *Environmental and Experimental Botany*, 62, 153–159.

ALBAYRAK, G., GÖZÜKIRMIZI, N., 1999, RAPD analysis of genetic variations in barley, *Tr J of Agriculture and Forestry*, 23, 627-630.

ALTINIŞIK, M., 2008, *Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar* [online], Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf> [Ziyaret Tarihi: 28 Nisan 2008].

ALTINKUT, A., GÖZÜKIRMIZI, N., 2003, Search for microsatellite markers associated with water stress tolerance in wheat through bulked segregant analysis, *Molecular Biotechnology*, 23, 97-106.

ANONİM, 2007, *Arpa* [online], Selçuklu Ziraat Odası, <http://www.selcukluziraatodasi.org/bitkisel/arpa.html> [Ziyaret Tarihi: 31 Ekim 2007].

ANONİM, 2007, *Barley Grain Dorsal* [online], The Maltsters Association Of Great Britain, [www.ukmalt.com/gallery/pages/image001.asp](http://www.ukmalt.com/gallery/pages/image001.asp) [Ziyaret Tarihi: 14 Kasım 2007].

ANONİM, 2007, *Barley Grain Ventral* [online], The Maltsters Association Of Great Britain, [www.ukmalt.com/gallery/pages/image002.asp](http://www.ukmalt.com/gallery/pages/image002.asp) [Ziyaret Tarihi: 14 Kasım 2007].

ANONİM, 2007, *Hydrolase Action and Modification* [online], Carlsberg Research Center, <http://www.crc.dk/flab/hydrolas.htm> [Ziyaret Tarihi: 14 Kasım 2007].

ANONİM, 2007, *The Barley Grain* [online], Carlsberg Research Center, <http://www.crc.dk/flab/the.htm> [Ziyaret Tarihi: 14 Kasım 2007].

ANONİM, 2008, *2-methoxyphenol* [online], Venus Chemicals, <http://www.venustechnochem.com/images/2-METHOXYPHENOL.jpg> [Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2008].

ANONİM, 2008, *Barley Taxonomy* [online], Gramene, [http://acorn.cshl.org/species/hordeum/barley\\_taxonomy.html](http://acorn.cshl.org/species/hordeum/barley_taxonomy.html) [Ziyaret Tarihi: 21 Şubat 2008].

ANONİM, 2008, *Food Outlook Global Market Analysis* [online], Food And Agriculture Organization Of The United Nations, <http://www.fao.org/docrep/010/ah876e/ah876e14.htm#25> [Ziyaret Tarihi: 12 Şubat 2008].

ANONİM, 2008, *İstatistikler* [online], Toprak Mahsulleri Ofisi, <http://www.tmo.gov.tr/tmonet/content?c=yillaragorefindikfiyat1> [Ziyaret Tarihi: 12 Şubat 2008].

ANONİM, 2008, *The Anatomy of a Barley Spike* [online], The Brewers The Market Guide, <http://www.brewingtechniques.com/bmg/schwarzb.html> [Ziyaret Tarihi: 20 Şubat 2008].

ANOVA, 2008, *ANOVA: ANalysis Of VAriance between of groups* [online], Anova, <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm> [Ziyaret Tarihi: 11 Mart 2008].

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 408, 796-815.

ARI, Ş., BİLGİN, G., ÇOBANOĞLU, G., GÜREL, F., GÖZÜKİRMİZİ, N., 1995, Determination of barley hybrids with molecular markers, *Cereal Research Communications*, 23 (3), 229-234.

ARICAN, E., GÖZÜKİRMİZİ, N., 2008, Effects of hyperbaric oxygenation on cultured barley embryos, *Acta Biologica Hungarica*, 59 (4), (Baskıda).

AYDIN, Y., TALAS-OGRAŞ, T., İPEKÇİ-ALTAŞ, Z., GOZUKİRMİZİ, N., 2006, Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis, *Biologia*, 61 (3), 289-293.

BACK, T.G., PHARIS, R.P., 2003, Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, 350-361.

BAJGUZ, A., 2000, Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiology Biochem.*, 38 (3), 209-215.

BAJGUZ, A., TRETYN, A., 2003, The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants, *Phytochemistry*, 62, 1027-1046.

BANCOS, S., NOMURA, T., SATO, T., MOLNAR, G., BISHOP, G.J., KONCZ, C., YOKOTA, T., NAGY, F., SZEKERES, M., 2002, Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiology*, 130, 1-10.

BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G., 1995, Steroid hormone receptors - Many actors in search of a plot, *Cell*, 83, 851-857.

BENNETT, M.D., BHANDOL, P., LEITCH, I.J., 2000, Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses-807 New Estimates, *Annals of Botany*, 86, 859-909.

BERGMEYER H.U., 1974, Reagents for enzymatic analysis, *Methods of Enzymatic Analysis*, 1, 494-495.

BISHOP, G.J., KONCZ, C., 2002, Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, *The Plant Cell*, Supplement 2002, 97-110.

BISHOP, G.J., YOKOTA, T., 2001, Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response, *Plant Cell Physiology*, 42, 114-120.

BİLGE, E., ORALER, G., GÖZÜKIRMIZI, N., OLGUN, A., TOPAKTAŞ, M., 1981, Experimental mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.), *İstanbul Üniv. Fen Fak. Mecmuası*, Seri B 46, 29-35.

CAKMAK, 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, 127-132.

CANO-DELGADO, A., YIN, Y., YU, C., VEFAEDOS, D., MORA-GARCIA, S., CHEN, J.C., NAM, K.H., LI, J., CHORY, J., 2004, BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*, *Development*, 131 (21), 5341-5351.

CHEN, C.N., PAN, S.M., 1996, Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37, 107-111.

CHEN, J.G., PANDEY, S., HUANG, J., ALONSO, J.M., ECKER, J.R., ASSMANN, S.M., JONES, A.M., 2004, GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in arabidopsis seed germination, *Plant Physiology*, 135, 907-915.

CHO, Y.W., PARK, E.H., LIM, C.J., 2000, Catalase, Glutathione S-Transferase and Thioltransferase Respond Differently to Oxidative Stress in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (4), 344-348.

CHO, E.K., HONG, C.B., 2006, Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants, *Plant Cell Reports*, 25, 349-358.

CHOI, Y., FUJIOKA, S., HARADA, A., YOKOTA, T., TAKATSUTO, S., SAKURAI, A., 1996, A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone, *Phytochemistry*, 43, 593-596.

CHOI, Y., FUJIOKA, S., NOMURA, T., HARADA, A., YOKOTA, T., TAKATSUTO, S., SAKURAI, A., 1997, An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C6-oxidation, *Phytochemistry*, 44, 609-613.

CLOUSE, S., D., 2002, Brassinosteroid signal transduction: Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression, *Molecular Cell*, 10, 973-982.

ENDO, A., KURODA, M., TSUJITA, Y., 1976, ML-236A, ML-236B, and ML236-C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*, *Journal Antibiotique*, 29, 1346-1348.

- FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H.C., CHRIST, M., FEURING, M., WEHLING, M., 2000, Multiple actions of steroid hormones-A focus on rapid, nongenomic effects, *Pharmacol. Rev.*, 52, 513-555.
- FUJIOKA, S., LI, J., CHOI, Y.H., SETO, H., TAKATSUTO, S., NOGUCHI, T., WATANABE, T., KURIYAMA, H., YOKOTA, T., CHORY, J., SAKURAI, A., 1997, The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Cell*, 9, 1951-1962.
- FUJIOKA, S., SAKURAI, A., 1997a, Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids, *Physiologia Plantarum*, 100, 710-715.
- FUJIOKA, S., SAKURAI, A., 1997b, Brassinosteroids, *Natural Product Reports*, 14 (1), 1-10.
- GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., ORALER, G., OKATAN, Y., ÜNSAL, N., 1990, Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley, *Acta Bot Neerl*, 39, 379-387.
- GROVE, M.D., SPENCER, G.F., ROHWEDDER, W.K., MANDAVA, N.B., 1979, Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature*, 281, 216-217.
- GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 2000, Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation, *Plant Cell Reports*, 19, 787-791.
- GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 2003, Electroporation transformation of barley, *Modern Methods of Plant Analysis*, 23, 69-89.
- HAYAT, S., ALI, B., AIMAN HASAN, S., AHMAD, A., 2007, Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*, *Environmental and Experimental Botany*, 60, 33-41.
- HOWELL, W.M., KELLER III, G.E., KIRKPATRICK, J.D., JENKINS, R.L., HUNDINGER, R.N., MCLAUGHLIN, E.W., 2007, Effects of the plant steroidal hormone, 24-epibrassinolide, on the mitotic index and growth of onion (*Allium cepa*) root tips, *Genetics and Molecular Research*, 6 (1), 50-58.
- HU, B., BAO, F., LI, J., 2000, Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*, *Plant Journal*, 24, 693-701.
- KAGALE, S., DIVI, U.K., KROCHKO, J.E., KELLER, W.A., KRISHNA, P., 2007, Brassinosteroid confers tolerans in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range abiotic stresses, *Planta*, 225, 353-364.

KALEFETOĞLU, T., EKMEKÇİ, Y., 2005, The effects of drought on plants and tolerance mechanisms, *G. Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18 (4), 723-740.

KINOSHITA, T., CANO-DELGANO, A., SETO, H., HIRANUMA, S., FUJIOKA, S., YOSHIDA, S., CHORY, J., 2005, Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1, *Nature*, 433, 167-171.

KOCHBA, J., LAVÉE, S., ROY SPIEGEL, P., 1977, Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic ‘‘Shamouti’’ orange ovular callus lines, *Plant Cell Physiology*, 18, 463-467.

LI, J., CHORY, J., 1997, A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction, *Cell*, 90, 929-938.

LI, J., JIN, H., 2006, Regulation of brassinosteroid signaling, *Trends in Plant Science*, 12 (1), 37-41.

LI, J., LEASE, K.A., TAX, F.E., WALKER, J.C., 2001, BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 5916-5921.

LI, J., NAGPAL, P., VITART, V., MCMORRIS, T.C., CHORY, J., 1996, A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*, *Science*, 272, 398-401.

LI, J., WEN, J., LEASE, K.A., DOKE, J.T., TAX, F.E., WALKER, J.C., 2002, BAK1, an *Arabidopsis* LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling, *Cell*, 110, 213-222.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

MAZORRA, L.M., NUNEZ, M., HECHAVARRIA, M., COLL, F., SANCHEZ-BLANCO, M.J., 2002, Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperature, *Biologia Plantarum*, 45 (4), 593-596.

MITCHELL, J.W., MANDAVA, N., WORLEY, J.F., PLIMMER, J.R., 1970, Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen, *Nature*, 225, 1065-1066.

MIYAZAWA, Y., NAKAJIMA N., ABE, T., SAKAI, A., FUJIOKA, S., KAWANO, S., KUROIWA, T., YOSHIDA, S., 2003, Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents, *Journal of Experimental Botany*, 54 (393), 2669-2678.

MOAKE, W.S., 1997, Make Your Own Malt, *Brew Your Own*, August 1997, 32-36.

MONTOYA, T., NOMURA, T., YOKOTA, T., FARRAR, K., HARRISON, K., JONES, J.G.D., KANETA, T., KAMIYA, Y., SZEKERE, M., BISHOP, G.J., 2005,

Patterns of dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development, *The Plant Journal*, 42, 262-269.

MOORE, D.E., WANG, J., 2006, *Electron transfer mechanisms in photosensitization by the anti-inflammatory drug benzydamine* [online], The University of Sydney, Australia, <http://www.photobiology.com/v1/moore/index.htm> [Ziyaret Tarihi: 28 Nisan 2008].

MÜSSIG, C., SHIN, G., ALTMANN, T., 2003, Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 133, 1261-1271.

NAM, K.H., LI, J., 2002, BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling, *Cell*, 110, 203-212.

NOMURA, T., UENO, M., YAMADA, Y., TAKATSUTO, S., TAKEUCHI, Y., YOKOTA, T., 2007, Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination, *Plant Physiology*, 143, 1680-1688.

OLGUN, A., 1985, Effects of X and gamma rays on the mitotic cell division and protein content at the root tips of *Hordeum vulgare* L. *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası*, Seri B 50, 45-59.

OZDEMIR, F., BOR, M., DEMIRAL, T., TURKAN, I., 2004, Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress, *Plant Growth Regulation*, 42, 203-211.

ÖNDER, N., YENTÜR, S., 1999, *Bitkilerin Büyüme Gelişme Farklılaşma ve Hareket Fizyolojisi*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 975-404-516-x.

OZTURK, N.Z., TALAME, V., DEYHOLOS, M., MICHALOWSKI, C.B., GALBRAITH, D.W., GOZUKIRMIZI, N., TUBEROSA, H., BOHNERT, H., 2002, Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought and salt-stressed barley, *Plant Molecular Biology*, 48 (5-6), 551-573.

PAN, Y., WU, L.J., YU, Z.L., 2006, Effect of salt and drought on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch ), *Plant Growth Reg.*, 49, 157-165.

RAO, S.S.R., VARDHINI, B.V., SUJATHA, E., ANURADHA, S., 2002, Brassinosteroids – A new class of phytohormones, *Current Science*, 82 (10), 1239-1245.

ROMANUTTI, C., CASTILLA, V., COTO, C.E., WACHSMAN, M.B., 2007, Antiviral effect of a synthetic brassinosteroid on the replication of vesicular stomatitis virus in Vero cells, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 311-316.

SAĞLAM-ÇAĞ, S., 2007, The Effect of Epibrassinolide on Senescence in Wheat Leaves, *Biotechnol.&Biotechnol.Eq.*, 21 (1), 63-65.

SHIMADA, Y., GODA, H., NAKAMURA, A., TAKATSUTO, S., FUJIOKA, S., YOSHIDA, S., 2003, Organ-specific expression of brassinosteroid biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 131, 287-297.

STEBER, C.M., MCCOURT, P., 2001, A Role for Brassinosteroids in Germination in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 125, 763-769.

SUZUKI, H., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., YOKOTA, T., MUROFUSHI, N., SAKURAI, A., 1995a, Biosynthesis of brassinosteroids in the seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, and *Oryza sativa*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 168-172.

SUZUKI, H., INOUE, T., FUJIOKA, S., SAITO, T., TAKATSUTO, S., YOKOTA, T., MUROFUSHI, N., YANAGISAWA T., SAKURAI, A., 1995b, Conversion 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry*, 40, 1391-1397.

SUZUKI, H., INOUE, T., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, YANAGISAWA T., YOKOTA, T., MUROFUSHI, N., SAKURAI, A., 1994, Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1186-1188.

SYMONS, G.M., DAVIES, C., SHAVRUKOV, Y., DRY, I.B., REID, J.B., THOMAS, M.R., 2006, Grapes on steroids: brassinosteroids are involved in grape berry ripening, *Plant Physiology*, 140, 150-158.

SYMONS, G.M., REID, J.B., 2004, Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels, *Plant Physiology*, 135, 2196-2206.

SYMONS, G.M., ROSS, J.J., JAGER, C.E., REID, J.B., 2008, Brassinosteroid transport, *Journal of Experimental Botany*, 59 (1), 17-24.

TANAKA, K., ASAMI, T., YOSHIDA, S., NAKAMURA, Y., MATSUO, T., OKAMOTO, S., 2005, Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism, *Plant Physiol.*, 138, 1117-1125.

UYSAL, M.E., YILDIRIM, A.F., 2003, Konya İlinde Kışlık ve Yazlık Ekilen Arpa Çeşitlerinde Yaprakbiti (Homoptera:Aphidoidea) Populasyon Gelişimi, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (32), 1-5.

WACHSMAN, M.B., RAMIREZ, J.A., GALAGOVSKY, L.R., COTO, C.E., 2002, Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 13, 61–66.

WEHLING, M., 1997, Specific nongenomic actions of steroid hormones, *Annu. Rev. Physiol.*, 59, 365-393.

XU, W., CAMPBELL, P., VARGHEESE, A.K., BRAAM, J., 1996, The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression, *The Plant Journal*, 9 (6), 879-889.

YOKOTA, T., OGINO, Y., TAKAHASHI, N., SAIMOTO, H., FUJIOKA, S., SAKURAI, A., 1990, Brassinolide is biosynthesized from castasterone in *Catharanthus roseus* crown gall cells, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1107-1108.

YOSHIKUNI, T., NAGATA, N., SHIMADA, H., MATSUI, M., 1999, An Arabidopsis Cell Cycle-Dependent Kinase-Related Gene, *CDC2b*, Plays a Role in Regulating Seedling Growth in Darkness, *The Plant Cell*, 11, 1883-1895.

ZUREK, D.M., CLOUSE, S.D., 1994, Molecular Cloning and Characterization of a Brassinosteroid-Regulated Gene from Elongating Soybean (*Glycine max* L.) Epicotyls, *Plant Physiol.*, 104, 161-170.

## **EKLER**

### **YAYINLAR**

KARTAL, G., TEMEL, A., ARICAN, E., GOZUKIRMIZI, N., 2008, Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division, *Plant Growth Regulation*'a sunuldu.

### **KONGRE BİLDİRİLERİ**

KARTAL G, TEMEL A, GÖZÜKIRMIZI N. (2008) Effects of Brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. XVI: FESPB Congress, Tampere-Finland, 17-22 August, 2008.

KARTAL G, TEMEL A, GÖZÜKIRMIZI N. (2008) Brassinosteroidlerin arpa kök büyümesi ve hücre bölünmesi üzerine etkileri. Biyoloji Kongresi, Trabzon.

TEMEL A, KARTAL G, GÖZÜKIRMIZI N. (2008) Arpa kallus kültürlerinde genetik ve epigenetik varyasyonlar. Biyoloji Kongresi, Trabzon.

## **ÖZGEÇMİŞ**

31.08.1984 tarihinde Bulgaristan'ın Ardino kasabasında doğdum. 2002'de İstanbul Plevne Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldum. 2006 yılı güz döneminde Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.