

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI BOR KONSANTRASYONLARINDA
YETİŞTİRİLEN *Arabidopsis thaliana* L.
BİTKİLERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

YONCA SURGUN

MART 2015

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI BOR KONSANTRASYONLARINDA
YETİŞTİRİLEN *Arabidopsis thaliana* L.
BİTKİLERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

YONCA SURGUN

MART 2015

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

YONCA SURGUN tarafından hazırlanan **FARKLI BOR KONSANTRASYONLARINDA YETİŞTİRİLEN *Arabidopsis thaliana* L. BİTKİLERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 09/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Betül BÜRÜN (Jüri Başkanı ve Danışman)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Aynur Gürel (Üye)

İmza:

Biyomühendislik Bölümü,
Ege Üniversitesi, İzmir

Prof. Dr. A. Levent Tuna (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Hatice Güneş (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Bekir Çöl (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Betül BÜRÜN (Danışman)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 09.03.2015

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Yonca Surgun

09/03/2015

ÖZET

FARKLI BOR KONSANTRASYONLARINDA YETİŞTİRİLEN *Arabidopsis thaliana* L. BİTKİLERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yonca SURGUN

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Mart 2015, 180 sayfa

Brassinosteroidler (BR'ler) bitki büyüme ve gelişimindeki önemli rollerinin yanı sıra, çevresel streslere karşı toleransı da arttırmaktadır. Bu çalışmada, moleküler ve fizyolojik çalışmaların öncü ve tercih edilen bitkisi olan *Arabidopsis thaliana* L.'da borun yaratacağı stres ve buna karşı brassinosteroidlerin anti-stres etkileri biyokimyasal ve moleküler düzeyde araştırılmıştır. Biyokimyasal deneyler kapsamında *A. thaliana* bitkileri hidroponik olarak yetiştirilmiş ve dört haftalık bitkiler 50 veya 100 ppm borik asit içeren ortamlara aktarılmıştır. Borik asit uygulamalarını takiben bitkilerin yapraklarına spreyleme yöntemi ile 0.01 veya 1 μ M 24-Epibrassinolid (EBL) uygulamaları yapılmıştır. Borik asit konsantrasyonundaki artış ile bitkilerde büyüme inhibe olmuş ve toksik semptomlar ortaya çıkmıştır. EBL uygulamaları yüksek bor konsantrasyonu altında büyüme (gövde yaş ve kuru ağırlığı, yaprak alanı, meyve boyu ve ağırlığı), pigment içeriği (total klorofil ve karotenoid) ve antioksidan sistem üzerinde artışlar sağlamıştır. Katalaz (E.C. 1.11.1.6), askorbat peroksidaz (E.C. 1.11.1.11) ve guaiakol peroksidaz (E.C. 1.11.1.7) enzim aktivitelerinin artışında genel olarak düşük konsantrasyonda EBL uygulaması daha etkili iken süperoksit dismutaz (E.C. 1.15.1.1) enzim aktivitesi ve prolin miktarındaki artışlar EBL konsantrasyonundaki artışla paralel olmuştur. Borik asit uygulamalarıyla artış gösteren lipid peroksidasyon miktarı EBL uygulamaları sonucu istatistiksel olarak önemli olacak şekilde azalmıştır. Bununla birlikte, 1 μ MEBL uygulaması yaprak, kök ve çiçek salkımı kısımlarında bor birikimini azaltmıştır. Sonuç olarak, EBL uygulamaları ile düşük konsantrasyonda borun yarattığı stresin etkileri nötralize edilirken, yüksek konsantrasyonda borun yarattığı inhibisyonun kısmen üstesinden gelinmesi sağlanmıştır.

Moleküler deneyler kapsamında dört haftalık *A. thaliana* bitkileri borik asit (50 ve 100 ppm) ve/veya EBL (0.01 ve 1 µM) ilaveli besin ortamında 60 saat boyunca inkübe edilmiştir. EBL uygulamalarının bor taşıyıcı genlerin (*BOR1*, *BOR2*, *BOR3*, *BOR4* ve *BOR5*), yüksek bor konsantrasyonu altında ekspresyonu teşvik olan genlerin (MATE taşıyıcı ve *Hsp-like*), hücre döngüsü (*CycD3;1*) ve hücre duvarı ile ilgili genlerin (*TCH4* ve *KOR*), BR'ler tarafından ekspresyonları teşvik edilen genlerin (*Hsp 70-4* ve *Hsp 90-1*) ve diğer streslerle ilgili genlerin (*LTI/COR78* ve *LEA4-5*) ekspresyonları üzerine etkileri borik asit uygulamalarına maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin yaprak ve kök dokularında semi-quantitative RT-PCR tekniği ile araştırılmıştır. Borik asit uygulamaları *BOR1* ve *BOR3* genlerinin ekspresyonları hem yaprak hem kök dokusunda azaltırken, EBL uygulaması (1 µM) kök dokusunda bu genlerin ekspresyonlarını daha da azaltmıştır. *BOR2* ve *BOR4* genlerinin mRNA seviyesi hem yaprak hem kök dokusunda artan borik asit konsantrasyonlarına paralel olarak artmıştır. 1 µM EBL tek başına ya da borik asit uygulamaları ile birlikte kökte *BOR4* geninin ekspresyonunda önemli azalmalara neden olmuştur. Borik asit uygulamaları sonucu MATE taşıyıcı geninin ekspresyon profili yaprak ve kökte farklılık göstermiş bununla birlikte tek başına ya da borik asit uygulamaları ile birlikte yapılan EBL uygulamaları sonucu her iki dokuda da ekspresyon artmıştır. *Hsp-like* geninin mRNA seviyesi araştırılan her iki dokuda da borik asit ve EBL uygulamaları sonucu artmıştır. Borik asit ve EBL uygulamaları *CycD3;1*, *TCH4*, *KOR*, *Hsp 70-4* ve *Hsp 90-1* genlerinin mRNA seviyelerini yaprak dokusunda çok fazla değiştirmez iken, kök dokusunda yapılan uygulamalar sonucu farklı sonuçlar gözlenmiştir. Borik asit uygulamaları *LTI/COR78* ve *LEA4-5* genlerinin ekspresyonlarını arttırmış ve yüksek konsantrasyonda EBL uygulaması bu genlerin ekspresyonlarını arttırmada daha etkili olmuştur. Sonuç olarak elde edilen bulgular brassinosteroidlerin strese yanıtta koruyucu özelliklerini anlamaya yönelik önemli veriler sağlamıştır.

Bu spesifik konuya ilk biyokimyasal ve moleküler yaklaşım olma özelliğine sahip olan tez çalışması, bor-brassinosteroid ilişkisinin göreceli olarak detaylı araştırılmasının yanında, tarımda pratik uygulamalar için bilgi sağlayacak temel bir araştırma niteliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana* L., 24-Epibrassinolid, bor, stres, büyüme, antioksidan sistem, gen ekspresyonu, semi-quantitative RT-PCR.

ABSTRACT

INVESTIGATION of 24-EPIBRASSINOLIDE EFFECTS on *Arabidopsis thaliana* L. PLANTS GROWN UNDER DIFFERENT BORON CONCENTRATIONS

Yonca SURGUN

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

March 2015, 180 pages

Brassinosteroids (BRs) improve the tolerance of plants for various environmental stresses and its pivotal role in plant growth and development. In this study, the stress induced by boron and the anti-stress responses generated by BRs were investigated at the biochemical and molecular level in *Arabidopsis thaliana* (L.) as a model plant for molecular and physiological studies. In biochemical studies, *A. thaliana* plants were grown in hydroponic culture and four-week-old plants were transferred to the media containing 50 or 100 ppm boric acid. Following boric acid treatment, 0.01 or 1 μ M 24-Epibrassinolide (EBL) was sprayed on the whole foliar region of the seedlings. As the boron concentrations increased, the growth of the plants was comparatively inhibited and the toxic symptoms were observed. EBL treatments increased growth (shoot fresh and dry mass, leaf area, silique number, length and weight), pigment content (total chlorophyll and caroteneoid) and antioxidant system in the plants under high boron conditions. While the activities of catalase (E.C. 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (E.C. 1.11.1.11) and guaiacol peroxidase (E.C. 1.11.1.7) were found higher especially when the lower concentrations of EBL (0.01 μ M) used, the increase in the activity of superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1) and proline content were proportional to the concentration of EBL. Enhanced level of lipid peroxidation observed during high B stress in the plants and then decreased following EBL treatment. Also, 1 μ M EBL treatment considerably decreased boron accumulation in the leaves, roots and inflorescences. In conclusion, while the effects of the stress caused by the low boron concentration were overcome by means of follow up EBL treatments, the detrimental effects of toxicity were only partially overcome under higher boron concentration.

In molecular studies, four-week-old *A. thaliana* plants were transferred to media containing boric acid (50 and 100 ppm) and/or EBL (0.01 and 1.0 μ M) and incubated for 60 hours. The effects of EBL treatments on expression patterns of boron transporter genes (*BOR1*, *BOR2*, *BOR3*, *BOR4* and *BOR5*), high boron-induced genes (MATE transporter and *Hsp-like*), cell cycle (*CycD3;1*) and cell wall-related genes (*TCH4* and *KOR*), BR-induced genes (*Hsp70-4* and *Hsp90-1*) and other stress-related genes (*LTI/COR78* and *LEA4-5*) were examined in response to boric acid, using semi-quantitative RT-PCR in leaf and root tissues of *A. thaliana*. Boric acid treatments led to down regulation of *BOR1* and *BOR3* genes in leaf and root tissues and addition of EBL (1 μ M) decreased expression of these genes in roots. The transcript levels of *BOR2* and *BOR4* increased in leaf and root tissues in response to boric acid. A significant down regulation of *BOR4* gene expression was observed in roots by EBL (1 μ M) alone or with boric acid treatments. MATE transporter showed different expression patterns in leaf and root tissues after boric acid treatments, whereas treatment with EBL alone or together with boric acid caused up regulation of this gene in both tissues. mRNA levels of *Hsp-like* gene were higher in both tissues of the seedlings treated with boric acid and EBL. While transcript levels of *CycD3;1*, *TCH4*, *KOR*, *Hsp70-4* and *Hsp90-1* genes were slightly changed in leaf under all treatments, expression patterns of these genes showed differences in root tissues. Expression of *LTI/COR78* and *LEA4-5* genes was induced by boric acid and higher concentration of EBL was found to be more effective in increasing expression of these genes. To conclude, the results provide inputs towards understanding protective properties of BRs in stress response.

Focusing the value of presenting a biochemical and molecular approaches, this thesis is the first study in the specific field, and carries the potential quality of the basic research that would provide the knowledge for practical agricultural applications, and also presents the detailed understanding for the relationships between boron and brassinosteroids.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* L., 24-Epibrassinolide, boron, stress, growth, antioxidant system, gene expression, semi-quantitative RT-PCR.

Sevgili Anne ve Babama

ÖNSÖZ

Tez danışmanım Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e bilimsel çalışmanın, düşünmenin ve etik olmanın temellerini öğrettiği için yürekten teşekkür ederim.

Tez sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen tez izleme komitesi değerli üyeleri Prof. Dr. Ayur GÜREL'e ve Prof. Dr. A. Levent TUNA'ya ve ayrıca Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e şükranlarımı sunarım.

Desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Filiz DAŞKIRAN, Burak Evren İNANAN ve Şükrü Serter ÇATAV'a gönülden teşekkür ederim.

Hayatımın tüm aşamalarında sabırla beni destekleyen sevgili annem Müşerref SURGUN, babam Levent SURGUN ve kardeşim Yiğit SURGUN'a minnettar olduğumu belirtmek isterim. Zorluklarla dolu hiçbir yol onlarsız aşılamazdı.

Bu tez çalışması, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi 2011-36 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	3
1.2. Kaynak Özetleri	5
1.2.1. Bor ile ilgili yapılan çalışmalar	5
1.2.2. Brassinosteroidler ile ilgili yapılan çalışmalar	10
1.3. Borun Doğada Yaygın Bulunan Formları ve Topraktaki Bor	16
1.4. Bitkilerde Borun Taşınımı ve Paylaşımı.....	16
1.5. Borun Bitkideki Görevleri	17
1.6. Bitkilerde Bor Eksikliği	18
1.7. Bitkilerde Bor Toksisitesi ve Toleransı	19
1.8. Bor Toksisitesi ile İlgili Transgenik Yaklaşımlar	21
1.9. Brassinosteroid Çeşitleri ve Biyosentezi	22
1.9.1. Brassinosteroid çeşitleri.....	22
1.9.2. Brassinosteroidlerin biyosentezi.....	23
1.10. Brassinosteroidlerin Taşınımı ve Lokalizasyonu.....	25
1.11. Brassinosteroidlerin Sinyal İletim Modeli	26
1.12. Brassinosteroidlerin Fizyolojik Etkileri	28
1.13. Brassinosteroidlerin Diğer Bitki Hormonları ile Olası Etkileşimleri	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
2.1. Materyal	33
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1. Hidroponik ortamda bitkilerin yetiştirilmesi	34
2.2.2. Borik asit konsantrasyonlarının belirlenmesine ilişkin yapılan ön çalışmalar	36
2.2.3. Biyokimyasal analizler için kullanılan yöntemler	36

2.2.3.1. <i>Biyokimyasal analizler için bitkilerin yetiştirilmesi ve uygulamaların yapılması</i>	36
2.2.3.2. <i>Ortalama yaş ve kuru ağırlık</i>	38
2.2.3.3. <i>Ortalama yaprak sayısı ve kök uzunluğu</i>	38
2.2.3.4. <i>Ortalama meyve sayısı, uzunluğu ve ağırlığı</i>	38
2.2.3.5. <i>Yaprak alanı ölçümü</i>	38
2.2.3.6. <i>Total klorofil ve karotenoid içeriğinin belirlenmesi</i>	39
2.2.3.7. <i>Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi</i>	39
2.2.3.8. <i>Total çözülebilir protein miktarının tespiti</i>	40
2.2.3.9. <i>Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesinin belirlenmesi</i>	41
2.2.3.10. <i>Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi</i>	43
2.2.3.11. <i>Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinin belirlenmesi</i>	44
2.2.3.12. <i>Guaiacol peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.7) enzim aktivitesinin belirlenmesi</i>	45
2.2.3.13. <i>Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi</i>	46
2.2.3.14. <i>Prolin miktarının belirlenmesi</i>	46
2.2.3.15. <i>Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)</i>	47
2.2.3.16. <i>Yaprak, kök ve çiçek salkımında ICP-OES ile bor miktarı tayini</i> ..	49
2.2.3.17. <i>Biyokimyasal verilerin istatistiksel değerlendirilmesi</i>	50
2.2.4. <i>Moleküler analizler için kullanılan yöntemler</i>	50
2.2.4.1. <i>Moleküler analizler için bitkilerin yetiştirilmesi ve uygulamaların yapılması</i>	50
2.2.4.2. <i>Yaprak ve kök örneklerinden RNA izolasyonu</i>	51
2.2.4.3. <i>DNaz I uygulaması</i>	54
2.2.4.4. <i>Komplementer DNA (cDNA) sentezi</i>	54
2.2.4.5. <i>Genler ve primer dizaynı</i>	56
2.2.4.6. <i>Semi-quantitative-reverse transcriptase polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi</i>	60
2.2.4.7. <i>Moleküler verilerin analizi</i>	62
2.2.4.8. <i>Moleküler verilerin istatistiksel değerlendirmesi</i>	65
3. BULGULAR	66
3.1. <i>Borik Asit Konsantrasyonlarının Belirlenmesine İlişkin Yapılan Ön Çalışma Bulguları</i>	66
3.2. <i>Biyokimyasal Araştırmaların Bulguları</i>	74

3.2.1. Büyüme parametreleri	74
3.2.2. Pigment içeriği.....	85
3.3.3. Antioksidatif sistem.....	87
3.2.4. SDS-PAGE analizi	92
3.2.5. Yaprak, kök ve çiçek salkımında bor miktarı.....	92
3.3. Moleküler Araştırmaların Bulguları	94
3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	94
3.3.2. Semi-quantitative RT-PCR.....	95
3.3.1.1. Yaprak örneklerinde RT-PCR.....	95
3.3.1.2. Kök örneklerinde RT-PCR.....	115
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	135
KAYNAKLAR.....	159
ÖZGEÇMİŞ	175

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Dört haftalık Arabidopsis bitkilerine biyokimyasal analizler için yapılan uygulamalar ve uygulama süreleri	37
Çizelge 2.2. Ekstraksiyon tampon içeriği	40
Çizelge 2.3. BSA standart hazırlanışı	41
Çizelge 2.4. SOD reaksiyon karışımı	42
Çizelge 2.5. SOD enzim aktivite deneyinin yapılışı	43
Çizelge 2.6. CAT enzim aktivite deneyinin yapılışı	43
Çizelge 2.7. APX enzim aktivitesi deneyinin yapılışı.....	44
Çizelge 2.8. GPX enzim aktivite deneyinin yapılışı	45
Çizelge 2.9. Dört haftalık Arabidopsis bitkilerine moleküler analizler için 60 saat süreyle yapılan uygulamalar.....	51
Çizelge 2.10. Yaprak ve kök örneklerden izole edilen RNA'ların miktarları ve saflık oranları	53
Çizelge 3.1. Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve kuru madde miktarları (%).....	67
Çizelge 3.2. Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g ⁻¹ yaş ağırlık).....	69
Çizelge 3.3. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve kuru madde miktarları (%).....	71
Çizelge 3.4. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g ⁻¹ yaş ağırlık).....	73
Çizelge 3.5. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlıkları (mg) ve kuru ağırlıkları (mg)	75
Çizelge 3.6. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama kök yaş ağırlıkları (mg) ve kuru ağırlıkları (mg)...	77
Çizelge 3.7. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde kuru madde miktarları (%).....	79
Çizelge 3.8. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama yaprak sayıları (adet) ve kök uzunlukları (cm).....	80

Çizelge 3.9. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin bitki başına ortalama meyve sayısı (adet), meyve boyu (mm) ve meyve ağırlığı (mg).....	82
Çizelge 3.10. Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinde yaprak alanı (mm ²) üzerine etkileri.....	84
Çizelge 3.11. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g ⁻¹ yaş ağırlık).....	86
Çizelge 3.12. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin SOD (unit mg ⁻¹ protein) ve CAT enzim aktiviteleri (nmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹).....	88
Çizelge 3.13. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin APX (nmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹) ve GPX enzim aktiviteleri (nmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹).....	89
Çizelge 3.14. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin MDA (µmol g ⁻¹ yaş ağırlık) ve prolin miktarları (µmol g ⁻¹ yaş ağırlık)	91
Çizelge 3.15. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin yaprak, çiçek salkımı ve kök dokularındaki bor miktarları (mg kg ⁻¹ kuru ağırlık)	93
Çizelge 3.16. Dokuz farklı uygulamaya maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin yaprak örneklerinde belirlenen 14 adet genin mRNA seviyelerinin kontrole göre oransal değişimleri.....	113
Çizelge 3.17. Dokuz farklı uygulamaya maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin kök örneklerinde belirlenen 14 adet genin mRNA seviyelerinin kontrole göre oransal değişimleri	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye toprakları bor haritası	21
Şekil 1.2. Brassinolid (BL), 28-Homobrassinolid (HBL) ve 24-Epibrassinolid (EBL)'in kimyasal yapıları.....	23
Şekil 1.3. BR biyosentez yolunun basitleştirilmiş modeli	24
Şekil 1.4. BR sinyal yolu. BR yokluğunda (A) ve BR varlığında (B) sinyal iletim modeli.....	28
Şekil 2.1. Torf içeren viyollerde yetiştirilen dört haftalık <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotip Columbia bitkileri.....	33
Şekil 2.2. Laboratuvarında modifiye edilen hidroponik kültür sistemi.....	35
Şekil 2.3. BSA standart grafiği	41
Şekil 2.4. mRNA'nın işlenmesi ve cDNA sentezi.....	55
Şekil 2.5. Jel fotoğrafının negatifi üzerinden optik yoğunlukları tespit edilecek bantların seçimi.....	62
Şekil 2.6. Bantlara ait optik yoğunluk diyagramı.....	63
Şekil 2.7. Diyagramdaki bantların optik yoğunluk sonuçları	63
Şekil 2.8. <i>BOR1</i> genine ait farklı uygulamaların gen ekspresyon ölçümleri.....	64
Şekil 3.1. Tohum ekiminden 28 gün sonra dört gün süreyle farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkileri (Bar=1 cm).....	66
Şekil 3.2. Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (a), kuru ağırlık (b) ve % kuru madde miktarları (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	68
Şekil 3.3. Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid miktarları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	69
Şekil 3.4. Tohum ekiminden 28 gün sonra sekiz gün süreyle farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkileri (Bar=1cm)	70
Şekil 3.5. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (a), kuru ağırlık (b) ve % kuru madde miktarları (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	72
Şekil 3.6. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid (b)	

miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$), $\pm$ standart hata değerleridir.	73
Şekil 3.7. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan 38 günlük <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin gelişim durumları (Bar = 1cm)	74
Şekil 3.8. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde yaş (a) ve kuru ağırlıkları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	76
Şekil 3.9. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama kök yaş (a) ve kuru ağırlıkları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	77
Şekil 3.10. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama gövde % kuru madde miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	79
Şekil 3.11. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin ortalama yaprak sayıları (a) ve kök uzunlukları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	81
Şekil 3.12. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin bitki başına ortalama meyve sayısı (a), ortalama meyve boyu (b) ve ortalama meyve ağırlığı (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	83
Şekil 3.13. Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinde 5. ve 6. yaprak alanı üzerine etkileri (Bar = 1mm)	84
Şekil 3.14. Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinde 5. ve 6. yaprak alanı üzerine etkileri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	85
Şekil 3.15. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid (b) miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	86
Şekil 3.16. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin SOD (a) ve CAT (b) enzim aktiviteleri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	88
Şekil 3.17. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin APX (a) ve GPX (b) enzim aktiviteleri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	90
Şekil 3.18. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin MDA (a) ve prolin miktarları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	91
Şekil 3.19. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin yaprak dokularına ait SDS-PAGE görüntüsü.....	92
Şekil 3.20. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin yaprak (a), çiçek salkımı (b) ve kök (c) dokularındaki bor miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	94

Şekil 3.21. Borik asit ve /veya EBL ilaveli besin ortamlarına 60 saat süreyle maruz bırakılan bitkilerin yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları.....	95
Şekil 3.22. Yaprakta At2g47160 (<i>BOR1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	97
Şekil 3.23. Yaprakta At3g62270 (<i>BOR2</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	98
Şekil 3.24. Yaprakta At3g06450 (<i>BOR3</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	99
Şekil 3.25. Yaprakta At1g15460 (<i>BOR4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	100
Şekil 3.26. Yaprakta At1g74810 (<i>BOR5</i>) genine ait jel resmi.....	101
Şekil 3.27. Yaprakta At2g04050 (<i>MATE</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	102
Şekil 3.28. Yaprakta At5g51440 (<i>Hsp-like</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	103
Şekil 3.29. Yaprakta At4g34160 (<i>CycD3;1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	105
Şekil 3.30. Yaprakta At5g57560 (<i>TCH4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	106
Şekil 3.31. Yaprakta At5g49720 (<i>KOR</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	107
Şekil 3.32. Yaprakta At3g13580 (<i>Hsp70-4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	108
Şekil 3.33. Yaprakta At5g52640 (<i>Hsp90-1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	110
Şekil 3.34. Yaprakta At5g52310 (<i>LTI/COR78</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	111
Şekil 3.35. Yaprakta At5g06760 (<i>LEA4-5</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	112

Şekil 3.36.Kökte At2g47160 (<i>BOR1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	116
Şekil 3.37.Kökte At3g62270 (<i>BOR2</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	117
Şekil 3.38.Kökte At3g06450 (<i>BOR3</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	118
Şekil 3.39.Kökte At1g15460 (<i>BOR4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	119
Şekil 3.40.Kökte At1g74810 (<i>BOR5</i>) genine ait jel resmi	120
Şekil 3.41.Kökte At2g04050 (<i>MATE</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	121
Şekil 3.42.Kökte At5g51440 (<i>Hsp-like</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	122
Şekil 3.43.Kökte At4g34160 (<i>CycD3;1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	124
Şekil 3.44.Kökte At5g57560 (<i>TCH4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	125
Şekil 3.45.Kökte At5g49720 (<i>KOR</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	126
Şekil 3.46.Kökte At3g12580 (<i>Hsp70-4</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	128
Şekil 3.47. Kökte At5g52640 (<i>Hsp90-1</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).....	129
Şekil 3.48.Kökte At5g52310 (<i>LT1/COR78</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	131
Şekil 3.49.Kökte At5g06760 (<i>LEA4-5</i>) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).	132

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
APS	Amonyum Per Sülfat
APX	Askorbat Peroksidaz
Bç	Baz Çifti
BA	Borik Asit
BR	Brassinosteroid
BL	Brassinolid
BSA	Sığır Serum Albümini
°C	Santigrad Derece
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
dak.	Dakika
ddH ₂ O	Ultra Saf Su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribionükleotit tri Fosfat
EBL	24-Epibrassinolid
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
g	Gram
GA	Gibberellik Asit
GPX	Guaiacol Peroksidaz
HBL	28-Homobrassinolid
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KCl	Potasyum Klorür
l	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MAS	Markör Yardımıyla Seleksiyon
mA	Miliamper

MDA	Malondialdehit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
NaCl	Sodyum Klorür
NADP	Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyon Konsantrasyonu
ppm	Milyonda Bir Parça
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Reverse Transkriptaz
san.	Saniye
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobar-bütirik Asit
TBE	Tris-borik asit-EDTA
TCA	Trikloroasetik Asit
TEMED	n, n, n', n'- tetramethylethylenediamine
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofezi
U	Ünite
UV	Ultraviyole
QTL	Kantitatif Karakter Lokusu
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. GİRİŞ

Brassinosteroidler (BR'ler), bitkilerde sıklıkla rastlanan bitki steroidlerinin spesifik bir sınıfını oluşturmaktadır ve brassinolid (BL) büyümeyi düzenleyen en biyoaktif formudur. 1990'lı yılların ortalarından sonra yapılan genetik çalışmalar brassinosteroidlerin yeni bir bitki hormon sınıfı olarak diğer hormonlarla birlikte hücre bölünmesi ve genişlemesi, ksilem farklılaşması, tohum çimlenmesi, vejetatif büyüme ve apikal dominansi üzerine etkili olduğunu ortaya koymuştur. BR-sentezlemeyen ya da BR-duyarsız mutantlar ile yapılan çalışmalar sonucu BR'lerin birçok farklı süreçte rol alarak geniş spektrumda fenotipik değişikliklere yol açtığı ortaya koyulmuştur (Altmann, 1999; Mussig ve Altmann, 2003; Sasse, 2003; Kagale vd., 2007). Son yıllarda ise, tarımda yaygın uygulamalarının yanı sıra BR'lerin sinyal iletim modeli, BR'ler tarafından regüle edilen genler, anti-stres etkileri ve diğer fitohormonlarla olası ilişkileri üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Geçmişte ve günümüzde yapılan çalışmalar ile BR'lerin abiyotik ve biyotik streslere karşı bitkilerin toleransını artırma yetenekleri belirlenmiştir. BR'lerin ısı, don, kuraklık ve tuzluluk gibi bir çok stres ortamında bitkide toleransı artırması ve bu artışın stres markör genlerinin ekspresyonu ile korelasyonu BR uygulamalı bitkilerde toleransı artırma yeteneğini kısmen açıklamaktadır. Bununla birlikte, BR uygulamaları sonucu protein sentezinin sürdürüldüğü, antioksidan enzim aktivitelerin ve osmotik koruyucuların birikiminin arttığı ayrıca fotosentez oranının da olumlu etkilendiği tespit edilmiştir. Fakat BR'lerin bitkinin stres yanıtlarına etki mekanizması ve stres cevap genlerinin ekspresyonunu nasıl regüle ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir. BR'lerin streslere yanıtı ya direk ya da diğer hormonların yolları ile sinyal alış-verişi yoluyla hücresel olayları etkiledikleri tahmin edilmektedir (Divi ve Krishna, 2009; Divi vd., 2010).

Dünyada bilinen bor yataklarının %72'si Türkiye'de bulunmaktadır (Anonim, 2011). Yüksek oranda bor içeren topraklarda yetişen bitkilerin gelişimi sınırlanmakta ve bu durum dünya genelinde kurak ve yarı kurak alanlarda ürün kalitesi ve verimini azaltmaktadır.

Borlu toprakların en önemli sebebi sulama suları olup, açık işletmekalıntıları, uçucu küller ve endüstriyel kimyasallar diğer kaynakları oluşturmaktadır. Bu etmenlerden biri veya kombinasyonları bulundukları yöreye özgü olarak bor kirliliğine neden olmaktadır (Nable vd., 1997). Toprak fazla miktarda bor içerdiğinde, borun pasif olarak geçişindeki kontrol eksikliği nedeniyle bitkilerde problemler oluşmaktadır. Bor toksisite semptomları kendisini kök ve gövde büyümesinde, kök hücrelerinin bölünmesinde ve RNA miktarlarında azalma, düşük klorofil miktarı ve fotosentez hızı, düşük stoma iletimi, azalmış lignin ve suberin miktarları, klorozis ve devamında yaşlı yapraklarda yaprak uç ve kenarlarında nekrozis oluşumu gibi geniş bir fizyolojik etki aralığında göstermektedir (Kastori vd., 2008; Camacho-Cristobal vd., 2008; Herrera-Rodriguez vd., 2010). Borun toksisitesinin önemli anahtar metabolitlere affinite göstermesinden kaynaklanıyor olabileceği tahmin edilmektedir. Genel olarak bor, nispeten tepkisizdir ancak, *cis* konfigürasyonunda hidroksil grubu bulunan bazı metabolitler ile güçlü kompleks oluşturabilir. Bu durumda hücre duvarının yapısını değiştirmesi, enerji taşıyan ATP, NADP ve NADPH gibi moleküllerin yapısında bulunan ribozdaki *cis* diol gruplarına etki etmesi ve serbest şeker olarak yada RNA'nın içindeki riboza bağlanarak hücre bölünmesi ve genişlemesini inhibe etmesi üç olası mekanizma olarak düşünülmektedir (Dembitsky vd., 2002; Bolanos vd., 2004; Camacho-Cristobal vd., 2008; Kocabek vd., 2009; Reid, 2010). Bununla birlikte, *in vitro* yapılan çalışmalar sonucu, borun m-RNA splaycing reaksiyonlarında bozulmalara yol açması bor toksitesinin en büyük nedenlerinden biri olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, *Arabidopsis thaliana*'nın kök ve rozet yapraklarında yüksek borun teşvik ettiği birçok gen tanımlanmış ve bunların bir kısmının transkripsiyon faktör olması, borun varsayılan rollerini transkripsiyon faktörler ile interaksyonu sonucu gerçekleştirdiği fikrine götürmüştür (Camacho-Cristobal vd., 2008).

Ülkemizin bazı bölgeleri dahil dünyanın birçok bölgesinde, bor ile kirlenmiş topraklar mevcuttur. Her ne kadar yıkama, toprak iyileştirme ve vejetasyon yönetimi gibi uygulamalar bor toksisitesinin sorun olduğu tarımsal alanlar için önerilse de, pratik yöntemler değildir. Bu tür toprakların tarımsal olarak kazanılabilmesi için, yeni mücadele stratejileri ve açılımlar gerekmektedir. Bu bağlamda yüksek konsatrasyonda bor içeren topraklarda bitkisel hormonların kullanımı bor stresine tolerans sağlamada alternatif yöntemler olarak kullanılabilir.

1.1.Amaç ve Kapsam

Bitki mikro besin elementleri içinde Fe, Zn, Cu, Mn vb. gibi metallerin dışında metal olmayan tek element olan bor, oksijene eğilimi fazla olduğundan yapısına sodyum ve kalsiyumu da alarak, doğada boratlar halinde bulunur. Bunlardan doğada en bol bulunanı $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ formülüne sahip olan “boraks”tır (Camacho-Cristobal vd., 2008). Bitki gelişiminde borun ağırlıklı olarak esas önemi hücre duvarında bulunan Rhamnogalacturon II (RG II) kompleksinde yapısal bileşen olmasından kaynaklanmaktadır vebitkideki borun %90’ından fazlası hücre duvarında yer almaktadır. Borun, hücre duvarı yapısına katılmasının yanı sıra, çiçeklenme, polen çimlenmesi, meyve olgunlaşması, hücre bölünmesi, dormansinin ve bitki-su ilişkilerinin düzenlenmesi, oksin, azot ve karbonhidrat metabolizmalarına katılması, nükleik asit, pektin ve ATP sentezlerinde rol alması ve bunların yanında diğer elementler üzerinde düzenleyici etkilerinin olması yönünde bildiriler mevcuttur. Ancak, büyüme ve gelişmedeki gerçek rolü halen tartışma konusu olmakla birlikte bitkideki ayrı ayrı görevlerinin cis diol OH^- grubuna sahip moleküllerle kompleks yaparak onları stabilize etmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tarımsal üretimin arttırılması için, borun taşınım ve dağılımını anlamının kritik derecede önemli olduğu belirtilmektedir. Bu kapsamda optimum miktarlardaki bor bitkiler için vazgeçilmez iken, yüksek miktarlardaki bor bitkilerde toksisiteye neden olan abiyotik bir stres faktörüdür (Bolanos vd., 2004; Camacho-Cristobal vd., 2008; Herrera-Rodriguez vd., 2010).

Bitkilerde çevresel streslere adaptasyon hücrenin biyokimyasında birçok değişikliği kapsamaktadır. Bu değişiklikler yeni metabolik yolların oluşumu, düşük moleküler ağırlıktaki metabolitlerin akümüasyonu, özel proteinlerin sentezi, detoksifikasyon mekanizmaları ve fitohormon seviyelerinde değişiklikleri kapsamaktadır (Bajguz ve Hayat, 2009). Fitohormonlardan brassinosteroidler, diğer bitki büyüme regülatörlerine göre ekstrem düşük konsantrasyonlarda aktif olması, uygun konsantrasyonlarda kök gelişimini teşvik etmesi, bitkilerde deformasyona sebep olmaması ve özellikle stres koşulları altında bitki büyümesi üzerine olumlu etkiler göstermelerinden dolayı “stres hormonu” olarak da isimlendirilmektedirler (Ikekawa ve Zhao, 1991). Farklı çevresel koşullarda ekzogen BR uygulaması yapılan bitkilerin genom ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında sonuçlar iki grup genlerin ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Bunlardan ilki farklı stres koşulları altında ekspresyonları artan ortak genler, diğeri ise uygulanan strese spesifik olarak ekspresyonu artan genler olarak gruplandırılmıştır (Krishna, 2003).

Brassinosteroidlerin *Arabidopsis thaliana* üzerindeki fizyolojik ve moleküler etkileri bitkilerde steroid hormonların çalışılması için kullanışlı bir model sistemin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Clouse vd., 1996). Bu kapsamda çalışmamızda da öncelikle *Arabidopsis thaliana* bitkisinde çalışma amacına uygun borik asit (50 ve 100 ppm) ve EBL (0,01 ve 1 μ M) konsantrasyonları ön çalışma ve literatür değerlendirmeleri ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulamaları ile birlikte bitkilerde strese toleransı arttırmada etkili olduğu tespit edilen EBL hormonunun etkileri biyokimyasal ve moleküler düzeyde araştırılmıştır. Çalışma amacına göre yetiştirilen bitkilerin gövde ve kök yaş ve kuru ağırlık, kök uzunlukları, yaprak sayısı ve alanı, meyve sayısı, ağırlığı ve boyu gibi büyüme parametreleri yanındapigment içeriği (total klorofil ve karotenoid), antioksidatif enzim (süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve guaiacol peroksidaz) aktiviteleri, prolin ve lipid peroksidasyon miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca uygulamaların sonunda yaprak, kök ve çiçek salkımı kısımlarında bor miktar tespiti yapılmıştır.

Moleküler seviyede ise *Arabidopsis thaliana*'da bor taşıyıcıları kodlayan genlerin, yüksek bor konsantrasyonu altında ekspresyonu teşvik edilen genlerin, BR-tarafından regüle edilen bazı stres genlerinin, hücre bölünmesi ve hücre duvarı ile ilgili bazı genlerin ve tuz, kuraklık ve ozmotik stres uygulamaları sonucu yüksek ekspresyon gösteren bazı genlerinsemi-quantitative-reverse transcriptase polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanarak borik asit ve/veya EBL uygulamalarına yanıtları yaprak ve kök dokularında transkripsiyonel seviyede belirlenmiştir.

Bu çalışma bitkilerde olası bor-EBL etkileşimi üzerine göreceli olarak detaylı bir şekilde yapılan ilk çalışma olup, bor stresine karşı BR'lerin kullanılması konusunda bilgi verecek temel bir araştırma niteliğini taşımaktadır.

1.2.Kaynak Özetleri

1.2.1.Bor ile ilgili yapılan çalışmalar

Arabidopsis thaliana başta olmak üzere farklı bitkilerde bor ile ilgili yapılan biyokimyasal ve moleküler çalışmalar ayrı gruplandırılarak değerlendirilmiştir.

Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen sekiz mısır (*Zea mays* L.) çeşidinin bor toksisitesine duyarlılıklarını belirlemek amacıyla borik asit (0, 10 ve 30 mg kg⁻¹) uygulamaları yapılmış ve araştırılan parametreler doğrultusunda (yaş, kuru ağırlık ve bor miktarı) mısır çeşitlerinin bor toksisitesine duyarlılıkları ortaya konulmuştur (Güneş vd., 2000).

Farklı bir çalışmada makarnalık buğday (*Triticum durum* L.) çeşitlerine uygulanan borun verim ve bazı verim öğelerine etkisi değerlendirilmiştir. Bor uygulamasının metre karede başak sayısı, bitki boyu ve yaprak sayısı üzerine etkileri istatistiki olarak önemli bulunmaz iken çalışılan buğday çeşitleri arasında bora toleranslı çeşitler belirlenmiştir (Taner vd., 2003).

Karabal vd. (2003) yaptıkları çalışmada, bora tolerant ve hassas arpa çeşitlerinin gövde ve kök dokularında bor toksisitesinin etkilerini araştırmışlardır. Yapılan analizlerde, kontrole nazaran kök kuru ağırlığında azalma olurken, protein, prolin ve hidrojen peroksit içeriğinde bir değişme görülmemiştir.

Fakat MDA içeriği doza bağımlı olarak gövdedeki dokularda artarken, kökte değişime rastlanmamıştır. Her iki kultivarın da gövde dokusunda yapılan bor uygulamaları sonucu antioksidan enzim aktivitesinde bir değişme olmazken, 10 mM borik asit uygulaması askorbat peroksidaz (APX) aktivitesini önemli oranda arttırmıştır. Araştırmacılar, bor toksisitesinin arpa yapraklarında membran yıkımını teşvik ettiği fakat aktif oksijen türleri ve antioksidan enzim aktivitesinin bor toksisitenin tolerans mekanizması üzerinde kritik bir rol oynamadığı sonucuna varmışlardır.

Yüksek ve düşük bor konsantrasyonlarının ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde büyüme üzerine etkileri kök ve gövde uzunluğu, Indol-3-asetik asit (IAA) ve pigment içeriği tespit edilerek belirlenmeye çalışılmıştır. Bor eksikliğinin kök uzunluğunu ve IAA içeriğini arttırdığı fakat gövde uzunluğunu ve pigment içeriğini düşürdüğü, yüksek miktarda borun ise kök uzunluğunu ve IAA içeriğini azalttığı fakat gövde uzunluğunu ve pigment içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir (Akam-Oluk ve Demiray, 2004).

Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, artan borik asit konsantrasyonlarının (0, 10, 20 ve 30 mg kg⁻¹) asmada (*Vitis vinifera* L.) stomatal direnç, lipit peroksidasyonu (MDA), membran geçirgenliği (MP), lipogenaz aktivitesi (LOX), prolin (PRO), hidrojen peroksit akümülasyonu ve major antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) aktiviteleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Uygulanan yüksek bor seviyesi yaprak ve kök gelişimini inhibe ederken bor miktarının kök, gövde ve yaprakta arttığını bulmuşlardır. Yüksek bor konsantrasyonaltında hidrojen peroksit, MDA ve MP artarken, PRO ve LOX aktiviteleri azalmıştır. Bununla birlikte bor uygulamalı örneklerde kontrole nazaran SOD ve CAT aktivitesi artarken, APX aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Güneş vd., 2006).

Diğer bir çalışmada, bora duyarlı (Clipper) ve dayanıklı (Sahara) arpa çeşitlerinin toksik bor konsantrasyonu altında yaşlı yapraklarında biriken bor miktarlarının karşılaştırılması ve bu miktarların görünür nekrotik bölgelerle korelasyonu araştırılmıştır.

Araştırmada, Sahara'nın Clipper ile aynı oranda bor konsantrasyonuna ulaşabilmesi için, Sahara Clipper'a göre daha yüksek toksik bor dozlarında yetiştirilmiştir. Aynı konsantrasyonlara ulaştıkları halde, Sahara'da nekrotik semptomların ortaya çıkması Clipper'a göre daha geç olmuştur. Bu sonuçların borun dokulardan aktif olarak uzaklaştırılmasına ek olarak, Sahara'da hücre ya da doku temelli diğeri bir mekanizmanın iş başında olabileceğine işaret ettiğini belirtmişlerdir. Olası mekanizmanın borun apoplastik bölgelerde veya vakuollerde biriktirilerek ya da özel metabolitlerle kompleksleroluşturarak metabolik yollardan uzak tutulması şeklinde olabileceğı düşünölmektedir (Roessner vd., 2006).

Bor tolerans mekanizmasının ve akümüłasyonunun anlaşılması amacıyla yapılan diğeri bir çalışmada, bora çok tolerant türlerden *Puccinellia distans* ve orta tolerant türlerden *Gypsophila arrostil*'in fizyolojik karşılaştırılması yapılmıştır. *P. distans*'ın *G. arrostil*'e göre borun tüm gövde akümüłasyonunu ve kökten gövdeye taşınımını daha iyi bloke edebildiğı anlaşılmıştır. Bu nedenle *P. distans*'ın bora tolerans mekanizması konusunda çalışılabılirinecek bir model bitki olabileceğı belirtilmiştir (Stiles vd., 2010).

Bitkide besin elementi taşınımında genetik manipulasyon ile bitki gelişimi için topraktaki değışken besin elementlerinin alınabilirliğinin arttırılabılirineceğı düşünölmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmada, sorbitol sentezi arttırılarak transgenik tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkilerinde borun floemdeki hareketliliğinin etkilendiğı ve kolaylaştığı ayrıca, bor eksikliğıne toleransının da arttığı tespit edilmiştir (Brown vd., 1999).

Arpada bora toleranslı ve bora hassas olarak seçilen çeşitlerde yapılan çaprazlamalar sonucu elde edilen popüłasyonda RFLP markörleri kullanılarak arpada bor toksisite toleransı ile ilgili kromozomal bölgeler tanımlanmaya çalışılmış ve dört kromozomal bölge işlevleri ile birlikte tanımlanmıştır (Jefferies vd., 1999).

Transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde bor taşıyıcısı olan BOR1'in yüksek oranda ekspresyonu ile borun limitli olduğı koşullarda kökten gövdeye translokasyonun (ksileme yükleme etkinliğinin artması) arttığı ve gelişimin yabancı tip bitkilere nazaran daha iyi olduğı belirtilmiştir. Ayrıca transgenik bitkilerde borun translokasyonunun artmasıyla (özellikle sürgün ucunda) tohum veriminin arttığı da tespit edilmiştir (Miwa vd., 2006a).

Bir başka çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'da plazma membranına yerleşmiş önemli önemli bir borik asit kanalı olan NIP5;1 tanımlanmış ve bu kanalın borun limitli olduğu koşullarda bitkinin gelişimi ve büyümesi için kritik derecede önemli olduğu tespit edilmiştir (Takano vd., 2006).

Daha sonra yapılan çalışmalarda, bitkilerde yüksek bor konsantrasyonu altında BOR1'in endositoz yolu ile vakuollerde degrade olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, *A. thaliana*'nın genomunda bulunan diğer BOR1 homologlarından biri olan BOR4'e odaklanmışlardır. Immunoblot analizleri sonucunda oluşturulan transgenik hatlarda, yüksek bor konsantrasyonu altında BOR4 birikiminin bora tolerans ile pozitif korelasyon gösterdiği sonucuna varmışlardır (Miwa vd., 2007).

Arabidopsis thaliana bitkilerine yüksek konsantrasyonlarda yapılan bor uygulaması sonucu bor tarafından teşvik edilen dokuz gen tanımlanmıştır. Bunlardan iki gene ait transkript kökte fazla bulunurken [At1g03770 (transkripsiyon faktör) ve At5g57340] diğer yedi transkriptin ise gövdede (At2g04040, At2g04050, At2g04070, At1g32870, At5g51440, At2g21640) daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Kasajima ve Fujiwara, 2007).

Farklı bir çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'da düşük bor konsantrasyonu altında oluşan fizyolojik cevapların genetik analizleri yapılmıştır. Bu amaçla yabancı tip *Arabidopsis thaliana* hatlarında borunile ilgi QTL (quantitative trait loci) bölgelerin tanımlanması hedeflenmiş ve genotipik varyasyonun borun etki mekanizmasını saptamada fırsatlar sunabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, bor ile ilişkili genlerin haritalanması ve klonlanmasının borun fizyolojik mekanizmasının araştırılmasında önemli olacağını belirtmişlerdir (Zeng vd., 2008).

Kastori vd. (2008), yüksek bora toleransın kaynağının bulunduğu birçok bitkide (buğday, hardal, bezelye vb.) PCR'a dayalı birçok teknik ile (RAPD, RFLP vb.) ebeveynler ve döller analiz edilerek bora tolerant genlerin haritalanmasının mümkün olduğu belirtilmiştir. Bu genlerin belirlenmesi ile borun regülasyon mekanizmasının anlaşılabilineceği ve direk olarak bu genlerde manipulasyon olanağının doğacağı öngörülmüştür.

2008 yılında, *Arabidopsis thaliana*'da NIP5;1'e fonksiyon olarak çok benzeyen NIP6;1 kanalı tanımlanmıştır. NIP6;1'in gövdenin nod bölgesinde özellikle vasküler dokuların floem bölgesine lokalize olduğu bulunmuş ve gelişmekte olan genç gövde dokuları arasında borik asitin dağılımı için gerekli olduğu anlaşılmıştır (Tanaka vd., 2008).

Bor bakımından zengin olan topraklarda yetişen *Gypsophila* cinsine ait bitkiler kontrol ve yüksek bor konsantrasyonu içeren ortamlarda yetiştirilmiştir. Differential display PCR (DDRT-PCR) tekniği kullanılarak kontrol ortamı ile yüksek bor konsantrasyonunda yetiştirilen bitkilerin transkriptomları karşılaştırılmış ve 30 adet bantın farklı zaman noktalarında farklı ekspresyon seviyeleri gösterdikleri tespit edilmiştir (Unver vd., 2008).

Arpada yapılan bir çalışmada, mikrodizin analiz yöntemi kullanılarak bor toksisitesi altındaki hassas arpa kultivarının transkriptom değişimleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, bor toksisitesinin sinyal iletim yollarında ve bitkinin oluşturduğu moleküler cevaplarda global değişiklikler yaptığını ortaya koyulmuştur (Oz vd., 2009).

Farklı bir çalışmada ise bora toleranslı olarak bilinen bir arpa çeşidinde bulunan tolerans allellerin yüksek verimli olan çeşide aktarılması amacıyla çaprazlamalar yapılmış ve elde edilen popülasyonda marköre dayalı seleksiyon (MAS) yapılmıştır. Bora toleranslı olarak belirlenen hatların alan denemeleri sonucu bor tolerans genlerinin bazı bor bakımından toksik çevrelerde alan verimini arttırdığı saptanmıştır (Emebiri vd., 2009).

Yapılan benzer bir çalışmada, tuz stresine hassas olan ve BR-sentezlemeyen *det2-1* ve *bin2-1* olmak üzere *Arabidopsis*'in iki mutanı kullanılmış olup, BR'lerin tuz stresine karşı rolü araştırılmıştır. Tuz stresi altında ekzogen EBL uygulaması sonucu, *det2-1* mutantının gelişiminin kısmen kurtarıldığını tespit etmişlerdir (Zeng vd., 2010).

Diğer bir çalışmada, GFP ile işaretlenmiş *NIP5;1* ve *BOR1*'in doğal promotorlarının kontrolü altında lokalizasyonu saptanmıştır. Limitli bor koşulları altında bir çok kök hücresinde *NIP5;1*-GFP'in plazma membranının özellikle distal, *BOR1*-GFP'nin ise proksimal alanında lokalize olduğunu tespit etmişlerdir (Takano vd., 2010).

Borun kökte sebep olduğu inhibisyonun temellerinin araştırıldığı çalışmada, globalgen ekspresyon analizi sonucu bor toksisitesinin absisik asitin (ABA) sinyalizasyonu, ABA yanıtını, hücre duvarı modifikasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik ederken, su ve besin taşıyıcıları kodlayan genleri baskıladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bor toksisitesinin su ve bor alınımı azaltarak, su stresini tetiklediğini ve böylece kök gelişiminin inhibisyonuna sebep olduğunu ortaya koymuştur (Aquea vd., 2012).

1.2.2.Brassinosteroidler ile ilgili yapılan çalışmalar

Literatür değerlendirmeleri, brassinosteroidlerin fizyolojik görevlerine ilişkin moleküler kanıtlar ve devamında farklı abiyotik streslere karşı oluşturdukları biyokimyasal ve moleküler cevaplara ilişkin çalışmalar şeklinde gruplandırılmıştır.

BR'lerin bitki gelişimi ve büyümedeki rollerini araştırmak için BR-yanıt vermeyen *bri1* mutanları kullanılmıştır. *bri1* mutanları brassinosteroidlere yanıt vermeyen fakat oksin, sitokinin, etilen, absisik asit ve giberelinlere duyarlı bir Arabidopsis mutantıdır. Ekzogen yapılan BR uygulaması, mutanları yabanıl fenotipe dönüştürmemiş, cücelik, koyu yeşil, uzun yaprak oluşumu, erkek sterilite, azalan apikal dominansi gibi fenotipik özelliklerden kurtaramamıştır. *BR1* gen lokusundaki mutasyon, bitkide birçok ve dramatik etkiye neden olması, bu genin BR'in algılanması ve sinyal iletimindeki kritik rolünü ortaya koymuştur (Clouse vd., 1996).

Hücre uzaması, ışık ve fitohormon regülasyonunda gerçekleşen ve bitki gelişimi için kritik olan gelişimsel bir işlemdir. Işık ve farklı hormonlar tarafından mutant olan bitkiler genellikle cücedirler ve cüce fenotip normal hücre uzamasının başarısız olması sonucu oluşmaktadır. *dwarf4* mutanları BR-biyosentez yolağında mutasyon oluşturarak elde edilen bir Arabidopsis mutantıdır. *dwarf4* mutantları ışık-mutantları ile aynı özellikleri gösterse de tamamıyla ve özellikle cücelik brassinosteroidle bağlı olup, diğer hormonların ekzogen uygulamaları yabanıl fenotipe dönüşümü sağlayamaz iken, BR uygulaması ile mutantlar kurtarılmış ve normal fenotipe dönüş sağlanmıştır. Bu sonuçtan, hücre uzaması için brassinosteroidlere ihtiyaç duyulduğu sonucu çıkarılmıştır (Azpiroz vd., 1998).

sax1 bir *Arabidopsis* mutanı olup, ABA ve oksine aşırı duyarlıdır. In vitro'da gözlenen fenotipik özellikler, primer köklerin kısa ve kıvrık olması, kotiledonların ise küçük, yuvarlak ve koyu-gri renge sahip olması iken in vivo ortamda cüce fenotip, gelişimde gecikme ve fertilitede azalmadır. Mutant fidelere yapılan ekzogen BR uygulaması mutanın kısmen normale dönüşümünü sağlamıştır. Bu sonuç, BR ile diğer hormonlar arasında karşılıklı sinyal alış-verişinin (baskılama-indükleme) olabileceği görüşünü desteklemiştir (Ephritikhine vd., 1999).

Yapılan bir diğer çalışmada DNA mikrodizin analizi ile *Arabidopsis thaliana*'nın yabancı tip ile BR-sentezlemeyen *det2* mutanında BR'in regüle ettiği genler tanımlanmaya çalışılmıştır. BR tarafından regüle edilen genlerin listesinde, sitokrom ile ilgili transkripsiyon faktör genleri, oksin ile ilgili genler, P450 genleri ile hücre uzaması ve hücre duvarı organizasyonu ile ilgili genler tespit edilmiştir (Goda vd., 2002).

Benzer bir çalışmada Affymetrix *Arabidopsis* Genom analizi ile BR tarafından regüle edilen genlerin ekspresyonu çalışılmıştır. BR uygulamalı ve BR eksikliğinde eksprese olan genlerin ekspresyon profilleri yabancı tip ve *Arabidopsis* mutanı *dwf1-6* kullanılarak belirlenmiştir (Mussig vd., 2002).

Aynı araştırmacılar tarafından diğer bir çalışmada, düşük konsantrasyonlarda 24-epikastasteron ve EBL gibi BR grubu hormon uygulamalarının kök uzamasını teşvik edici etkileri olduğu ve BR uygulamasının yabancı fenotipte kök uzamasını %50'in üzerinde, BR-sentezlemeyen mutanlarda (*dwf1-6* ve *cbb3*) ise %150'nin üzerinde tevsik ettiğini tespit etmişlerdir (Mussig vd., 2003).

Bao vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada ise, BR'lerin lateral kök gelişiminde gerekli oldukları ve oksin ile sinerjik etki yaratarak lateral kök gelişimini arttırdıkları transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde ortaya konulmuştur.

Steroid bir hormon olan BR'lerin sinyalizasyonunun hücre yüzeyinden paradigma şeklinde olduğu moleküler yaklaşımlarla tespit edilmiştir. BR'lerin lösin bakımından zengin olan reseptör kinaza hücre yüzeyinde bağlandığı ve böylelikle hücre içinde sinyal transdüksiyon basamaklarını başlatarak yüzlerce genin ekspresyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir (Belkhadir ve Chory, 2006).

BR sinyalinin birbirinden farklı fizyolojik olayları nasıl regüle ettiği henüz bilinmemektedir. Bu nedenle *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir proteomik çalışmasında BR tarafından regüle edilen 42 adet protein tanımlanmıştır. Tespit edilen proteinlerin sinyalizasyon, sitoskeletin yeniden düzenlenmesi, hormonların ve vitaminlerin biyosentezi gibi spesifik hücresel proseslerde potansiyel görevleri olduğu belirlenmiştir (Deng vd., 2007).

BR'in sinyal transdüksiyonu ve biyosentezi arasında bir bağlantı olduğu ve bu bağlantının çiçeklenmenin başlamasını nasıl kontrol ettiği yapılan farklı bir çalışma ile araştırılmıştır. Arabidopsiste çiçeklenme zamanında etkin oldukları daha önce tanımlanan iki transkripsiyon faktörün bu kontrol mekanizmasında kritik derecede önemli olduğu tespit edilmiştir (Clouse, 2008).

Yapılan bir diğer çalışmada, araştırmacılar Arabidopsiste BR biyosentez enzimleri içerisinde DWARF4'ün sentez edilen BR'in oranını belirleyen enzim olduğunu saptamışlardır. Daha sonraki çalışmalarında ise Arabidopsis *DWF4* genine promotor olarak GUS (*DWF4*pro:GUS) yerleştirilmiş böylece genin ekspresyon seviyesi ve lokalize olduğu bölgeler histokimyasal çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca endojen BR seviyesinin ölçüldüğü çalışmada *DWF4*pro:GUS bitkisine farklı doz ve zaman aralıklarında oksin uygulanmış ve çalışmanın sonucunda BR'in biyosentezinin oksin tarafından artırıldığı tespit edilmiştir (Liu vd., 2007).

Farklı bir çalışmada, EBL'in sıcaklık stresi altındaki domates ve *Brassica napus* fidelerinde etkisi araştırılmıştır. Western blot analizi sonucu EBL uygulamalı bitkilerdestres proteinleri olarakta bilinen ısı şoku proteinlerinin (Hsp)akümüleyonunu arttırarak termotoleransı sağladığını belirtmişlerdir (Dhaubhadel vd., 1999).

Bajguz (2000) ağır metal (bakır, kurşun, kadmiyum ve çinko) stresine maruz bırakın *Chlorella vulgaris*'de EBL'in büyüme ve hücrelerdeki ağır metal birikimine olan etkisini araştırmıştır. 10^{-6} M ile 10^{-4} M arası konsantrasyonlarda uygulanan farklı metallerin 10^{-8} M EBL uygulaması ilebirlikte *C. vulgaris*'in hücrelerinde ağır metal akümüleyonunu bloke ettiğini bulmuşlardır.

EBL'in metal birikimindeki inhibe etkisi ağır metaller arsında farklılık göstermiş ve bu sıralama; çinko>kadmiyum>kurşun>bakır şeklinde olmuştur. Hayat vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *Brassica juncea* bitkilerinde kadmiyum ve/veya 28-Homobrassinolidin (HBL) bitki gelişimi, fotosentez, karbonik anhidraz, nitrat redüktaz ve antioksidatif enzimler üzerinde etkileri araştırılmıştır. Sadece kadmiyuma maruz bırakılan bitkilerde kadmiyum miktarı arttıkça nitrat içeriği, nitrat redüktaz aktivitesi ve karbonhidrat seviyesi azalmıştır. Ayrıca büyümede, karbonik anhidraz seviyesinde, klorofil miktarında ve net fotosentetik oranda düşüş gözlenmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, POX ve SOD) ve prolin içeriği tek başına yapılan HBL uygulamaları sonucu kontrole nazaran artmıştır. Ancak kadmiyum ve HBL'nin birlikte yapıldığı uygulamalarda hem kök hem de toprak üstü organlarda enzim seviyesi daha da artmıştır. Kadmiyum tarafından oluşturulan toksik etkinin HBL uygulamasıyla iyileştirildiği belirtilmiştir.

Diğer bir araştırmada, genç maş fasülye (*Vigna radiata* L.) fideleri farklı alüminyum konsantrasyonlarına karşı EBL ya da HBL uygulamalarının etkisi araştırılmıştır. Sadece alüminyum uygulaması yapılan fidelerde büyümede, karbonik anhidraz aktivitesinde, su içeriğinde, su kullanma etkinliğinde, klorofil içeriğinde ve fotosentez oranlarında düşüslere neden olmuştur. Sadece EBL veya HBL uygulamaları sonucu büyüme parametrelerinde artış gözlenirken, alüminyum ile birlikte uygulandıklarında antioksidan enzim aktivitelerini ve prolin içeriği daha da arttırdıkları belirtilmiştir (Ali vd., 2008).

Kadmiyum stresi altında yetiştirilen *Raphanus sativus* L. bitkilerinde EBL'in etkileri bitki gelişimi, yaprakta net fotosentetik oran, karbonik anhidraz ve nitrat redüktaz aktivitelerindeki değişiklikler açısından değerlendirilmiştir. Kadmiyum uygulamaları bitki büyümesinde, fotosentetik pigment seviyesinde, net fotosentetik oran ve karbonik anhidraz ile nitrat redüktaz aktivilerinde düşmeye neden olurken, EBL uygulamalarının bitki gelişimi, pigment içeriği, fotosentez ve enzim aktivitelerinde toksik etkiyi azaltıcı etkisi olduğu belirtilerek EBL'in iyileştirici etkisi vurgulanmıştır (Anuradha ve Ram Rao, 2011).

Yapılan bir diğ er çalışmada, EBL uygulaması ile *A. thaliana* ve *B. napus* fidelerinde kuraklık ve soğuk stresine toleransın arttırılması yanında, tuz stresi nedeniyle tohum çimlenmesi inhibisyonunun aşılmasına da yardım ettiğı tespit edilmiştir. EBL'in streslere toleransı arttırma yeteneğı, kuraklık ve soğuk stres mark or genlerinin analizi ile doğrulanmış olup bu genlerle ilgili transkripsiyonel değişiklerin EBL uygulamalı *A. thaliana* bitkilerinde stresin erken d onemlerinde daha belirgin olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca, BR- sentezlemeyen *A. thaliana* mutantlarına (*det2-1* ve *dwf4*) EBL uygulanarak sıcaklık stresine maruz bırakılmış ve sıcaklığa toleransın arttırılmasında BR'in etkisi detaylı olarak araştırılmıştır (Kagale vd., 2007).

Arabidopsis thaliana'da yapılan bir başka çalışmada brassinosteroid, oksin ve sitokinlerin etilen üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Yabanıl tip ve hormon mutantlarına farklı konsantrasyonlarda yukarıda bahsedilen hormonların uygulanması sonucu etilen miktarının en fazla olduğu organlarda etilen üretimindeki değişim çalışılmıştır. Bu organlardan biri olan  i ek saplarında sadece BL uygulamasının etilen üretimine bir etkisinin olmadığı fakat IAA ile birlikte uygulandığında etilen üretiminde sadece IAA uygulamasına nazaran fazla artış g r ld ğu belirtilmiştir (Arteca ve Arteca, 2008).

BR'lerin stres toleransını nasıl arttırdığını anlamak amacıyla salatalık bitkisinde endojen BR seviyesi manipüle edilmiştir. Çalışma sonucunda, BR seviyelerinin foto oksidatif tolerans, soğuk stresi ve salatalık mozaik virüsüne karşı dayanıklılıkla pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, BR uygulamasının regülatör genler (*RBOH*, *MAPK1* ve *MAPK3*) yanında savunma ve antioksidan ile ilgili genlerin ekspresyonunu da teşvik ettiği ortaya koyulmuştur (Xia vd., 2009).

Chlorella vulgaris'te yapılan bir çalışmada, ağır metal uygulaması sonucu konsantrasyona bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT, APX, GR, SOD), total askorbat ve indirgenmiş glutatyon seviyesinde artma gözlenmiştir. Ağır metal uygulaması yapılmış *C. vulgaris* kültürlerinde BL uygulaması ile enzimatik ve enzimatik olmayan sistemin aktivitesinin daha da arttığı bulunmuştur (Bajguz, 2010).

Rady (2011) tarafından yapılan çalışmada ise, fasülye (*Phaseolus vulgaris*) bitkilerine NaCl ve/veya CdCl₂ ile birlikte EBL uygulaması yapılmıştır. Sadece NaCl ve/veya CdCl₂ uygulamaları ile gelişimde, pigment içeriğinde, meyve veriminde önemli oranda azalmalar tespit edilmiştir. Fakat EBL uygulaması ile oluşturulan toksik etki detoksifiye edildiği ve araştırılan parametrelerde iyileşme gözlemlendiği belirtilmiştir.

Literatür değerlendirmeleri sonucu brassinosteroidlerin, farklı bitkilerde sıcak, soğuk, tuzluluk ve kuraklık gibi streslere karşı toleransı arttırmaya yönelik etkileri biyokimyasal ve moleküler çalışmalarla belirlenmeye çalışılmıştır. Brassinosteroidlerin metal toksisitesine üzerine etkileri ise sadece biyokimyasal deneylerle belirlenmeye çalışılmış olup moleküler seviyede çalışmaya rastlanmamıştır. Borik asit ile yapılan çalışmalarda ise genellikle borun bitkilerde oluşturduğu fizyolojik değişiklikler, biyokimyasal ve moleküler deneylerle belirlenmeye çalışılmıştır. Borik asit ve HBL kullanılarak yapılan sadece bir çalışma (Yusuf vd., 2011) tespit edilmiştir. Fakat borun EBL hormonu ile biyokimyasal ve moleküler interaksyonu çalışılmamıştır. Bu bağlamda tez çalışmasında ilk kez bor ve bir bitki büyüme düzenleyicisinin olası ilişkisi moleküler ve biyokimyasal düzeyde göreceli olarak detaylı şekilde araştırılmıştır.

Yusuf vd. (2011), maş fasulye bitkiciklerine besin ortamına ilaveli olarak bor uygulaması ve bunu takiben spreyleme yöntemi ile HBL uygulamışlardır. Analizlerde büyüme biyomarkırları, yaprak gaz değişim özellikleri ve biyokimyasal parametreler dikkate alınmıştır. Bor uygulamasının büyüme, yaprak su içeriği ve su potansiyelini, fotosentez oranı, nitrat redüktaz (NR) ve karbonik anhidraz (CA) aktivitelerini doza bağlı olarak azalttığını tespit etmişlerdir. Bor uygulamasını takiben yapılan HBL uygulaması sonucunda büyümede, yaprak su içeriği potansiyelinde ve fotosentez fonksiyonlarında artma olmuş ayrıca SOD, CAT gibi antioksidan enzim aktiviteleri ile prolin içeriğini de arttırdığını belirtmişlerdir.

1.3.Borun Doğada Yaygın Bulunan Formları ve Topraktaki Bor

Bor, periyodik tabloda B simgesi ile gösterilen, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Bor serbest olarak değil, başka elementlerle bileşikler halinde bulunur. Doğada yaklaşık 230 çeşit bor minerali olduğu bilinmektedir. Çeşitli metal veya ametal elementlerle yaptığı bileşiklerin gösterdiği farklı özellikler, endüstride birçok bor bileşiğinin kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Bor, bileşiklerinde metal dışı bileşikler gibi davranır ancak, farklı olarak saf bor, karbon gibi elektrik iletkenidir. Borun saf elementi ilk kez 1808 yılında Fransız kimyager J.L. Gay-Lussac ve Baron L.J. Thenard ile İngiliz kimyager H. Davy tarafından elde edilmiştir. Bor, doğada düşük miktarda bulunmasına rağmen, litosfer ve hidrosferde fazla miktarda bulunmaktadır. Kayalardaki bor konsantrasyonu 5-10 mgkg⁻¹ arasında değişirken, nehirlerde 3-30 µg kg⁻¹ arasında değişmekte ve okyanusta ise yaklaşık 4.5 mg l⁻¹ konsantrasyonda bulunmaktadır. Toprakta bor, en fazla borik asit [B(OH)₃] formunda bulunmakla birlikte çok az bir miktarda borat anyonu [B(OH)₄⁻] olarak bulunur (Camacho-Cristobal vd., 2008).

Topraktaki bor, fazla yağmur düşen alanlarda kolayca aşağı süzülmemekte ve bu durum bitkinin yeterli miktarda bor alamamasından dolayı bor eksikliğine sebep olmaktadır. Az yağmur düşen alanlarda ise, süzülememekte, birikmekte ve bitki gelişimi için toksik seviye oluşturmaktadır. Özellikle kurak ve yarı kurak alanlarda, yüksek konsantrasyonda bor içeren yer altı sularının buharlaşması ile borun toprağın üst katmanında birikmesi sonucu toksisite oluşmaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008). Topraktaki bor eksikliği püskürtme ya da toprak gübreleme ile giderilirken, yüksek miktarda bor içeren topraklar sorun oluşturmaktadır (Reid, 2010).

1.4.Bitkilerde Borun Taşınımı ve Paylaşımı

Toprak pH değerleri (5.5-7.5) içinde borik asit şeklinde bulunan bor, kökten 3 farklı mekanizma ile alınmakta ve ksileme yüklenmektedir. Bunlardan ilki lipid tabakasından pasif difüzyon ile taşınmadır.

Diğer bitki besin elementlerinin alımında, membranda pozitif ve negatif yük durumları membran geçirgenliğini sınırlamakta ve normal seviyenin üstünde alım ile atılım membran taşıyıcıları vasıtasıyla olmaktadır. Fakat borik asit yüksüz olmasından dolayı iki katmanlı lipit tabakasından kolayca geçebilmektedir. Lipit tabakasının borik asit geçirgenlik katsayısı teorik ve deneysel olarak hesaplandığında, membrandan pasif difüzyon ile alınan borun, bitki gereksinimleri için yeterli olduğu bulunmuştur. Diğer mekanizma ise Major Intrinsic Protein (MIP) kanalları ile kolaylaştırılmış taşımadır. Bu kanallar protein yapısında olup üre, gliserol gibi küçük moleküllerin iki yönlü geçişine izin vererek kanallar boyunca hareketi hızlandırdıkları tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda düşük bor konsantrasyonu altında, *Arabidopsis thaliana*'da tespit edilen ve MIP ailesinin NIP (Nodulin 26-like Intrinsic Proteins) altfamilyasına ait AtNIP5;1 borik asit kanalının bitki gelişimi için gerekli olan borun köklerden alınmasında oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Son mekanizma ise düşük bor konsantrasyonu altında BOR taşıyıcıları ile enerjiye bağımlı taşıma sistemidir (Camacho-Cristobal vd., 2008; Reid, 2010). Bitkilerde borun ksileme yüklenmesine ilişkin ilk tanımlanan bor taşıyıcısı *A. thaliana*'da BOR1'dir ve *bor1-1* mutantlarında, yabancı tip *A. thaliana* bitkilerine göre borun gövdeye taşınımında azalma olduğu tespit edilmiştir. BOR1'in ksileme yüklemesi gerçekleşikten sonra gövdeye vasküler sistem boyunca terleme akışı ile bor taşınmaktadır. Ayrıca, taşıma kapasitesi türler arasında değişmekle birlikte bor reproduktif ve vejetatif dokulara floem ile de taşınmaktadır. Bu konuda önerilen mekanizma, borun taşıyıcı molekül olarak bor-diol kompleksi oluşturarak floemde taşınımıdır (Camacho-Cristobal vd., 2008).

1.5. Borun Bitkideki Görevleri

Bor bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli olan esansiyel mikro besin elementlerinden biridir ve sadece ürünlerin verimini değil kalitesini de etkilemektedir. Dünya genelinde, bor eksikliği diğer bitki mikro besin elementlerin eksikliğinden daha yaygın durumdadır.

Bitki gelişiminde borun ağırlıklı olarak esas önemi hücre duvarında bulunan RG II kompleksinde yapısal bileşen olmasından kaynaklanmaktadır. Borun diğer yapısal ve metabolik proseslerdeki rolüne ilişkin güçlü kanıtlar şimdiye kadar azdır. Fakat tanımlanan rolleri şunlardır; a) şeker taşınımı, b) hücre duvarı sentezi ve ligninleşme, c) RNA metabolizması, d) solunum, e) indol asetik asit mekanizması, f) fenol metabolizması ve g) membran taşınımıdır(Kocabek vd., 2009; Reid, 2010).

1.6.Bitkilerde Bor Eksikliği

Bor eksikliği, dünyada ılıman bölgelerin alkali topraklarında ve aynı zamanda kurak bölgelerin alkali topraklarında yaygındır. Bitkilerde bor eksikliğinin başlıca etkilerikök uzunluğu, IAA oksidaz aktivitesi, şeker taşınımı, karbonhidrat metabolizması, nükleik asit sentezi ve polen tübü gelişimi üzerine olmaktadır. Bunun yanında membran potansiyeli, plazmalemmaya bağımlı enzimler ve membranlardan iyon akışları, sitoskelet proteinleri, fenolik ve poliaminlerin birikimi ile nitrojen metabolizması üzerine de etkileri bulunmaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008). Bor eksikliği sonucu hücre duvarlarının anormal oluşumu ile değişen fiziksel özellikler bilinen durumlardan biridir. Bu durum, borun hücre duvarının ve pektinlerin yapısında bulunan RG-II'nin çapraz yapısında yer alması sonucu oluşmaktadır.

Bununla birlikte, bor eksikliğinde birçok hücre duvarı-modifiye ile ilgili genlerin ekspresyonlarının azaldığı ve bu değişim sonucu hücre duvarında oluşan gevşemeyle hücrenin normal büyüme gösteremediği tespit edilmiştir. Birçok çalışma, borun sitoskelet yapısında ve oluşumda rolü olabileceğini göstermektedir. *Arabidopsis* köklerinde, bor eksikliğinde aktin ve tubulin seviyelerinin arttığı ve mısırın kök uçlarındaki hücrelerde sitoskeletin polimerizasyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir. Bor eksikliğinde kök hücrelerine mekanik destek sağlamak amacıyla sitoskelet proteinlerinde birikim olduğu öne sürülmüştür (Camacho-Cristobal vd., 2008).

Giderek artan kanıtlarla desteklenen diğer bir durum, borun membranların özellikle hücre membranının yapısı ve fonksiyonları için gerekli olduğudur. Örneğin, yapılan bir çalışmada bor eksikliğinin membran potansiyelini değiştirdiği ve proton-pompalama ve ATPaz aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, bor eksikliği iyon ve diğer maddeler için de hücre membran geçirgenliğini de azaltmaktadır. Bununla birlikte, borun membrandaki işlevinin cis-diol grupları ile membranın stabilitesini sağlamanın yanında membran yapı ve fonksiyonunda görevli genlerin ekspresyonlarını da regüle ettiği tahmin edilmektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008). Bor, bitkideki besin elementlerinden biri olarak, fenolik bileşiklerin metabolizma ve konsantrasyonundaki değişikliklerden sorumludur. Bor eksikliğinin Phenylalanine–Ammonium Lysae (PAL) enzimini uyarımı ile fenoliklerin birikimine neden olduğu bilinmektedir. Askorbat/glutasyon döngülerinin hücrede detoksifikasyon mekanizmasında çok önemli rolleri olduğu ve bor eksikliği durumunda kök ve yapraklarda askorbat ve glutasyon miktarının azaldığını belirtilmiştir (Camacho-Cristobal vd., 2008).

1.7.Bitkilerde Bor Toksisitesi ve Toleransı

Birçok elementte olduğu gibi bor da yüksek konsantrasyonda toksik olmaktadır. Bor toksisitesine en duyarlı bitkilerin başında asma, incir ve fasulye gelir. Orta derecede duyarlı bitkiler arpa, bezelye, mısır, patates, yonca ve domates bitkileridir. Şalgam, şeker pancarı ve pamuk bor toksisitesine en dayanıklı bitkiler arasındadır.

Borun toksisite mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte bor toksisitesi semptomları genel olarak; büyümenin azalması (özellikle gövde büyümesinin) ve klorozis, sonrasında yaşlı yapraklarda, yaprak uç ve kenarlarında nekrozis oluşması olarak tanımlanmaktadır. Canlı organizmalardan özellikle bu kapsamda bitkiler, bor dağılımını kontrol etmeli ve hücrelerindeki bor seviyesini yeterli miktarda tutmalıdırlar. Borun toksisitesi, önemli anahtar metabolitlere affinite göstermesinden kaynaklanmaktadır. Genel olarak bor nispeten tepkisizdir ancak, cis konfigürasyonunda hidroksil grubu bulunan bazı metabolitler ile güçlü kompleks oluşturabilirler. Bu durum borun gen splicing mekanizması üzerine etkisi ve ribozun cis-diole bağlanması ile transkripsiyon ve/veya translasyona zarar vermesi sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008; Kocabek vd., 2009; Reid, 2010). Bor toksisitesi, ülkemizde içinde olduğu güney Avustralya, batı Asya, ve kuzey Afrika gibi dünyanın farklı bölgelerinde karşılaşılan bir durumdur (Şekil 1.1.) (Kastori vd., 2008).

Son 20 yıllık çalışmaların büyük bir kısmı neden bazı bitkilerin bora toleranslı olduğunu anlamaya harcanmış olup bu tolerans özelliklerinin belirlenmesi ile bor bakımından toksik topraklarda ürün veriminin artırılması ümit edilmiştir. Bor ile ilgili araştırmanın tarihi ve önemli gelişmeleri şöyle özetlenebilir (Reid, 2010):

1988: Buğday ve arpanın bora tolerant kultivarları tanımlanmış ve toleransın borun dokulardaki birikiminin azaltılması ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur.

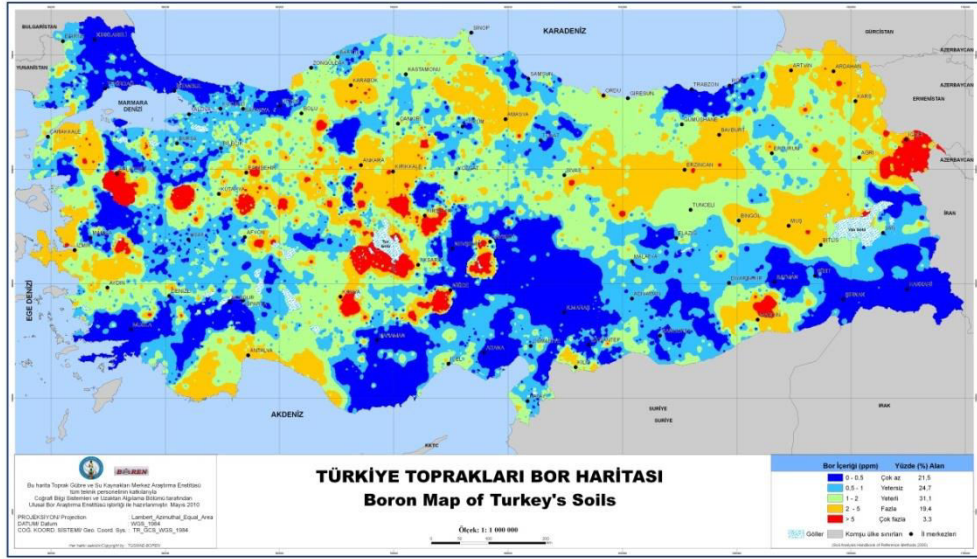
1999: Arpada bor toleransı ile ilgili kromozomal bölgeler belirlenerek haritalanmıştır.

2004: Tolerant varyetelerde bor birikiminin az olmasının fizyolojik temelini kök hücrelerinden bor atılımının aktif olması olarak saptanmıştır. Bor atılımını sağlayan taşıyıcıların bor eksikliği durumunda idare edilebilir olduğu fakat yüksek konsantrasyonda bu taşıyıcıların degrede olduğu belirtilmiştir.

2007: Pirinçte bor atılımını sağlayan taşıyıcıların sekansları temel alınarak arpa ve buğdayda aynı görevi yapan taşıyıcıların sekansları karşılaştırılmış ve homoloji gösterdikleri bulunmuştur. Bununla birlikte ifade seviyelerinin de yüksek oranda korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir. *Arabidopsis thaliana*'da bor atılımını sağlayan taşıyıcıların kökte yüksek oranda ifade olması ile bora toleransın arttığı tespit edilmiştir.

2009: Başlangıçta bor atılımını sağlayan taşıyıcıların sadece kökte bor birikiminde azalmaya neden olduğu sanılırken ek bir mekanizma ile borun dağılımının yapraklarda simplasttan apoplasta doğru aynı taşıyıcılar ile olduğunun bulunması sonucu tolerans mekanizması daha iyi anlaşılmıştır (Reid, 2010).

Bu çalışmaların sonunda, tolerant kultivarlar tanımlanmış, toleransın temel mekanizması anlaşılmış ve bor atılımını sağlayan taşıyıcıları kodlayan genlerin yüksek oranda ifadesi ile toleransın arttırılabileceği belirtilmiştir.



Şekil 1.1. Türkiye toprakları bor haritası (BOREN, 2012)

1.8. Bor Toksisitesi ile İlgili Transgenik Yaklaşımlar

Teorik olarak transgenik yaklaşım ile sadece bor atılımı sağlayan taşıyıcılara ait genlerin yüksek verimli kultivarlara aktarılması ile bu problemin üstesinden gelineceği düşünülmüştür. Serada kontrollü koşullar altında topraktaki borun homojen dağılımı ve kültürde tuzluluk gibi hiçbir kısıtlayıcının olmadığı koşullarda kultivarlarda bor atılımını sağlayan taşıyıcıların yüksek ekspresyonu ile üstün performans sağlanmıştır. Fakat 10 yıldır yağmurla beslenen yarı kurak alanlarda klasik ıslah ile elde edilen bora tolerant bitkilerin alan denemelerinde verime tutarlı ya da önemli gelişmeler göstermemiştir.

Bunun en iyi örneği; bir arpa varyetesi olan Sahara'nın bora tolerant genlerinin Güney Avustralya'da verimi yüksek olan arpa varyetelerine taşınması amacıyla yapılan çalışma sonucu ortaya koyulmuştur. Fakat istenilen verim alınamamıştır (Reid, 2010). Transgenik yaklaşım ile bitki türlerinde bor toleransının artmasına bağlı olarak verimde önemli artmalar olabileceği şüphelidir çünkü yüksek bor ile yüksek tuzluluk birlikte olmakta ve artmaktadır. Diğer bir karmaşık faktör ise, tuz stresine bağlı olarak su kullanımındaki sınırlayıcılık unsurudur.

Fakat şöyle bir durumda mevcuttur; fakir drenaj ve az yağmur alan yarı kurak ve kurak bölgelerde bor ve tuz toprakta yüksek konsantrasyonda ya doğal olarak bulunmakta ya da sulama suyunda yüksek konsantrasyon içeriyorlarsa bitki her iki stres faktörüne de birlikte maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yüksek bor ve tuz konsantrasyonunun gelişimde beklenilenden daha az toksik etki yaptığı ve bu durumda klorid varlığında borun taşınımı, bor varlığında ise kloridin taşınımının azaltılmasıyla açıklanmıştır. Bor ve tuz stresi altında borun, spesifik membran bileşenlerinin üzerine olan etkileri, ATPaz ve aquaporinlerin izoformları gibi tuza tolerans mekanizmasının olası elemanlarını etkilemektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008; Reid, 2010).

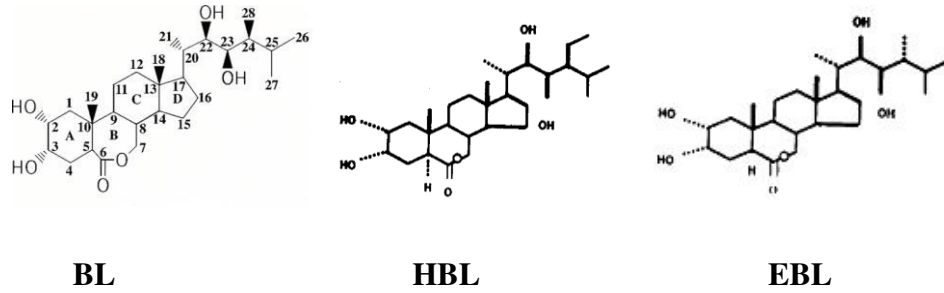
1.9.Brassinosteroid Çeşitleri ve Biyosentezi

1.9.1.Brassinosteroid çeşitleri

Grove vd. tarafından 1979 yılında ilk kez kolzadan brassinolid [(22R, 23R, 24S) - 2 α , 3 α , 22, 23-tetrahidroksi-24-metil- β -homo-7-oksa-5 α -kolestan-6-on)] izolasyonu gerçekleştirilmiştir. BR'ler kolestanın hidroksile edilmiş türevleridir ve BR'lerin yapısal varyasyonları, C17 yan zincirinin yanı sıra A ve B halkası üzerine farklı grupların gelmesi ile elde edilmektedir. Farklı BR'ler, yan zincir uzunluğuna (yan zincirdeki C sayılarına) göre, C₂₇, C₂₈ ve C₂₉ BR'leri olarak sınıflandırılmaktadır (Bajguz, 2007). C₂₇, C₂₈ ve C₂₉ steroidlerini içeren BR'ler, benzer yan zincir yapılarına sahiptir ve genel olarak 5 α -kolestan iskeletini taşımaktadırlar (Sakurai, 1999). C₂₇ BR'leri, C24 pozisyonunda alkil grubu içermemektedir ve kolesterolden üretilmektedir. C₂₈ BR'leri, C24 pozisyonunda bir metilen, α -metil veya β -metil gruplarına sahiptir ve 24-metilenekolesterol, kampesterol ya da 24-epikampesterolden türevlenebilmektedir. C₂₉ BR'leri, C24'de etil veya α -etil grubuna sahiptir ve isofukosterol veya sitosterolden türevlenmektedir. Ayrıca, C24'de bir metilen ve C25'de ilave bir metil grubu içeren C₂₉ BR'leri, 25-metil-24-metilenekolesterolden türevlenmektedir (Yokota, 1997).

C₂₈ BR'lerin ara bileşikleri, bitkilerde en yaygın bulunan formlardır (Sakurai, 1999). Doğadaki BR'lere ardışık sayısal numaralandırma yapılmıştır.

BR1, brassinolidi ifade etmekte ve diğerleri BR2, BR3, BR4...BRn olarak devam etmektedir. Bununla birlikte tüm BR'ler, daima biyolojik olarak aktif değildir. Brassinolid (BL), 24-epibrassinolid (EBL) ve 28-homobrassinolid (HBL) fizyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan biyolojik aktif brassinosteroidlerdir (Şekil 1.2.) (Rao vd., 2002). EBL ve HBL etkileri arasındaki farklılık yapı ve stabiliteden kaynaklamakta olup, EBL'in alan denemelerinde HBL'den daha stabil olduğu tespit edilmiştir (Khripach vd., 2003).

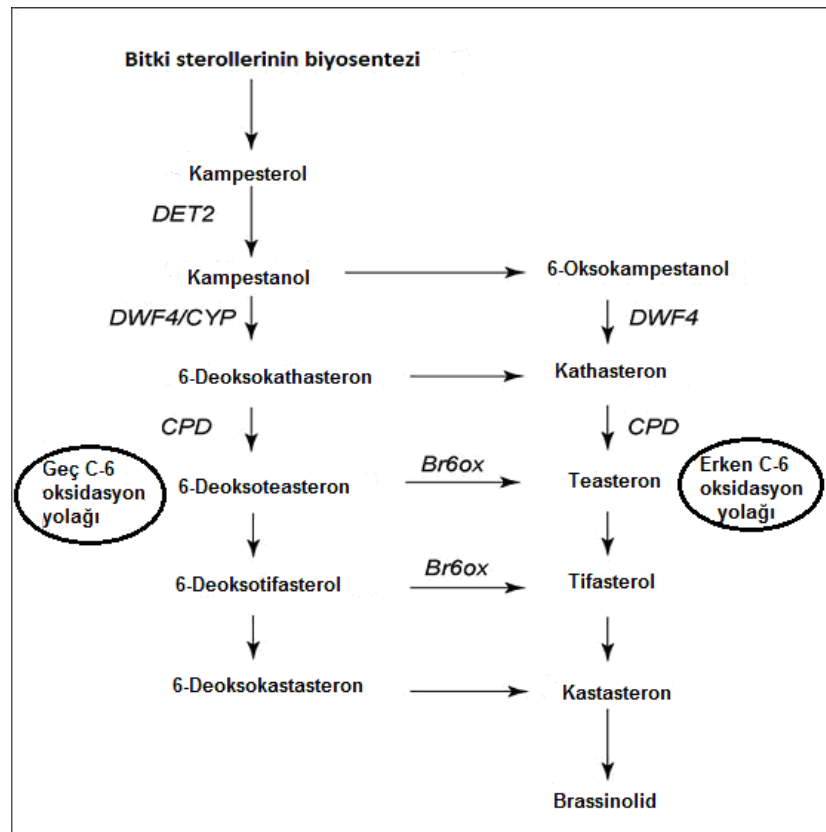


Şekil 1.2.Brassinolid (BL) (Amzallag ve Vaisman, 2006), 28-Homobrassinolid (HBL) ve 24-Epibrassinolid (EBL)'in kimyasal yapıları (Rao vd., 2002).

1.9.2.Brassinosteroidlerin biyosentezi

BR biyosentezi ve BR biyosentezinden sorumlu genler ilk olarak Arabidopsis, çeltik ve domateste tanımlanmıştır. BR'ler kampesterol, sitosterol ve kolesterolden sentezlenmektedir. Hücrede bulunan 3 sterolde bitki hücrelerinde fazla sayıda aracıyı metabolize etmektedir fakat bu metabolitlerden çok azı biyolojik olarak aktiftir (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006). BR'in en aktif formu olan brassinolid, kampesterolden birçok yol ile sentezlenmektedir. Basamak basamak yapılan metabolik çalışmalar, kampesterolden kastasterona erken ve geç C-6 oksidasyon yolağı olmak üzere 2 bağlantılı paralel yolak olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 1.3.). Son basamaklarda, kastasteron B halkasının laktanizasyonu ile brassinolide dönüştürülmektedir. BR biyosentezindeki oksidasyon basamakları sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri tarafından sentezlenmektedir. C-22 hidroksilasyon reaksiyonları P450 genlerinden *DWF4* geni, C-23 hidroksilasyon reaksiyonları ise *CPD* geni ile oluşturulmaktadır.

C-6 oksidasyonu ise *BR6ox* tarafından katalizlenmektedir. C-22, C-23 hidroksilasyon ve C-6 oksidasyon reaksiyonları BR biyosentezinde anahtar regülatör basamaklardır (Divi ve Krishna, 2009). Karmaşık olan BR metabolik yolları; dehidrojenasyon, demetilasyon, epimerizasyon, esterifikasyon, glikozilasyon, hidroksilasyon ve sülfonasyon gibi metabolik süreçleri gerektirmektedir (Bajguz, 2007). BR biyosentezinde birbiriyle bağlantılı iki yolak olması sentezin kompleksliğini arttırırken, çeşitli stres ortamları gibi farklı fizyolojik şartlarda avantaj sağlamaktadır (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).



Şekil 1.3.BR biyosentez yolunun basitleştirilmiş modeli (Divi ve Krishna, 2009)

Bitkilerde organa özel regülasyonda, BR biyosentez genlerinin ekspresyonuna bakıldığında *Br6ox* ve *DWF4* genlerinin ekspresyonunun maksimum olarak sürgün uçlarında ve sonrasında da meyvede olması, bu organlardaki endojen BR seviyeleri ile de uyuşmasına bağlı olarak, BR'lerin genç ve gelişmekte olan organlarda oldukça aktif olarak sentez edildiğini göstermektedir (Clouse, 2003; Divi ve Krishna, 2009).

BR biyosentezinin subsellüler lokalizasyonu henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Giberellin biyosentezinin endoplazmik retikulumda gerçekleşmesine benzer olarak brassinolid sentezinin de endoplazmik retikulumda gerçekleştiği ön görülmektedir (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).

1.10.Brassinosteroidlerin Taşınımı ve Lokalizasyonu

EBL'in ekzogen uygulanma ile kökten gövdeye taşındığı radyoaktif işaretleme ile saptanmıştır. Fakat genç salatalık yapraklarına ^{14}C – EBL uygulaması yapıldığında hormonun hemen alındığı ama yaprak dışında diğer kısımlara yavaşça taşındığı saptanmıştır. Uygulanan ^{14}C -EBL'den sadece %6'sının daha genç yapraklara taşındığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, bezelye bitkisinin yapraklarına radyoaktif işaretli brassinolid [^3H]BL ya da kastasteron [^3H]CS uygulaması sonucu sadece yapraklarda kaldığı dışarı taşınmadığı tespit edilmiştir. Benzer durum çeltik bitkisinin yapraklarında da gözlenmiştir. Farklı bir çalışmada ise, köklerde 72 saat sonra radyoaktiviteye rastlanmıştır fakat çoğunluğunun suda çözünen BR metabolitleri formunda olduğu tespit edilmiştir. Buğdayda yapılan çalışmada, uygulamadan 7 gün sonra yapılan analizde radyoaktif işaretli EBL'in yaprak dışına çıkmadığı tespit edilirken salatalık bitkisinde sadece uygulamayı takiben 3 saat sonra yaprak dışına çıktığı saptanmıştır. Brassinosteroidlerin taşınımının bitkiden bitkiye farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Symons vd., 2008). Kökler tarafından alınan EBL'in gövdeye ksilem akışı ile hareket ettiği varsayılmaktadır. Ksilem akışının tek yönlü olmasından dolayı, yapraklara ekzogen uygulanan EBL'nin yapraktan diğer yapraklara sadece floem yoluyla taşındığı belirtilmektedir. Ekzogen uygulanan EBL'in kökten gövdeye taşınımında kanıtlar olmasına rağmen endojen BR'lerin kökten gövdeye taşınımının aynı şekilde olmadığı ispatlanmıştır.

Yapılan çalışmalar ile endojen BR'lerin sentez edildikleri bölgede lokal olarak rol aldığı sonucu desteklenmiştir. BR aracı metabolitlerin dokulara dağılımı karşılaştırıldığında, farklı organlarda farklı metabolit miktarlarının farklı olmasına rağmen tüm bitki dokularında var olduğu tespit edilmiştir.

BR biyosentezi ile ilgili enzimlerin, çalışılan tüm dokularda ifade edildiği fakat ifade seviyelerinin dokudan dokuya değiştiği tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyelerindeki bu değişmelerin ise enzimlerin dokulardaki farklı görevleri ile ilgili olduğunu ortaya konmuştur. Birbirine paralel olarak aynı anda birçok yerde gerçekleşen BR biyosentezi ve BR sinyal iletimi bileşenlerinin özellikle genç dokular başta olmak üzere tüm bitkide ifade olduğu görülmüştür. Kanıtlar, her organın BR sentezlediğini ve kendi aktif BR'lerini kullandıklarını ortaya koymuştur (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).

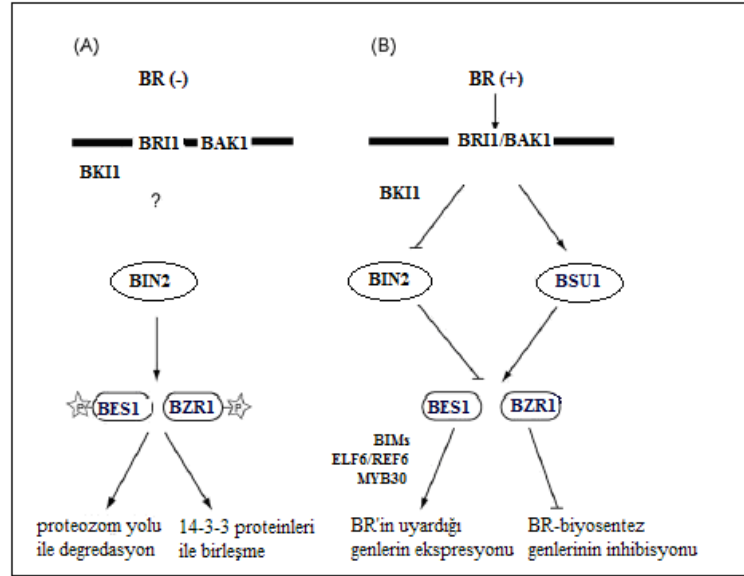
1.11.Brassinosteroidlerin Sinyal İletim Modeli

Yapılan fizyolojik çalışmalar her ne kadar brassinosteroidlerin bitki büyüme regülatörü olarak tanımlanmasına izin verse de genetik çalışmalar, yeni bir bitki hormonu olduğunu ispatlamıştır. BR'lerin bitki gelişimindeki önemli rolünün ortaya çıkarılması, tanımlanması ve BR sinyal iletim yolundaki birçok bileşenin karakterizasyonu, BR-sentezlemeyen (BR-deficient) ve BR-yanıt vermeyen (BR-insensitive) mutantlarla yapılan moleküler genetik çalışmalar ile olmuştur (Divi vd., 2010b). Hormon-sentezlemeyen mutantlar; biyosentetik enzimleri kodlayan genlerde oluşturulan mutasyon olup hormon uygulaması sonucu kurtarılarak yabanıl fenotipe dönmektedir. Hormon-yanıt vermeyen mutantlar ise, hormon-sentezlemeyen mutantlarla aynı fenotipe sahip olan fakat hormon uygulaması ile geri döndürülemeyen mutantlardır (Divi ve Krishna, 2009).

Plazma membranına lokalize olmuş BR-reseptörü ve sinyal iletiminde rol oynayan diğer kısımların tanımlanması genetik çalışmalar ile sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu bugün kabul edilen BR'in sinyal iletim modeli şu şekildedir: Hücre yüzeyindeki BL, plazma membranına lokalize olmuş homo-oligomer yapıda olan lösin bakımından zengin (leucine-rich repeat-LRRs) reseptör-kinaz benzeri (receptor-like kinase-RLK) BRI1 (Brassinosteroid Insensitive 1) tarafından algılanmaktadır (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).

Brassinolidin BRI1'e bağlanması ile BRI1'in C-uç domain otofosforilasyonu, inhibitör protein olan BKI1'in (BRI1 kinaz inhibitör 1) yapısının ayrılması ve BRI1'in hetero-oligomer yapıda olan ikinci LRR-RLK olan BAK1 (**BRI1-associated reseptör kinase 1**) ile transfosforilasyonu gibi bir seri biyokimyasal olayı teşvik etmektedir. BR varlığında, BRI1/BAK1'in aktivasyonu ile sinyal iletimi başlamakta ve fosfataz BSU1 (**bri1- suppressor 1**) defosforilasyon ile BZR1 ve BES1'i pozitif regüle etmektedir. BES1 ve BZR1'in aktif defosforilasyon formları BR'ler tarafından uyarılan genlerin transkripsiyonuna (BES1) ve BR biyosentez genlerinin baskılanmasına (BZR1) neden olmaktadır. BR sinyalinde diğer bilinen komponentlerden biride negatif regülatör olan BIN2 (**Brassinosteroid Insensitive 2**), transkripsiyon faktörü olan BZR1 (**brassinazole-resistant 1**) ve BES1 (**bri1-EMS-suppressor 1**)'i birçok bölgeden fosforilayarak negatif regüle etmektedir. BIN2, BZR1 ve BES1'in degrade olmasını sağlamakta ve transkripsiyonel regülatör aktivitelerini engelleyerek DNA'ya bağlanmasını önlemektedir (Saval di-Goldstein ve Chory, 2006; Divi ve Krishna, 2009).

Kısaca; BR varlığında (+), BR reseptörü olan BRI1, BAK1'e bağlanarak onu aktif hale getirirken BIN2'yi inaktif hale getirmektedir. BIN2'in inaktif hale gelmesiyle BSU1 aktif hale gelir ve bu aktivasyon sonucu BZR1 ve BES1'de aktif edilmektedir. Aktive edilmiş BZR1, BR-biyosentez genlerinin inhibisyonuna sebep olurken, BES1'in ise diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte BR'in uyardığı genlerin ekspresyonlarını etkilemektedir. BR yokluğunda (-) ise, BIN2 aktif hale geçerek, BZR1 ve BES1'in inaktivasyonunu sağlamaktadır. İnaktif hale geçen BZR1 ve BES1 ya proteozom yolu ile degrade olur ya da 14-3-3 proteinleri ile birleşme meydana gelmektedir. Fakat ne BIN2'in ne de BSU1'in BRI1 ile interaksyonu ve BR'in sinyalini nasıl aktardığı şu ana kadar bilinmemektedir (Şekil 1.4.) (Divi ve Krishna, 2009).



Şekil 1.4. BR sinyal yolu. BR yokluğunda (A) ve BR varlığında (B) sinyal iletim modeli (Divi ve Krishna, 2009).

1.12. Brassinosteroidlerin Fizyolojik Etkileri

BR'lerin bitki gelişimindeki başlıca etkileri hücre bölünmesi ve genişlemesi, hücresel farklılaşma, lateral kök gelişimi, vasküler farklılaşma, polen tübü gelişimi, apikal dominansının sürdürülmesi, çiçeklenme, senesens ve strese karşı toleransın artırılması olarak sıralanabilir (Clouse ve Sasse, 1998; Rao vd., 2002; Sasse, 2003; Amzallag ve Vaisman, 2006; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Ashraf vd., 2010).

BR'ler hücre genişlemesi ve hücre bölünmesini teşvik eder. BR'lerin büyümeyi destekleyici etkileri hücre uzaması ve bölünmesini hızlandırması ile gerçekleşmektedir. BR'lerin fizyolojik bu etkisi ilk kez fasulye ikinci internod deneyi ile gösterilmiştir. Diğer deney ise, çeltikte yaprak eğilmesi deneyidir. Çeltikte yaprak ayasının eğilmesine BR'in teşvik ettiği hücre genişlemesi sebep olmuştur. Yaprak ayasının eğilmesi etilenin sebep olduğu epinastiye benzer bir durumdur. Fakat yapılan deneyde BR'ler, çeltik laminasının yaprak kınına değdiği bölgede üst yüzeyde bulunan hücreler, alt yüzeydeki hücrelere nazaran daha çok uzamış böylece yaprağın dikey olarak dış kısma doğru eğilmesine sebep olmuştur.

Genetik alışmalar, BR mutantlarında cüce fenotipler, BR'lerin normal bitki gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. BR-sentezlemeyen mutantlar ile yabancı tip bitkilerin yapraklarında yapılan mikroskopik çalışmada, mutantlarda hücre boyutunun yabancı tipe göre daha küçük olması BR'lerin gövdede önemli bir bitki büyüme hormon sınıfı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, BR biyosentezi ile ilgili *DWF4* geninin yüksek ekspresyonu bitki gelişiminde artışa sebep olmuştur. Böylece, BR'lerin en önemli ve erken tanınmasını sağlayan özelliğinin hücre bölünmesini ve uzamasını teşvik ediyor olması sonucuna varılmıştır. BR'ler, aquaporinler ve vakuolar H⁺-ATPaz aktivitesi ile su alınımlarını etkilemektedirler. Ayrıca hücre duvarında gevşemeyi artırmakta ve ksiloglukan endo-glikozilaz/hidroksilaz (XTH'ler) ve hücre duvarında bulunan fakat enzimatik olmayan proteinler gibi hücre duvarını modifiye eden enzimlerin ekspresyonunu teşvik etmektedir. Hücre uzaması, mikrotübül organizasyonunun kontrolü ile de gerçekleşmektedir. Mikrotübül dizilimi, sentez sırasında selüloz mikrofibrillerin düzenlenmesine yardım eder ve normal hücre uzamasında mikrofibriller hücre duvarında çapraz olarak dizilirler. Yapılan mikroskopik analizler sonucu, BR-sentezlemeyen Arabidopsis mutantlarının mikrotbllerinin çok az olduğu bulunmuştur. Mutantın BR ile muamelesi sonucunda, normal mikrotübül sayısının ve organizasyonunun eski haline geldiği grlmştir. BR'lerin hücrede toplam tblin protein miktarını arttırmadığı, fakat mikrotübül oluşumunu ve organizasyonunu düzenlemede rol aldığı bulunmuştur (Sasse, 2003; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).

BR'ler kök gelişimini hem inhibe eder hem de teşvik ederler. Ekzogen uygulanan BR'ler, konsantrasyona bağlı olarak kök gelişimini negatif ya da pozitif olarak etkileyebilmektedirler. İnhibisyon için konsantrasyon sınırı, kullanılan BR analogunun aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Sonuç olarak BR'lerin kök uzaması ve dallanması gibi kök morfolojisinde güçlü etkileri olduğu ortaya koyulmuştur (Sasse, 2003; Mussig vd., 2003; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006).

BR'ler vasküler gelişim boyunca ksilem farklılaşmasını teşvik ederler. BR'ler ksilemi teşvik edip floem farklılaşmasını baskılayarak vasküler gelişimde önemli rol oynamaktadırlar. Buna kanıt, *det2* mutantlarındaki vasküler sistemin, yabancı tip bitkilerden farklı olarak floem/ksilem oranının bozulması ile gösterilmiştir.

BR-sentezlemeyen mutantlarda, vasküler demetlerin sayısında düşüş ve demetler arasında düzensiz boşluklar gözlenmiştir. Buna karşın mutant bitkilerde, BR reseptör geninin fazla ekspresyonu sonucu yabancı tip bitkilere nazaran daha fazla ksilem üretiminin gerçekleştiği bulunmuştur. Bununla birlikte, BR reseptör-protein benzeri kodlayan genlerin sadece vasküler dokularda ifade olması, BR sinyal iletim yolunun vasküler sistem için spesifik olduğu sonucuna götürmüştür (Saval di-Goldstein ve Chory, 2006).

BR'ler polen tüpü gelişimi için gereklidirler. Polenler, BR'lerce zengin kaynaklar olup bu durum BR'lerin erkek fertilitesindeki önemini ortaya koymaktadır. BR'ler, polen tüpü gelişimini (stigmadan embriyo kesesine kadar) teşvik etmektedir. Örneğin, BR sentezlemeyen Arabidopsis *cpd* mutanı ile yapılan çalışmada, stigma üzerinde çimlenme sonrası polen tübü uzamasının başarısız olduğu ve polen tübü uzamasının kısmen BR uygulamasına bağlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, BR-yanıt vermeyen mutantlarla yapılan çalışmada, mutantlar kendine tozlaştırılmış, polen tübü gelişimi başarısız olmuş ve sonuçta tohum elde edilememiştir. Bununla birlikte mutantlar ile yabancı tip bitkilerin elle tozlaştırılması sonucu fertil tohumlar üretilmiştir. Böylece, normal polen tüp gelişimi için hem BR hem de BR sinyal iletimine ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır (Saval di-Goldstein ve Chory, 2006).

1.13.Brassinosteroidlerin Diğer Bitki Hormonları ile Olası Etkileşimleri

Bitkinin biyotik ve abiyotik streslere adaptasyonunda bitki büyüme düzenleyicilerinin (Absisik asit-ABA, etilen-ET, jasmonik asit-JA ve salisilik asit-SA) görevleri tanımlanmıştır. SA, JA ve ET hormonları patojenlere karşı savunmada ve böcek saldırısında önemli iken ABA'nın kuraklık ve tuz stresinde anahtar hormon olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte SA, ET ve ABA hormonlarının sıcaklık stresine karşı da toleransı arttırmada etkili oldukları mutantlarla yapılan çalışmalar sonucunda ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmalarda, strese karşı oluşturulan cevabın oluşturulmasında BR'lerin SA, ET ve ABA'nın sinyal yolağında karşılıklı sinyal alış-verişi olabileceğini belirtmişlerdir (Saval di-Goldstein ve Chory, 2006; Nemhauser ve Chory, 2004; Bajguz ve Hayat, 2009).

BR'lerin gelişme üzerine uyarıcı etkileri özellikle genç ve gelişmekte olan gövde dokularında gerçekleşmektedir. Nanomolar konsantrasyonlarda BL'in etkisi olan hücre genişlemesinin kinetiği, oksinden farklı olmaktadır. Örneğin, soya fasulyesinin epikotil parçalarına BL uygulaması yapılmış ve uzama 45 dakika sonra başlayarak, uygulamadan birkaç saat sonra maksimum orana ulaşılmıştır. Buna karşın oksin, uzamayı 15 dakika sonra teşvik etmeye başlamış ve maksimum orana 45 dakika içinde ulaşmıştır. Araştırmacılar, BR'lerin büyümeyi gen transkripsiyonu kapsamında daha yavaş bir yolak ile gerçekleştirirken oksinin daha hızlı, belki gen transkripsiyonuna sebep olmadan ya da oksin tarafından indüklenen uyarıcı gen ifadesinin brassinolid tarafından indüklenen gen ekspresyonundan daha fazla olabileceğini düşünmüşlerdir. Aslında oksin ve BR'ler, gövde gelişimini sinerjik olarak ve birbirinden bağımsız olarak arttırmakta ve optimum aktivite için her iki hormona da ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, oksinler ve BR'ler, vasküler farklılaşma, çiçek, meyve ile kök gelişimini içeren benzer gelişimsel süreçlerin çoğunda birbirleriyle bağlantılıdır (Nemhauser ve Chory, 2004; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Bajguz ve Hayat, 2009).

BR'lerin kök gelişimindeki etkileri, oksin ve gibberellin etkisinden bağımsızdır. Yapılan çalışmada, polar oksin taşınımını engelleyen inhibitör (2,3,5-triiodobenzoik asit-TIBA) kullanılmış fakat BR'in teşvik ettiği kök gelişimi önlenememiştir. BR ve oksinler aynı zamanda uygulandığında her ikisinin de kök gelişiminde destekleyici ve inhibe edici etkileri eklemelidir. Diğer taraftan, BR-sentezlemeyen kök gelişimi indirgenmiş mutantlar gibberellin uygulaması ile normale döndürülememiştir. Çalışmalar, BR'lerin kök gelişimini inhibe ederken oksin ya da gibberellin ile interaksiyona girmediğini göstermiştir. Fakat oksin gibi BR'in yüksek konsantrasyonları etilen üretimini uyarmakta böylece, kök gelişimi üzerine BR'in inhibitör etkilerinin birkaçının etilen yolu ile olması durumu olası kılmaktadır. BR'ler düşük konsantrasyonlarda, lateral kök oluşumunu teşvik edebilmektedir. Bu durumda, BR'ler ve oksin sinerjik rol oynamaktadır. Bugün desteklenen modelde, BR'ler lateral kök gelişimini arttırmakta ve bunun bir kısmı polar oksin taşınımı etkisiyle olmaktadır (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Bao vd., 2004).

Tohumlar da polen tanecikleri gibi yüksek oranda BR içermekte ve tohum çimlenmesini teşvik etmektedirler. Her ne kadar interaksiyonların moleküler temeli bilinmese de BR'lerin diğer bitki hormonları ile interaksiyonu sonucu etkisinin gerçekleştiği bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile gibberellik asitin tohum çimlenmesinde pozitif, absisik asitin ise negatif etkileri olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada, tütünde çimlenmeyi gibberellik asitin sinyalizasyonundan bağımsız olarak BR'lerin arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, BR'lerin gibberellik asit mutantlarında da gecikmiş olan çimlenmeyi kurtardığı ve BR mutantlarının ABA tarafından oluşturulan inhibisyona yabanıl tip bitkilerden daha duyarlı oldukları saptanmıştır. Böylece, BR'lerin ABA'nın inhibitör etkisinin üstesinden gelmek için gerekli olduğu ve çimlenmeyi teşvik ettiği ortaya konulmuştur (Saval-di-Goldstein ve Chory, 2006).

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

Tez çalışmasında kullanılan yabanıl tip (wild type) *Arabidopsis thaliana*L. Heynh ekotip Columbia (*Col 0*) tohumları Belçika Antwerp Üniversitesi, Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Mevcut tohum sayısını arttırmak amacıyla Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji laboratuvarında torf içeren viyollere ekim yapılmış ve tohumlar hasat edilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Torf içeren viyollerde yetiştirilen dört haftalık *Arabidopsis thaliana* ekotip Columbia bitkileri

Arabidopsis thaliana L. Heynh'ın sistematığı ise şu şekildedir (Davis, 1965):

Alem	:Plantae
Bölüm	:Magnoliophyta
Sınıf	:Magnoliopsida
Takım	:Brassicales
Familya	:Brassicaceae
Alt familya	:Brassicoideae
Cins	:Arabidopsis
Tür	: <i>Arabidopsis thaliana</i>

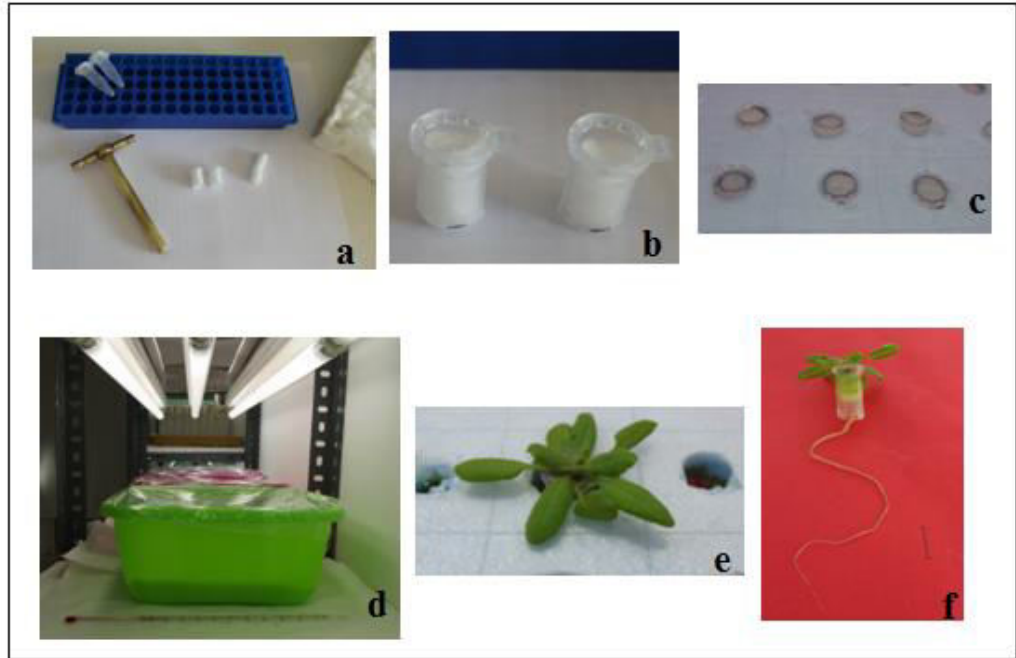
2.2.Yöntem

2.2.1.Hidroponik ortamda bitkilerin yetiştirilmesi

Tüm analizler için *Arabidopsis thaliana* bitkileri hidroponik ortamda yetiştirilmiştir. İhtiyaç duyulan maksimum bitki sayısı ve biyokütlenin elde edilmesini amacıyla literatürlerde verilen birçok farklı yöntem denenmiştir. Modifiye edilerek (Smeets vd., 2008; Waters vd., 2012) ulaşılan en iyi yöntem şu şekildedir: 1.5 ml'lik plastik tüplerin kapakları ve tüplerin alt kısımlarından yarısı kesilip uzaklaştırılmıştır. Kesik tüplerin iç kısımlarına tüp boyu kadar kesilen taş yünü bastırmadan yerleştirilmiştir (Şekil 2.2a-2.2b). Daha sonra tüpler, hidroponik tankların boyutlarına uygun olacak şekilde kesilen straforların üzerinde açılan deliklere yerleştirilmiştir (Şekil 2.2c). Dikkat edilmesi gereken nokta, tüplerin içine yerleştirilen taş yünlerinin hidroponik tank içerisindeki besin ortamıyla temas halinde olmasıdır. İyi bir çimlenme sağlamak amacıyla, tüplerin içinde bulunan taş yününün üst kısmına %0.8'lik hazırlanmış agardan damlatılmış ve jelleştikten sonra steril edilmeye gerek duyulmadan tohumlar her tüpe 3'er tane olacak şekilde ekilmiştir. Ekim tamamlandıktan sonra straforlar, içinde MGRL (Fujiwara vd., 1992) besin ortamı bulunan hidroponik tanklara yerleştirilmiş ve çimlenme boyunca tankların üstü streç film ile kaplanmıştır (Şekil 2.2d).

3 gün sonra streç film kaldırılmış ve çimlenmeyi takiben tohumlarda seyreltmeye gidilmiştir. 10-12 gün sonunda taş yünü boyunca gelişen kökler tüp ucundan görülmeye başlanmıştır (Şekil 2.2e ve f). Kültür şartları, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, 16 saat gündüz/ 8 saat gece'dir.

MGRL (Fujiwara vd., 1992) besin ortamı: 1.75 mM sodyum fosfat (pH5.8), 1,5 mM MgSO_4 , 2.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3.0 mM KNO_3 , 67 μM Na_2EDTA , 8.6 μM FeSO_4 , 10.3 μM MnSO_4 , 150 μM H_3BO_3 , 1.0 μM ZnSO_4 , 24 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 130 nM CoCl_2 ve 1 μM CuSO_4 .



Şekil 2.2. Laboratuvarda modifiye edilen hidroponik kültür sistemi. a: Sistemde kullanılan 1,5 ml'lik plastik tüpler ve tüplere uygun büyüklükte taş yünlerinin hazırlanması, b: alt kısımlarından yarısı kesilen tüplere taş yünlerinin yerleştirilmiş durumu, c: tüplerin straforların üzerinde açılan deliklere yerleştirilmesi, d: tüpleri içeren straforların besin ortamı ilave edilen hidroponik tanklara koyulması ve ilk 3 gün boyunca streç film ile kaplanması, e ve f: 20-21 günlük *Arabidopsis thaliana* bitkisi

2.2.2.Borik asit konsantrasyonlarının belirlenmesine ilişkin yapılan ön çalışmalar

Tez çalışması kapsamında uygulanacak borik asit konsantrasyonları ve uygulama süresini tespit etmek amacıyla ön denemeler kurulmuştur. MGRL sıvı besin ortamında 4 hafta boyunca yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* bitkileri 0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 ppm borik asit içeren besin ortamlarına aktarılmıştır. Farklı borik asit konsantrasyonlarında yetiştirilen bitki örneklerinden 2 kez örnekleme (biyokimyasal analizlerde borik asit uygulama süresinin belirlenmesi amacıyla) yapılmıştır. Bunlardan ilki 4. günde diğeri ise 8. günde yapılmıştır. Her iki örneklemenin sonunda bitki örneklerinin ortalama gövde yaş ve kuru ağırlık, kuru madde (%), toplam klorofil ve karotenoid miktarları belirlenmiştir.

2.2.3.Biyokimyasal analizler için kullanılan yöntemler

2.2.3.1.Biyokimyasal analizler için bitkilerin yetiştirilmesi ve uygulamaların yapılması

Dört hafta (28 gün) boyunca hidroponik ortamda yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* bitkileri 50 veya 100 ppm borik asit içeren (uygulama konsantrasyonları ön çalışmalar sonucu belirlenmiştir) MGRL sıvı besin ortamlarına aktarılmıştır. 4 gün boyunca borik asit uygulamasına maruz kalan bitkilere 5., 7. ve 9. günlerde olmak üzere toplam 3 kez yapraklara spreyleme yöntemi ile iki farklı konsantrasyonda 24-epibrassinolid (EBL) uygulaması yapılmıştır (Çizelge 2.1.). Yapılan literatür çalışmaları kapsamında, EBL (brassinosteroidlerin en aktif formu olan BL'in sentetik analogları arasından EBL, tarımda pratik kullanımından ve biyolojik aktivitesinin BL'e yakın olmasından dolayı (Ikekawa ve Zhao, 1991) tercih edilmiştir) uygulamaları için 0,01 μM ve 1 μM konsantrasyonlarına karar verilmiştir (Steber ve McCourt, 2001; Kagale vd., 2007; Ali vd., 2008; Behnamnia vd., 2009; Dalal vd., 2009; Divi vd., 2010; Zeng vd., 2010). EBL hormonunun (Sigma E-1641) öncelikle 1mg ml⁻¹ olacak şekilde stok solusyonu hazırlanmıştır (10 mg hormon 1 ml absöüt etanol içinde çözüldükten sonra son hacim %70'lik etanol ile 10 ml'ye tamamlanmıştır).

Spreyleme için iki farklı EBL konsantrasyonu içeren 400 ml solusyon hazırlanmıştır. 0.01 μM EBL için stoktan 1.92 μl , 1 μM için ise 192 μl alınmış ve 200'er μl (% 0.05) Tween-20 eklenerek son hacim distile su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır. Hormon uygulaması yapraklara spreyleme şeklinde yapılmıştır. Tween-20 eklenmesinin nedeni yapraklarda hormonun daha uzun süre kalmasını sağlamaktır. Her spreyleme bitkilerin tüm yaprakları ıslanacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu bitkilere ise spreyleme yöntemi ile hormonla eşit miktarda etanol içeren distile su uygulaması yapılmıştır. Son spreylemeden 24 saat sonra yani 10. günde (38 günlük) bitkiler hasat edilmiştir. Biyokimyasal analizler için ayrılan örnekler etiketlenerek analize kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Grafik ve tablolarda 50 ppm borik asit uygulaması "BA 1" , 100 ppm borik asit uygulaması "BA 2" , 0.01 μM EBL uygulaması "EBL 1" ve 1 μM EBL uygulaması "EBL 2" olarak kısaltılarak kullanılmıştır.

Çizelge 2. 1.Dört haftalık Arabidopsis bitkilerine biyokimyasal analizler için yapılan uygulamalar ve uygulama süreleri

Uygulamalar	Borik asituygulama (ppm) (4 gün süreyle)	Spreyleme ile EBL uygulaması 1 (μl) (5. gün)	Spreyleme ile EBL uygulaması 2 (μl) (7. gün)	Spreyleme ile EBL uygulaması 3 (μl) (9. gün)
Kontrol	-	-	-	-
EBL 1	-	0.01	0.01	0.01
EBL 2	-	1.0	1.0	1.0
BA 1	50	-	-	-
BA 1 + EBL 1	50	0.01	0.01	0.01
BA 1 + EBL 2	50	1.0	1.0	1.0
BA 2	100	-	-	-
BA 2 + EBL 1	100	0.01	0.01	0.01
BA 2 + EBL 2	100	1.0	1.0	1.0

2.2.3.2.Ortalama yaş ve kuru ağırlık

Her uygulamaya ait 10 bitkinin gövde ve kök kısımları ayrılarak ayrı ayrı yaş ağırlıkları (mg) tartılmıştır. Örnekler 70 °C’de 36 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları (mg) da tartılarak kaydedilmiştir.

Gövde ve kök örneklerine ait yaş ve kuru ağırlıklar kullanılarak % kuru madde miktarları [% kuru madde = (kuru ağırlık x100) / yaş ağırlık] hesaplanmıştır.

2.2.3.3.Ortalama yaprak sayısı ve kök uzunluğu

Uygulamalara ait 10 bitkinin yaprak sayısı ve 15 bitkinin primer kök uzunlukları ölçülerek bitki başına ortalama yaprak sayısı (adet) ve kök uzunlukları (cm) belirlenmiştir.

2.2.3.4.Ortalama meyve sayısı, uzunluğu ve ağırlığı

Uygulamalara ait 10 bitkinin ortalama meyve sayısı (adet), 18-20 adet meyvenin ortalama meyve uzunluğu (mm), 45-90 arası meyve tartılarak (uygulamalara ait seçilen 10 bitkinin artan bor konsantrasyonlarına ters orantılı olarak meyve sayısında azalma gözlenmesi nedeniyle tartım yapılan meyve sayısı farklılık göstermiştir) ortalama meyve ağırlığı (mg) belirlenmiştir.

2.2.3.5.Yaprak alanı ölçümü

Borik asit ve/veya EBL uygulamalı ortamlarda yetiştirilen 38 günlük 10-12 bitkinin 5. ve 6. yaprakları etanol (%96) : asetik asit (%99) (3:1) içeren koyu renkli şişelere aktarılmıştır. 4°C’de 24 saat tutulan yaprak örneklerinin klorofil içeriklerinin tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler %50’lik etanol ile çalkalanmış ve analize kadar 4°C’de %70’lik etanolde muhafaza edilmiştir (Rymen vd., 2010). Mikroskop görüntüleme işleminden önce yapraklar boyama işlemine tabi tutulmuştur. Farklı boyalar kullanılarak yapılan deneyler içinde en iyi sonuç %2’lik asetoorcein uygulamasından elde edilmiştir.

Tüm yaprak örnekleri 2 dakika süreyle asetoorcein boyasına maruz bırakıldıktan sonrafazla boya uzaklaştırılmış ve laktik asit kullanılarak preparatlar hazırlanmıştır. Fotoğraf makinesi ataçmanı olan Olympus SZX7 marka trinoküler stereo mikroskop ile uygulamalara ait yaprak örneklerinin fotoğrafları çekilmiştir. Yaprak alanları ImageJ ver 1.48 (National Institute of Mental Health, USA) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.3.6.Total klorofil ve karotenoid içeriğinin belirlenmesi

Her uygulamaya ait 0,5 g yaprak örneği 10 ml %90'lık aseton ile havanda iyice ezildikten sonra filtre kağıdından süzülerek tüplere aktarılmış ve son hacim %90'lık aseton ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. 15 dak. 5000 rpm'de santrifüj edilen örneklerin süpernatantları yeni tüplere aktarılarak 663 nm, 645 nm ve 450 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Klorofil a (mg g^{-1} yaş ağırlık) = $[(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) \times (V/1000 \times W)]$, klorofil b (mg g^{-1} yaş ağırlık) = $[(22,9 \times A_{645} - 4,86 \times A_{663}) \times (V/1000 \times W)]$ ve karotenoid (mg g^{-1} yaş ağırlık) = $[(4,07 \times A_{450} - (0,0435 \times \text{klorofil a} + 0,367 \times \text{klorofil b}) \times (V/1000 \times W)]$ miktarları Arnon (1949) metoduna göre hesaplanmıştır [V:ekstraktın son hacmi (ml), W: yaprak örneklerinin yaş ağırlığı (g)]. Pigment konsantrasyonları mg g^{-1} yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir.

2.2.3.7.Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Her uygulamaya ait yaprak örnekleri (0,5 g) 3 ml soğuk ekstraksiyon tamponu (Çizelge 2.2.) içinde havan ve tokmak yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra tüplere aktarılan bitki özütleri 4 °C'de 13.000 x g'de 20 dak. santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası yeni tüplere aktarılan süpernatantlar protein ve enzim aktivitelerinde kullanılmıştır. Ekstraksiyonda tüm basamaklar 4°C'de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.2.Ekstraksiyon tampon içeriği

Ekstraksiyon tampon içeriği	100 ml
0,2 M Sodyum fosfat tamponu (pH7.0)	25 ml
% 2 PVP	2 gr
1 mM Na-EDTA	0,0372 g
ddH ₂ O	100 ml tamamlanır.

0,2 M Sodyum fosfat tamponunun hazırlanışı(pH 7.0): İki farklı stok solüsyon hazırlanmıştır.

0,2 M monobasic sodium phosphate monohydrate (Stok solüsyon A): 500 ml içinde 13,8 g monobasic sodium phosphate monohydrate çözülmüştür.

0.2 M dibasic sodium phosphate (Stok solüsyon B): 500 ml içinde 14,2 g dibasic sodium phosphate çözülmüştür.

Stok solüsyon A'dan 39 ml, Stok solüsyon B'den ise 61 ml karıştırılarak pH 7.0 olan 0,2 M sodyum fosfat tamponu elde edilmiştir.

2.2.3.8. Total çözülebilir protein miktarının tespiti

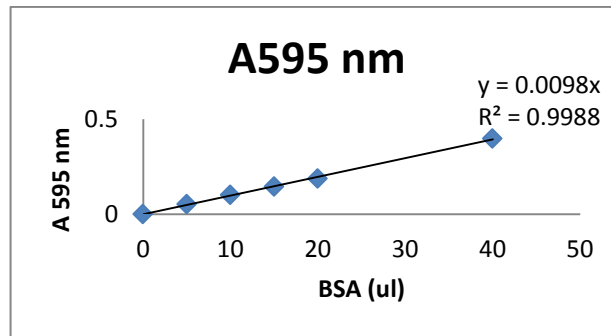
Yaprak örneklerin total çözülebilir protein miktarları Bradford (1976) metoduna göre belirlenmiştir. Protein miktarı bilinmeyen örneklerden 10 µl alınır ve üzerine 1990 µl Bradford reaktifi eklenir. BSA standart tüpleri ile birlikte oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve sonra spektrofotometrede 595 nm'de absorbanslar ölçülmüştür.

Bradford reaktifinin hazırlanışı: 50 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) 50 ml metanol içinde çözüldükten sonra, 150 ml fosforik asit ve 500 ml ddH₂O eklenmiştir. Hazırlanan karışım filtre ile süzildükten sonra üzerine 350 ml ddH₂O daha eklenerek reaktif hazırlanmıştır.

BSA standartının hazırlanışı: Sığır serum albümini (BSA) kullanılarak 1 mg ml^{-1} stok hazırlanmıştır. BSA standart hazırlanışı çizelge 2.3.'de, BSA standart grafiği ise şekil 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3.BSA standart hazırlanışı

BSA stok (µl)	Bradford reaktifi (µl)
0	2000
5	1995
10	1990
15	1985
20	1980
40	1960



Şekil 2.3.BSA standart grafiği

2.2.3.9.Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutazenzim aktivitesi NBT (Nitroblue Tetrazolium)'nin fotokimyasal indirgenme inhibisyonunun izlenmesiyle tayin edilmiştir (Beauchamp ve Fridovich, 1971). SOD reaksiyon karışımı (Çizelge 2.4.) ve enzim ekstraktı aynı tüpe eklendikten hemen sonra ışık altında (15 W) 20 dak. süreyle bekletilmiştir (Çizelge 2.5.).

SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm’de ışık altında bekletilen NBT’nin %50 indirgenmesi için gerekli olan enzim miktarı olarak tayin edilmiştir. SOD enzim aktivitesi ölçümünde işlemler 25 °C’de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4.SOD reaksiyon karışımı

SOD reaksiyon karışımı	100 ml
0,2 M Sodyum fosfat tamponu (pH7.8)	25 ml
10 mM Na-EDTA	6,65 ml
100 mM L-methionin	10 ml
1 mM NBT	3,35 ml
0,2 mM Riboflavin	1,65 ml
ddH ₂ O	53,35 ml

0,2 M Sodyum fosfat tamponu (pH7.8) hazırlanışı: 0,2 M sodyum fosfat (pH 7.0) hazırlanışı başlığında belirtildiği şekilde A ve B olmak üzere iki farklı stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyon A’dan 8,5 ml, Stok solüsyon B’den ise 91,5 ml karıştırılarak pH 7.8 olan 0,2 M sodyum fosfat tamponu elde edilmiştir.

10 mM Na-EDTA hazırlanışı: 0,372 g Na-EDTA 100 ml ddH₂O içinde çözülmüştür (Kahverengi şişede hazırlanmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir).

100 mM L-methionin hazırlanışı: 0,745 g L-methionin 50 ml 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.8) içinde çözülmüştür (Kahverengi şişede hazırlanmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir).

1 mM NBT hazırlanışı : 0,008 g NBT 10 ml ddH₂O içinde çözülmüştür (Kahverengi şişede hazırlanmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir).

0,2 mM Riboflavin hazırlanışı: 0,008 g Riboflavin 100 ml ddH₂O içinde çözülmüştür. Filtre edildikten sonra kullanılmıştır (Kahverengi şişede hazırlanmıştır ve 4°C’de muhafaza edilmiştir).

Çizelge 2.5.SOD enzim aktivite deneyinin yapılışı

	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Kör	Kontrol
Reaksiyon karışımı	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Enzim ekstraktı	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	-	-
Ekstraksiyon tamponu (pH7.0)	150 µl	100 µl	50 µl	-	200 µl	200 µl
Toplam	3.2 ml	3.2 ml	3.2 ml	3.2 ml	3.2 ml	3.2 ml

2.2.3.10.Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesi Bergmeyer (1970) metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0,1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH7.0) ve %3 H₂O₂ içermektedir. Reaksiyon karışımı ve ekstrakte edilen örnekler quartz küvetlere eklenmiştir(en son hidrojen peroksit eklenmiştir) (Çizelge 2.6.). Reaksiyon boyunca 240 nm absorbansta oluşan azalma 30 saniye aralıklarla 180 saniye boyunca takip edilmiştir. 240 nm’de H₂O₂ ekstinsiyon katsayısı 40 mM⁻¹ cm⁻¹’ dir. CAT aktivitesi nmol mg⁻¹ protein min⁻¹olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 2.6.CAT enzim aktivite deneyinin yapılışı

	Örnek	Kör
0,1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0)	2.77 ml	2.77 ml
Enzim ekstraktı	200 µl	200 µl
%3 H ₂ O ₂	30 µl	-
ddH ₂ O	-	30 µl
Toplam	3 ml	3 ml

0.1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) hazırlanışı: Stok solusyon A'dan 39 ml, stok solusyon B'den ise 61 ml alınmıştır. Hazırlanan 0,2 M sodyum fosfat tamponundan (pH 7.0) 25 ml alınmış ve 0,003 g EDTA eklendikten sonra ddH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%3 H₂O₂ hazırlanışı: %31'lik H₂O₂'den 9,7 ml alınarak 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2.2.3.11. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat Peroksidaz enzim aktivitesi Nakano ve Asada (1981) metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0,1 M EDTA, 0,5 mM askorbik asit ve 0,1 mM H₂O₂ içermektedir. Reaksiyon karışımı ve 100 µl enzim ekstraktı (en son hidrojen peroksit eklenmiştir) quartz küvetlere eklenmiş (Çizelge 2.7.), 290 nm'de 30 saniye aralıklarla 180 boyunca yapılan absorbans ölçümleri ile okside askorbat konsantrasyonu hesaplanmıştır. Askorbantın 290 nm'de ekstinsiyon katsayısı 2.8 mM⁻¹cm⁻¹'dir. Askorbat peroksidaz aktivitesi nmol mg⁻¹ protein min⁻¹ olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 2.7. APX enzim aktivitesi deneyinin yapılışı

	Örnek	Kör
0.05 M Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0)	600 µl	700 µl
Enzim ekstraktı	100 µl	-
5 mM askorbik asit	100 µl	100 µl
1mM H ₂ O ₂	100 µl	100 µl
1 mM EDTA	100 µl	100 µl
Toplam	1 ml	1 ml

0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH7.0) hazırlanışı: Stok solüsyon A'dan 39 ml, stok solüsyon B'den ise 61 ml alınmıştır. Hazırlanan 0,2 M Sodyum fosfat tamponundan (pH7.0) tamponundan 25 ml alınmış ve ddH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1 mM EDTA hazırlanışı: 0,0292 g EDTA 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

5 mM askorbik asit hazırlanışı: 0,088 g askorbik asit 100 ml 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içinde çözölmüştür.

1 mM H₂O₂ hazırlanışı: 9,88 µl H₂O₂ 0,05 M Na-P tamponu (pH7.0) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2.2.3.12. Guaiacol peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.7) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Guaiacol Peroksidaz enzim aktivitesi Nakano ve Asada (1981) ile Scebba vd. (2001)'in metodlarının modifiye edilmesi sonucu optimize edilmiştir. Reaksiyon için gerekli solüsyonlar eklendikten sonra enzim ekstraktı da eklenmiş (en son hidrojen peroksit eklenmiştir) (Çizelge 2.8.) ve 470 nm'de 30 saniye aralıklarla 180 saniye boyunca absorbanstaki artışlar gözlenmiştir. Guaiacolün 470 nm'de ekstinsiyon katsayısı 26,6 mM⁻¹cm⁻¹'dir. Guaiacol peroksidaz aktivitesi nmol mg⁻¹ protein min⁻¹ olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 2.8.GPX enzim aktivite deneyinin yapılışı

	Örnek	Kör
0,05 M Sodyum fosfat tamponu (pH6.0)	2695 µl	2705 µl
Enzim ekstraktı	10 µl	-
250 mM guaiacol	150 µl	150 µl
100 mM H ₂ O ₂	145 µl	145 µl
Toplam	3 ml	3 ml

0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) hazırlanışı: Stok solusyon A'dan 87,7 ml, stok solusyon B'den ise 12,3 ml alınmıştır. Hazırlanan 0,2 M sodyum fosfat tamponundan (pH 6.0) 25 ml alınmış ve ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

250 mM guaiacol hazırlanışı: 1,398 ml guaiacol 50 ml ddH₂O içinde çözülmüştür.

100 mM H₂O₂ hazırlanışı: %31'lik H₂O₂'den 494 µl alınarak ddH₂O ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

2.2.3.13.Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

Yapraklarda meydana gelen lipid peroksidasyon derecesi için, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçülmektedir. Malondialdehit miktarları Madhava Rao ve Sresty (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0,5 g dondurulmuş yaprak örnekleri 5 ml %0,1 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) içeren ekstraksiyon tamponu içinde parçalandıktan sonra 10000 x g'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan 1 ml alınarak tüplere aktarılmış ve üzerine 4 ml %20 TCA içinde hazırlanmış % 0,5 tiyobar-bütirik asit(TBA) eklenmiştir. Tüpler 95 °C'de 30 dak. inkübe edilmiş ve hemen ardından 4 °C'ye (buz banyosuna) alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra tüpler 15 dak. 10000 x g'de tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatantlar yeni tüplere aktararak 532 ve 600 nm'de absorban değerleri okunmuştur. Malondialdehit konsantrasyonu ekstinsiyon katsayısı 155 mM⁻¹cm⁻¹ olarak hesaplanmış ve µmol MDA g⁻¹ yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir [MDA µmol g⁻¹ yaş ağırlık= (A532 - A600) x Ekstrakt hacmi (ml) / (155 mM⁻¹cm⁻¹ / örnek miktarı (mg))]. Kör olarak %20 TCA içinde hazırlanmış %0,5 TBA kullanılmıştır.

2.2.3.14.Prolin miktarının belirlenmesi

Serbest prolin içeriği Bates vd. (1973)'in yöntemine göre belirlenmiştir. 0,5 g yaprak örnekleri 10 ml %3'lük (w/v) sülfosalisilik asitte 4 °C'de homojenize edilmiş ve homojenat Whatman No.2 filtre kağıdından süzölmüştür. Deney tüplerinde 2 ml filtre edilen örnek, 2 ml asit-ninhidrin ve 2 ml glasiyal asetik asit eklenerek vorteks edilmiş ve tüpler 1 saat 100 °C'de inkübe edilmiştir.

Reaksiyon 4 °C'ye (buz banyosuna) alınarak sonlandırılmış ve karışıma 4 ml tolüen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen tolüen fraksiyonunun 520 nm'de absorbanans değerleri ölçülmüştür. Prolin standart eğrisi (10 mM-0,1µM konsantrasyonları arasında) kullanılarak µg prolin ml⁻¹ bulunmuş ve formülde yerine konularak [Prolin µmol g⁻¹ yaş ağırlık= (µg prolin ml⁻¹ x ml tolüen) / 115.5 µg/µmol⁻¹ / (örnek (g) / 5) hesaplanmıştır. Prolin miktarı µmol g⁻¹ yaş ağırlık olarak ifade edilmiştir. Kör olarak tolüen kullanılmıştır.

Asit-ninhidrin hazırlanışı: 1,25 g ninhidrin 30 ml glasiyal asetik ve 20 ml 6 M ortofosforik asit içinde çözülene kadar hafifçe ısıtılarak karıştırılmıştır (4°C'de muhafaza edilir ve 24 saat içinde kullanılmalıdır).

2.2.3.15.Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Uygulamalara ait yaprak örnekleri (yaklaşık 0,8 g) 300 µl soğuk olan ekstraksiyon tamponu [1 mM Na-EDTA ve % 2 PVP içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH7.0)] içinde havan ve tokmak yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra tüplere aktarılan bitki özütleri 4 °C'de 13000 x g'de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yeni tüplere aktarılan süpernatantlar kullanılarak örneklerin protein miktarları Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği Bollag ve Edelstein (1991) yöntemi modifiye edilerek şu şekilde yapılmıştır:

1. Hazırlanan alt jel pipet yardımıyla hızlı bir şekilde elektroforez plakaları arasına boşaltılmış ve üzerine hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla n-butanol konularak 30 dakika polimerize olması için bekletilmiştir.
2. Alt jel polimerize olduktan sonra n-butanol dökülmüştür ve distile su ile jelden tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Hemen ardından pipet yardımıyla hava kabarcığı olmayacak şekilde üst jel dökülerek elektroforez targaı cam plakalar arasına yerleştirilmiştir. Üst jelin de polimerize olması amacıyla 30 dakika daha bekletilmiştir.
3. Bradford analizi ile protein konsantrasyonları hesaplanan örnekler yaklaşık 35 - 40 µg protein içerecek şekilde 1,5 ml santrifüj tüplerine konulmuş ve üzerlerine 3-5 µl 6X yükleme boyası eklenmiş ve ddH₂O ile tüm örnekler 15 µl'ye tamamlanmıştır.

Tüplerin ağzı sıkı bir şekilde parafilm ile kapatıldıktan sonra 100°C'de 5 dak. kaynatılmıştır.

4. Süre sonunda tarak jel içerisinde dikkatlice alınmış ve elektroforez plakaları içerisinde 1X elektroforez tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

5. Kaynayan sudan çıkarılan örnekler buza konulmuş ve yavaş bir şekilde tarakların oluşturduğu kuyulara yüklenmiştir. Örnekler Bio-Rad Mini Protean marka dikey jel elektroforez sisteminde 180 voltta (400 mA) 120 dakika yürütülmüştür.

6. 120 dakika sonunda jel, elektroforez plaklarından çıkarılmış ve 10 dakika destaining solüsyonu içinde bekletilmiştir. Daha sonra staining solüsyonuna (1g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 ml asetik asit ve 450 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır) aktarılmış ve 60 dakika bekletilmiştir.

7. Staining solusyonundan çıkarılan jel tekrar destaining solusyonuna konulmuş ve 10 dakika daha bekletilmiştir.

8. Vilber Lourmat marka UV/White Light transilüminatör kullanılarak beyaz ışıktaki görüntüleme yapılmış ve fotoğraf makinesi yardımıyla jelin fotoğrafı çekilmiştir.

9. Jel fiksatif çözelti içinde saklanmıştır.

Alt jel (seperating gel): 4,3 ml ddH₂O, 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 100 µl %10 SDS, 3 ml %40 Akrilamid-bisakrilamid, 100 µl %10 APS ve 5 ml n,n,n',n'-tetramethylenediamine (TEMED) sırasıyla eklenerek hazırlanmıştır.

Üst jel (stacking gel): 2,670 ml ddH₂O, 1,25 ml Tris (1,5 M, pH 6.8), 50 µl %10 SDS, 1,004 ml %40 Akrilamid-bisakrilamid, 25 µl %10 APS ve 2,5 µl TEMED eklenmiş ve iyice karışması sağlanmıştır.

% 40 Akrilamid-bisakrilamid solüsyonunun (19:1) hazırlanışı: 19 g akrilamid ve 1g bisakrilamid tartılarak 30 ml ddH₂O içinde çözülmüş ve pH 7.0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra ddH₂O ile son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti 0,45 µM pora sahip membran filtereden geçirildikten sonra koyu renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.

%10 Amonyum Persülfat (APS) hazırlanışı: 1 g amonyum persülfat 10 ml ddH₂O içinde çözülmüş ve 4°C'de saklanmıştır.

1,5 M Tris çözeltisi hazırlanışı: 181,71 g Tris 1 litre ddH₂O içinde çözülmüş ve pH 8,8 olarak ayarlanmıştır.

0,5 M Tris çözeltisi hazırlanışı: 60,57 g Tris 1 litre ddH₂O içinde çözülmüş ve pH 6,8 olarak ayarlanmıştır.

%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) hazırlanışı: 10 g SDS 100 ml ddH₂O içinde çözülmüştür.

6X Yükleme boyası: 7 ml 0,5 M Tris (pH 6.8), 3 ml gliserol, 1 g SDS, 0,93 g DTT ve 1,2 mg bromfenol mavisi eklenerek karıştırılmıştır.

10 X Elektroforez tamponu: 30,2 g Tris, 144 g glisin ve 10 g SDS 1 litre ddH₂O içinde çözülmüş ve pH 8,3 olarak ayarlanmıştır.

Destaining solüsyonu: Asetik asit (10) : metanol (25): ddH₂O (65) belirlenen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir.

Fiksatif çözelti: Metanol (50) : asetik asit (10) : ddH₂O (40) belirlenen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir.

2.2.3.16.Yaprak, kök ve çiçek salkımında ICP-OES ile bor miktarı tayini

Bitkilerin yaprak, kök ve çiçek salkımı (çiçek, tohum ve meyve) kısımları ayrılarak kurutma kağıtları üzerinde 70-80°C'de 12-15 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruyan örnekler toz haline gelene kadar öğütülmüştür. 0,5-0,2 g arası tartılan örnekler 30 ml'lik cam erlenlere koyulmuştur. Üzerlerine 15 ml aqua regia çözeltisi eklenmiş ve erlenlerin ağzları kapatılarak 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün mikrodalga yakma ünitesine (Berghof MWS-3, Almanya) örnekler aktarılmış ve erlende kalan örnek kalıntıları 5 ml daha aqua regia eklenerek çalkalanmış ve örneklerin üzerine eklenmiştir. 100°C'de 15 dak., 120°C'de 60 dak. ve 140°C'de 30 dak. yakılan örneklerin üzerine 10 ml soğuk 0,25 M HNO₃ koyulmuştur. Daha sonra örnekler Whatman No:2 kullanılarak süzümüştür. Yaklaşık 25 ml civarında olan örnekler 0,25 M HNO₃ ile son hacim 30 ml olacak şekilde tamamlanmıştır (Radojevic vd., 1999).

Uygulamalara ait hazırlanan örnekler Perkin Elmer Optima 2000 ICP-OES cihazında okutulmuş ve sonuçlar formül [(Bor konsantrasyonu (mg kg^{-1} kuru ağırlık) = $C \times V/M$] kullanılarak hesaplanmıştır [C: okuma değeri (ekstrakt içindeki bor konsantrasyonu $\mu\text{g ml}^{-1}$), V: ekstraktın son hacmi, M: örnek miktarı (g)].

Aqua regia çözeltisinin hazırlanışı: 120 ml distile su üzerine 130 ml konsantre HCl asit eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltinin 150 ml'si üzerine 50 ml HNO_3 ekleyerek karıştırılmış ve aqua regia çözeltisi elde edilmiştir.

2.2.3.17. Biyokimyasal verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Analizlerden elde edilen sayısal değerler, ANOVA tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemliliği ortaya koyulmuştur. Bunun için Duncan çoklu aralık testi yapılmış ve farklılık dereceleri $P < 0,05$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Bu amaçla SAS Institute (SPSS ver 20.0) paket programından yararlanılmıştır. Grafiklerin çiziminde Statistica7 yazılımı kullanılmış olup grafiklerde standart hata değerleri ($\pm$) gösterilmiştir.

2.2.4. Moleküler analizler için kullanılan yöntemler

2.2.4.1. Moleküler analizler için bitkilerin yetiştirilmesi ve uygulamaların yapılması

Hidroponik ortamda yetiştirilen 4 haftalık (28 günlük) *Arabidopsis thaliana* bitkileri iki farklı borik asit (50 ve 100 ppm) ve/veya EBL (0.01 ve 1 μM) konsantrasyonu içeren sıvı MGRL (Fujiwara vd., 1992) besin ortamlarına aktarılmış ve 60 saat süreyle bu ortamda inkübe edilmiştir. 60. saatin sonunda uygulamalara ait örneklerin yaprak (5. ve 6. yaprak) ve kök kısımları ayrılarak 1,5 ml plastik tüplere aktarılmış ve RNA izolasyonuna kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Moleküler analizler için yetiştirilen bitkilere yapılan uygulamalar çizelge 2.9.'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9.Dört haftalık Arabidopsis bitkilerine moleküler analizler için 60 saat süreyle yapılan uygulamalar

Uygulamalar	Borik asit (ppm)	EBL (µM)
Kontrol	-	-
EBL 1	-	0.01
EBL 2	-	1.0
BA 1	50	-
BA 1 + EBL 1	50	0.01
BA 1 + EBL 2	50	1.0
BA 2	100	-
BA 2 + EBL 1	100	0.01
BA 2 + EBL 2	100	1.0

2.2.4.2.Yaprak ve kök örneklerinden RNA izolasyonu

Yaprak ve kök örneklerinde RNA izolasyonu bitki RNA izolasyon kiti (Zymo Research-R2024, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan kit protokolü şu şekildedir: 100-150 mg civarında yaprak ve kök örnekleri sıvı nitrojen yardımıyla havanda iyice ezildikten sonra 800 µl RNA lizis solüsyonu eklenmiş, pipet yardımıyla ZR Bashing Bead Lysis Tube'e transfer edilmiş ve 4°C'de 14000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir. 400 µl süpernatant içinde Zymo-Spin IIC Column bulunan tüpe aktarıldıktan sonra 4°C'de 7000 rpm'de 30 san.santrifüj edilmiştir. Üstteki column atılmış, tüpe geçen kısmın üzerine 0,8 hacim etanol (%95-100) eklenmiştir. Bu karışım içinde Zymo-Spin IIC Column bulunan tüpe aktarılmış ve 4°C'de 14000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda Column'dan geçerek tüpe geçen kısım atılmıştır. Zymo-Spin IIC Column yeni bir tüpün içine yerleştirilmiş ve Column üzerine 400 µl RNA Prep Buffer eklendikten sonra 4°C'de 14000 rpm'de 1 dak. santrifüjlenmiştir.

Column içinden tüpe geçen kısım tekrar atılmış ve Zymo-Spin IIC Column tekrar yeni bir tüpün içine yerleştirilmiştir. Column üzerine 800 µl RNA Wash Buffer eklenmiş ve 4°C’de 14000 rpm’de 30 san. santrifüjlenmiştir. Column içinden tüpe geçen kısım atılmış ve column ile tüp tekrar birleştirildikten sonra 400 µl RNA Wash Buffer eklenerek bu basamak tekrar edilmiştir. Zymo-Spin IIC Column tekrar yeni bir tüp içine yerleştirilmiş ve 4°C’de 14000 rpm’de 2 dak. daha santrifüj edilerek tamamen Wash buffer’ın uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra Zymo-Spin IIC Column dikkatli bir şekilde nükleaz içermeyen yeni bir tüpe aktarılmış ve 25 µl ddH₂O dikkatli bir şekilde column ortasına gelecek şekilde yavaşça bırakıldıktan sonra 1 dakika beklenmiştir. Son olarak 4°C’de 12000 rpm’de 30 san. daha santrifüj edilerek RNA’nın columnndan tamamen inmesi sağlanmıştır. Yaprak ve kök dokularından izole edilen RNA örneklerinin A₂₆₀ ve A₂₈₀ nm’de spektrofotometrik ölçümleri (UV/VIS Optizen POP, Kore) kullanılarak miktarları [(RNA (µg ml⁻¹) = A₂₆₀ x sulandırma oranı x 40)] ve saflık oranları (A₂₆₀/A₂₈₀) tayin edilmiştir (Çizelge 2.10.). Bununla birlikte izole edilen RNA’ların kalitesi yatay jel elektroforez sisteminde %0.8’lik agaroz jelde 100 voltta (500 mA) 30 dakika yürütülerek belirlenmiştir (Thermo Yatay Elektroforez Jel, Almanya). Yaprak ve kök dokularından izole edilen RNA örneklerikomplementer DNA (cDNA) sentezine kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.10.Yaprak ve kök örneklerden izole edilen RNA'ların miktarları ve saflık oranları

Uygulamalar	A ₂₆₀		A ₂₈₀		µg / ml		Saflık oranları	
	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök
Kontrol	0,095	0,427	0,08	0,24	380	1708	1,19	1,78
EBL 1	0,1	0,314	0,078	0,182	400	1256	1,28	1,73
EBL 2	0,09	0,258	0,07	0,154	360	1032	1,29	1,68
BA 1	0,092	0,319	0,072	0,186	368	1276	1,28	1,72
BA 1 + EBL 1	0,091	0,254	0,071	0,152	364	1016	1,28	1,67
BA 1 + EBL 2	0,093	0,257	0,07	0,152	372	1028	1,33	1,69
BA 2	0,105	0,349	0,079	0,203	420	1396	1,33	1,72
BA 2 + EBL 1	0,095	0,323	0,072	0,186	380	1292	1,32	1,74
BA 2 + EBL 2	0,107	0,235	0,083	0,153	428	940	1,29	1,54

%0.8'lik agaroz jelin hazırlanışı ve örneklerin yüklenmesi: 100 ml 0,5X TBE tamponu içine 0,8 g agaroz eklendikten sonra mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Jel biraz soğuduktan sonra (50-60°C) 10 µl etidyum bromür (EtBr) (10 mg ml⁻¹) ilave edilmiştir. Hazırlanan jel hemen sonra daha önceden tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine hava kabarcığı olmayacak şekilde dökülmeye çalışılmıştır. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak 3 µl RNA örneği ve 2 µl 6X yükleme boyası olmak üzere kuyucuklara toplam 5 µl yükleme yapılmıştır. Marker olarak 1 kb DNA (Thermo #SM0311) ladder ve elektroforez tankında tampon olarak ise 0,5X TBE solüsyonu kullanılmıştır.

5XTBE hazırlanışı: 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) eklenmiş ve son hacim 1 litreye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır. 0,5X olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

6X yükleme boyasının hazırlanışı: 25 mg bromofenol mavisi, 25 mg ksilen siyanol FF ve 3 ml gliserol eklenerek son hacim ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

RT-PCR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere *Arabidopsis thaliana* yapraklarından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu basamakları şu şekildedir (Edwards vd., 1991): yaklaşık 100 mg yaprak örnekleri havan ve tokmak yardımıyla sıvı nitrojende iyice ezildikten sonra örneklerin üzerine 400 µl Edward buffer [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 20 mM EDTA, % 0,5 sodyum dodesil sülfat (SDS)] eklenmiştir. Örnekler yaklaşık 3 dak. vorteks edildikten sonra 13000 rpm'de 2 dak. santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası süpernatanttan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve DNA'nın çökmesini sağlamak amacıyla 300 µl soğuk isopropanol eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildikten sonra 13000 rpm'de 5 dak. tekrar santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant atılarak pellet kurumaya bırakılmış ve kuruyan pellet 100 µl ddH₂O içinde çözülmüştür.

2.2.4.3.DNaz I uygulaması

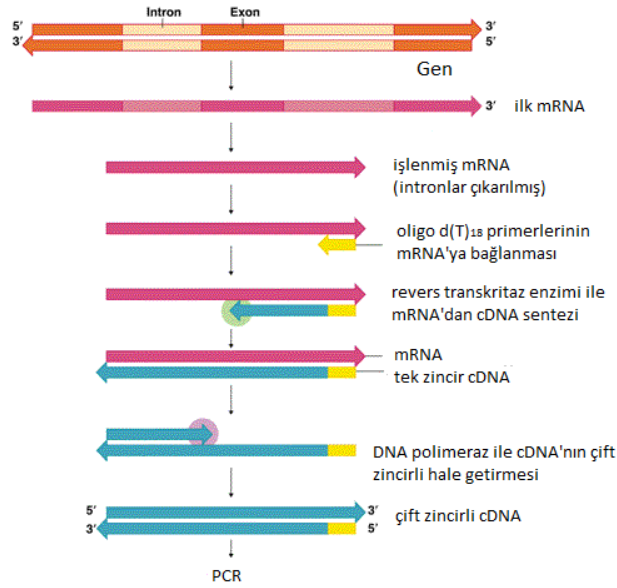
Genomik DNA kontaminasyonun elimine edilmesi amacıyla izole edilen tüm RNA örneklerine DNaz I (Thermo #EN0521) uygulaması yapılmıştır. cDNA sentezi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu 2,4 µg RNA kullanılmasına karar verilmiştir. Öncelikle 2,4 µg RNA örneği için kaç µl örnek kullanılacağı hesaplanmıştır. Hesaplanan RNA miktarı (µl), 1µl 10X reaksiyon tamponu ve 2,4 µl DNaz I enzimi eklendikten sonra son hacim nükleaz içermeyen ddH₂O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlana tüpler 37°C'de 30 dak. inkübe edilmiş ve daha sonra bütün tüplere 1 µl 50 mM EDTA eklenmiştir. Son olarak 65°C'de 10 dak. süreyle inkübe edilen tüpler buz içerisine koyularak reaksiyonun sonlandırılması sağlanmıştır.

2.2.4.4.Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Genlerde exon ve intron bölgeleri bulunmaktadır. Exon bölgeleri kodlama yapan yani proteinleri ifade eden bölgeler iken, intronlar kodlama yapmayan bölgelerdir.

Hücrede transkripsiyon sonucu genler (hem intron hem exon bölgeleri) mRNA'ya çevrilir ve bu mRNA'ya öncü mRNA (pre mRNA) ismi verilir. Transkripsiyon sonrası ökaryotik mRNA'ların işlenmesi olayı gerçekleşmektedir. 5' ucuna cap, 3' ucuna poli A kuyruğunun takılması, intronların çıkarılıp exonların uç uca birleşmesinden sonra olgun yani işlenmiş mRNA'lar meydana gelir (Şekil 2.4.).

Bitki örneklerinden öncelikle total RNA (tRNA, mRNA ve rRNA) izole edilmektedir. Daha sonra mRNA'da bulunan poli Adenin kuyruğuna oligo d(T)₁₈ primerlerinin bağlanması sağlanarak izole edilen total RNA içerisinde mRNA'nın ayrılması sağlanır. RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından PCR aşamasından önce RNA reverse transcriptase (ters transkriptaz) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından elde edilen cDNA örnekleri PCR ile çoğaltılmaktadır. Bu sentez aşaması Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.4. mRNA'nın işlenmesi ve cDNA sentezi

DNaz I uygulamasını takiben cDNA sentezi gerçekleştirilmeden önce optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 1, 3 ve 5 µg RNA kullanılarak cDNA sentez edilmiş ve sonuçlar RT-PCR ile kontrol edilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre 5 µg RNA kullanılarak elde edilen cDNA örnekleri çalışmamıştır.

Bununla birlikte 1 µg RNA'ya göre 3 µg RNA örneklerinden elde edilen bantların daha net olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulamalara ait yaprak ve kök örneklerinin RNA miktarları göz önüne alınarak fazla kullanılacak RNA miktarının 2,4 µg olduğu tespit edilmiş ve tüm örneklerden 2,4 µg RNA kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Thermo RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Thermo #K1629) kullanılarak yapılan cDNA sentezlerinde öncelikle DNaz I uygulaması yapılan örneklerle (11 µl) 1 µl oligo d(T)₁₈ primer eklemiştir. Tüpler vorteks edildikten sonra 65°C'de 5 dak. inkübe edilmiş ve hemen ardından buz içine koyularak soğumaları sağlanmıştır. Daha sonra tüplere 4 µl 5X Reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNaz inhibitörü (20 u/µl), 2 µl dNTP mix (10 mM) ve 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptaz (200 u/µl) eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler kısa süre vorteks edildikten sonra 42°C'de 60 dak. ve ardından 70°C'de 5 dak. inkübe edilmiştir. cDNA sentezi gerçekleştirilen örneklerle 180 µl ddH₂O eklenerek 1/10 oranında seyreltilmeleris Sağlanmıştır. cDNA sentezi gerçekleştirilirken yaprak ve kök örneklerinden bağımsız bir tüp negatif kontrol olarak hazırlanmıştır. Sadece RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptaz enzimi eklenmeden hazırlanan tüpe diğer tüm prosedürler uygulanmıştır.

2.2.4.5. Genler ve primer dizaynı

Tez çalışmasında kullanılacak genleri belirlemek amacıyla *Arabidopsis thaliana*'da bor ve BR ile ilgili yapılan mikroarray ve transkriptom çalışmalarının verileri değerlendirilmiştir (Dhaubhadel vd., 1999; Takano vd., 2002; Kreps vd., 2002; Goda vd., 2002; Mussig ve Altmann, 2003; Goda vd., 2004; Kasajima ve Fujiwara, 2007; Miwa vd., 2006b; Miwa vd., 2007; Miwa vd., 2013; Parker ve Boron, 2013). Belirlenen genler şu şekilde sıralanabilir:

- 1- *A. thaliana*'da tanımlanan bor taşıyıcılarını kodlayan genler[At2g47160 (*BOR1*), At3g62270 (*BOR2*), At3g06450 (*BOR3*), At1g15460 (*BOR4*), At1g74810 (*BOR5*)],
- 2- Yüksek bor konsantrasyonu altında ekspresyonu teşvik edilengenler [At2g04050 (Multidrug and toxic compound extrusion(MATE) transporter ve At5g51440 (Heat shock protein (Hsp)-like)],
- 3- Bor toksisitesinin bitkide oluşturduğu en belirgin semptomlardan birisi de kök ve gövde büyümesinde azalmaya neden olmasıdır. Bu kapsamda farklı borik asit konsantrasyonları altında yetiştirilen bitkilerde BR'ler tarafından ekspresyonları teşvik ettiği belirlenen hücre bölünmesi, uzaması ve hücre duvarı sentezinden sorumlu bazı genler [At4g34160 (*CycD3;1*), At5g57560 (*TCH4*) ve At5g49720 (*KOR*)],
- 4- BR'ler tarafından teşvik edilen stres ile ilgili bazı genler [At3g12580 (*Hsp70-4*) ve At5g52640 (*Hsp90-1*)]
- 5- Tuz, kuraklık ve osmotik stres koşulları altında ekspresyonu teşvik edilen genlerin [At5g52310 (Low Temperature-Induced Protein 78 (*LTI/COR78*) ve At5g06760 Late-Embryogenesis Abundant 4-5 (*LEA4-5*)] borik asit ve/veya EBL uygulamalarına olan cevapları birlikte yaprak ve kök dokularında transkripsiyonel seviyede araştırılmıştır.

Kontrol geni olarak Actin2 seçilmiştir. Kontrol geni olarak Actin2 seçilmesinin nedeni hücrede ekspresyonunun hiçbir koşulda değişmiyor olmasıdır. Çizelge 2.11.'de belirlenen aday lokus numaraları ve genlerin isimleri, primer sekansları, cDNA uzunlukları ve referansları verilmiştir. Belirlenen genlerin primer sekans dizileri literatürlerde belirtilmemiş ise Primer3 yazılımı (<http://frodo.wi.mit.edu/>) kullanılarak dizayn edilmiştir. Liyofilize şekilde temin edilen primerler oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüjlenmiştir. Primer stok konsantrasyon 100 pmol μl^{-1} olacak şekilde hesaplanmış ve tüplere ddH₂O eklenmiştir. Primerler daha sonra 37°C'de 5 dak. inkübe edilerek pelletin çözülmesi sağlanmıştır. RT-PCR reaksiyonu için kullanılacak konsantrasyonun 10 pmol μl^{-1} olması nedeniyle stok konsanstrasyondan 1/10 oranında seyreltme yapılmıştır

Çizelge 2.11. Belirlenen aday genlerin isimleri, primer sekansları ve cDNA uzunlukları

Lokus Numarası	Gen Fonksiyonu	Primer sekansları (5'----3')	cDNA uzunluğu (bp)	Referanslar
At2g47160	<i>BOR1</i> (Boron transporter 1)	F-AATCTCGCAGCGGAAACG R-TGGAGTCGAACTTGAACCTGTC	141	Takano vd., 2002
At3g62270	<i>BOR2</i> (Putative boron transporter 2)	F-CATCTCGCAGTACCGGAAGCT R-AGCCTTGGACTCATCTCACCT	218	Miwa vd., 2013
At3g06450	<i>BOR3</i> (Putative boron transporter 3)	F-CATTCAATCTCAAACCGGAAGG R-TTCAAGCTGCTCACTTTCTCTTA	121	Miwa vd., 2006b
At1g15460	<i>BOR4</i> (Boron transporter 4)	F-GGAACTGTCTTTCCGGTCGAA R-CTTGGGATAAATCTGGTTGCCT	148	Miwa vd., 2007
At1g74810	<i>BOR5</i> (Boron transporter 5)	F-GAACTGTCTTTCAGGTCGAA R-CCTTTGTCTTCGTTATGACCG	128	Parker ve Boron, 2013
At2g04050	Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter	F-CGTTTCCGGGTTTCAGTATTT R-CAGGGTCTTGACCGAGAGAG	200	Kasajima ve Fujiwara, 2007
At5g51440	Heat shock protein-like (<i>Hsp-like</i>)	F-TCAAACCGACATGTTTCTCG R-TCACGTTCCAACCACGTCTA	178	Kasajima ve Fujiwara, 2007

Çizelge 2.11. (devam)

At4g34160	Cell division (<i>CycD3;1</i>)	F-TCGTTGAACAGTCCAAGCTG R-TGCAAAATCGGCTTCTTCTT	182	Mussig ve Altmann, 2003
At5g57560	Xyloglucan Endotransglycosylase(<i>TCH4</i>)	F-CAAGAACATGGAGTCTCTAGGCAC R-GTGAAAGGAGCTTTAGACCAATCG	135	Goda vd., 2002; Goda vd., 2004
At5g49720	Endo-1,4-beta-D-glucanase (<i>KOR</i>)	F-GTCCAACGGAGCAGAAGAAG R-TTGGCAATTTCCAGATTTTC	240	Goda vd., 2002; Goda vd., 2004
At3g12580	Heat shock protein 70-4 (<i>Hsp70-4</i>)	F-GGAAAGTTCGAGCTCAGTGG R-ACCTTCCCTTGTCGTTTGTG	160	Dhaubhadel vd., 1999
At5g52640	Heat shock protein 90-1 (<i>Hsp90-1</i>)	F-AAACGCTCTCGAAGTTCCAA R-TGAGCTCACGGAGGAAGATT	198	Dhaubhadel vd., 1999
At5g52310	Low Temperature-Induced Protein 78 (<i>LTI/COR78</i>)	F-GAACACTCCGGTCTCTCTGC R-CAATCTCCGGTACTCCTCCA	224	Kreps vd., 2002
At5g06760	Late-Embryogenesis Abundant 4-5 (<i>LEA4-5</i>)	F-AGGCGGAGAAGATGAAGACA R-CATCTGATGTGTCCCAGTGC	218	Kreps vd., 2002
At3g18780	Actin2	F-TGCCAATCTACGAGGGTTTC R-TTCTCGATGGAAGAGCTGGT	226	Kreps vd., 2002

2.2.4.6.Semi-quantitative-reverse transcriptase polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi

Öncelikle, kullanılacak olan primerler için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Primerlerin en net sonuçlar verdiği $MgCl_2$ miktarları tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, tüm primerler için ayrı ayrı 3 farklı $MgCl_2$ miktarı (3, 3,5 ve 4 μl) denenmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre At2g04050, At4g34160 ve At3g12580 genlerine ait primerler için 3 μl , At5g51440, At5g575760 ve At5g52640 genlerine ait primerler için 3,5 μl ve Actin2, At2g47160, At3g62270, At3g06450, At1g15460, At1g74810, At5g49720, At5g52310 ve At5g067060 genlerine ait primerler için ise 4 μl $MgCl_2$ kullanılması sonucu başarılı bulgular elde edilmiştir. Farklı $MgCl_2$ miktarları kullanılarak optimize edilen RT-PCR reaksiyonları çizelge 2.12.'de verilmiştir.

Çizelge 2.12. Primerlere göre optimize edilen $MgCl_2$ miktarları

RT-PCR reaksiyon bileşenleri	1 örnek için gerekli miktar		
cDNA	4 μl	4 μl	4 μl
10 X <i>Taq</i> tamponu (KCl içerikli)*	5 μl	5 μl	5 μl
dNTP mix (10 mM)*	1 μl	1 μl	1 μl
Forward primer (10 pmol/ μl)	1 μl	1 μl	1 μl
Reverse primer (10 pmol/ μl)	1 μl	1 μl	1 μl
$MgCl_2$ (25 mM)*	3 μl	3,5 μl	4 μl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5U/ μl)*	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
ddH ₂ O	34.5 μl	34 μl	33.5 μl
Toplam	50 μl	50 μl	50 μl

*:Çalışmada kullanılan *Taq* Polimeraz tamponu (KCl içerikli), $MgCl_2$ (25 mM), *Taq* DNA polimeraz (5U/ μl) (#EP0402) ve dNTP mix (10 mM) (#R0191) Thermo markadır.

Primerlerin T_m (melting temperature) sıcaklıkları göz önünde bulundurularak bağlanma sıcaklığı (annealing temperature) 50°C olarak optimize edilmiştir. Optimize edilen RT-PCR programı çizelge 2.13.'de verilmiştir.

Çizelge 2.13.RT-PCR programı

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94 ⁰ C	3 dakika	
94 ⁰ C	30 saniye	35 döngü
50 ⁰ C	30 saniye	
72 ⁰ C	45 saniye	
4 ⁰ C	∞	

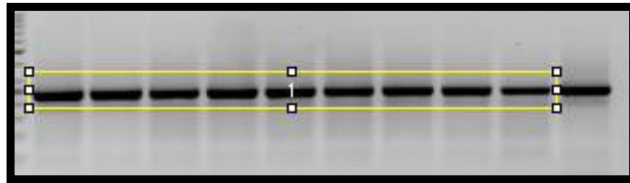
RT-PCR ürünleri yatay elektroforez sisteminde %2'lik (w/v) agaroz jelde, 120 voltta (500mA) 40 dakika yürütülmüştür. Jeller, Gel Capture yazılımı yardımıyla jel dokümentasyon sistemi (DNR MiniBIS Bio-Imaging Sysytems, İsrail) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Tüm jellerin aynı ayarlar altında fotoğraflarının çekilmesine dikkat edilmiştir. Tüm RT-PCR reaksiyonlarında pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır. Tüm PCR reaksiyonları Eppendorf Mastercycler Gradient marka cihazda gerçekleştirilmiştir.

%2'lik agaroz jel hazırlanışı ve örneklerin yüklenmesi: 100 ml 0,5X TBE tamponu içine 2 g agaroz eklendikten sonra mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Jel biraz soğuduktan sonra (50-60°C) 10 µl etidyum bromür (EtBr) (10 mg ml⁻¹) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım daha önceden tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine hava kabarcığı olmayacak şekilde dökülmüştür. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak 30 µl RNA örneği ve 6 µl 6X yükleme boyası olmak üzere kuyucuklara toplam 36 µl yükleme yapılmıştır. Jellere 1,5 µl 50 bp DNA (Thermo #SM1133) ladder yüklenmiştir. Elektroforez tankında tampon olarak 0,5X TBE kullanılmıştır.

2.2.4.7.Moleküler verilerin analizi

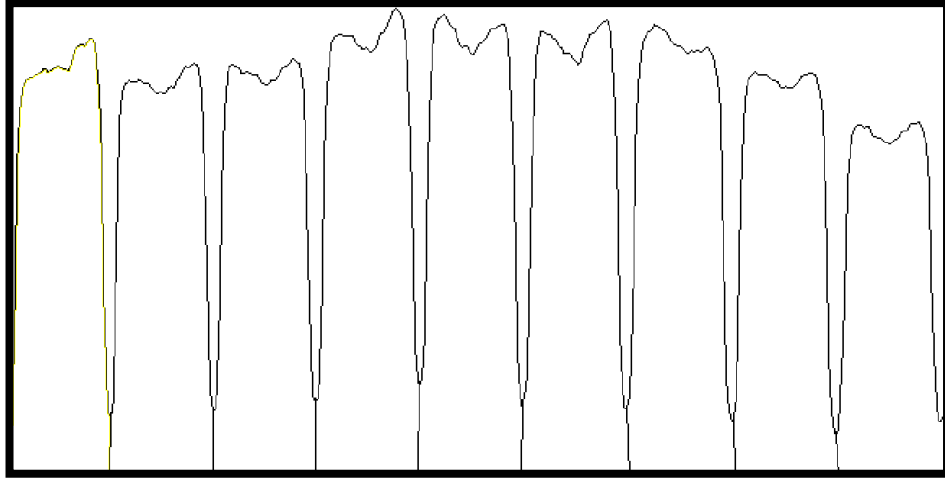
Tez çalışmasında 14 adet genin yaprak ve kök dokularına ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi amacıyla semi-quantitative-RT-PCR analizleri yapılmıştır. Her RT-PCR reaksiyonunda kontrol geni olan Actin2 tekrar edilmiştir. Yukarıda da belirtildiği üzere Actin2 geninin ekspresyonu hiçbir koşulda değişmemektedir ve Actin2 geni uygulamalara ait elde edilen her cDNA örneğinin kendi kontrolünü (internal control) oluşturmaktadır. Genlerin spesifik mRNA seviyeleri şu şekilde belirlenmiştir. PCR ürünleri EtBr içeren jellere yüklenip belirlenen sürede yürütüldükten sonra kamera ataçmalı görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra ImageJ ver 1.48 (National Institute of Mental Health, USA) yazılımı kullanılarak çekilen fotoğraflar üzerinden Actin2 ve genlerin bant yoğunlukları belirlenmiştir. Bant yoğunluklarının ölçümübir örnek üzerinden aşağıda açıklanmıştır.

1-İlk olarak ImageJ yazılımı kullanılarak uygulamalara ait Actin2 geninin bant yoğunluklarıölçülmüştür. Bunun için öncelikle yazılım kullanılarak fotoğrafın negatifi elde edilir ve ölçüm yapılacak bantlar çerçeve içine alınır (Şekil 2.5.). Çerçeve dışında kalan bant PCR reaksiyonunun çalışma durumunu gösteren pozitif kontroldür.



Şekil 2. 5.Jel fotoğrafının negatifi üzerinden optik yoğunlukları tespit edilecek bantların seçimi

2- Daha sonra yazılıma verilen analiz komutu yardımıyla seçilen dokuz banta ait optik yoğunlukları gösteren diyagram elde edilir (Şekil 2.6.). Piklerin yüksekliği bantların yoğunlukları ile orantılıdır.



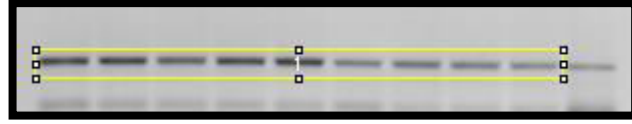
Şekil 2.6.Bantlara ait optik yoğunluk diyagramı

3- Yazılım yardımıyla diyagramdaki pikler tek tek seçilir ve yoğunlukları gösteren rakamlar elde edilir (Şekil 2.7.).

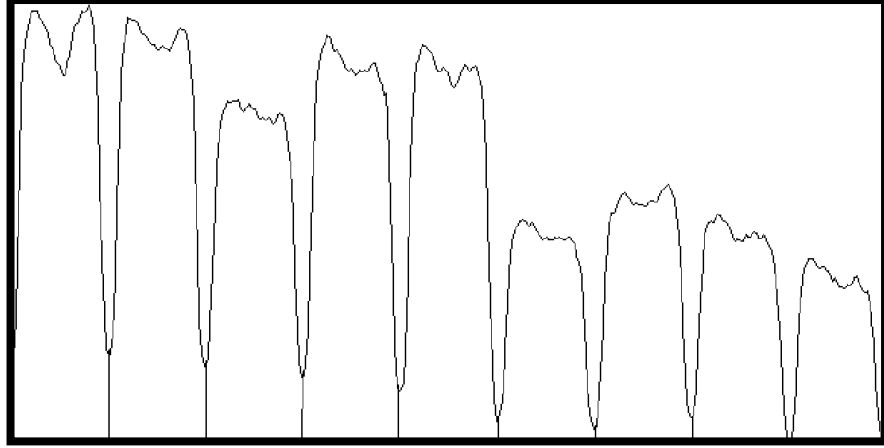
File Edit Font Results	
	Area
1	17594.719
2	17484.134
3	17412.426
4	19364.255
5	19272.497
6	18894.497
7	18955.376
8	16986.719
9	14910.255

Şekil 2.7.Diyagramdaki bantların optik yoğunluk sonuçları

4- Bütün işlemler diğer tüm genler için de yapılır. Örneğin At2g47160 (*BOR1*) geni için yapılan ölçüm ve sonuçlar şekil 2.8.'de verilmiştir.



(a)



(b)

File Edit Font Results		
	Area	
1	19062.205	
2	18441.083	
3	15214.376	
4	17212.497	
5	16893.619	
6	9190.255	
7	10766.255	
8	9457.083	
9	7101.134	

(c)

Şekil 2.8. *BOR1* genine ait farklı uygulamaların gen ekspresyon ölçümleri (a) Negatifi elde edilen jel fotoğrafında optik yoğunlukları tespit edilecek bantların seçimi, (b) Bantlara ait optik yoğunluk diyagramı, (c) Diyagramdaki dokuz bantın optik yoğunluk sonuçları

Ölçüm işlemleri tamamlandıktan sonra sonuçlar excel sayfasına aktarılmıştır. Gen ekspresyonları her örneğin mRNA seviyesininaynı örneğin Actin2 mRNA seviyesine bölünmesiyle ortaya çıkarılmıştır.

Örneğin At2g47160 geni için 1 nolu örnekte tespit edilen ekspresyon miktarı 19062.205 (Şekil 2.8c) ve aynı örneğin Actin2’de gösterdiği ekspresyon 17594.719’dur (Şekil 2.7.). At2g47160 geni için 1 nolu örneğe ait mRNA seviyesi At2g47160 (19062.2058) / Actin2 (17594.719) olarak hesaplanmıştır. Tüm uygulamalarda kontrol ortamında yetişen bitkilerde mRNA seviyesi 100 olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte kontrole göre yapılan uygulamalar sonucu meydana gelen gen ekspresyon değişimleri de (artma yada azalma oranları) hesaplanmıştır.

2.2.4.8. Moleküler verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Her gene ait RT-PCR reaksiyonu 4 ile 8 kez arasında tekrar edilmiştir. Ekspresyon değerleri aynı ekspresyon profilini gösteren 4 bağımsız tekrarın ortalamalarıdır. Gen ekspresyon değerleri ANOVA tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve Tukey HSD post hoc testi yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılık dereceleri $P < 0,05$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Bu amaçla SAS Institute (SPSS ver 20.0) paket programından yararlanılmıştır. Grafiklerin çiziminde Statistica7 yazılımı kullanılmış olup grafiklerde standart hata değerleri ($\pm$) gösterilmiştir.

3.BULGULAR

3.1.Borik Asit Konsantrasyonlarının Belirlenmesine İlişkin Yapılan Ön Çalışma Bulguları

Çalışma kapsamında uygulanacak borik asit konsantrasyonları ve uygulama süresini tespit etmek amacıyla ön denemeler kurulmuştur. Yirmisekiz günlük *Arabidopsis thaliana* bitkileri dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılmış (Şekil 3.1.), ortalama gövde yaş ve kuru ağırlığı (mg) ile kuru madde miktarları (%) belirlenmiştir (Çizelge 3.1. ve Şekil 3.2.). 4 günlük uygulama sonucunda 125 ppm borik asit içeren ortamlarda yetiştirilen birçok bitkide kuruma gözlenmesi nedeniyle bu uygulama örneklerinde ortalama gövde yaş ve kuru ağırlığı ile kuru madde miktarları saptanamamıştır. Kuruma gözlenmeyen bitkiler de toplam klorofil ve karotenoid analizlerinde kullanılmıştır.



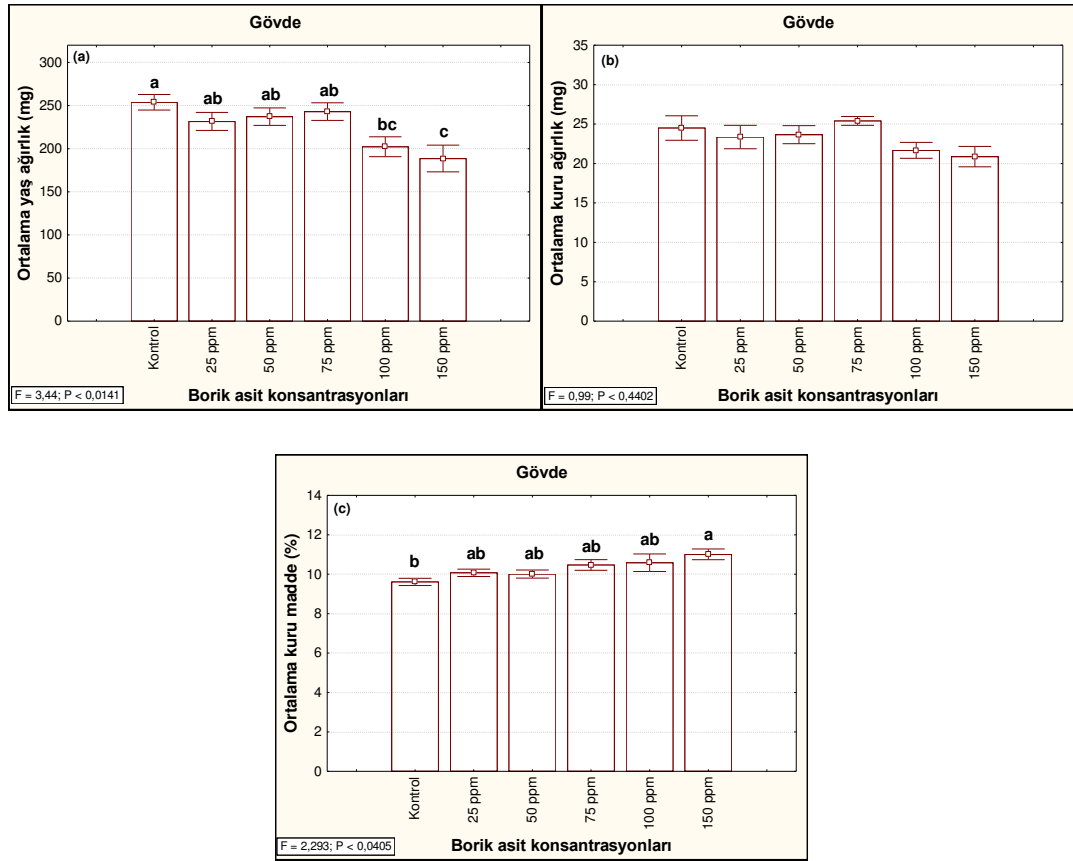
Şekil 3.1.Tohum ekiminden 28 gün sonra dört gün süreyle farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkileri (Bar=1 cm)

Çizelge 3.1. Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve kuru madde miktarları(%)

Borik asit uygulamaları (ppm)	Gövde		
	Ortalama yaşağırlık (mg)	Ortalama kuru ağırlık (mg)*	Ortalama kuru madde (%)
0 (Kontrol)	253,81 ± 9,49 a	24,50 ± 1,63	9,61 ± 0,19 b
25	231,67 ± 10,98 ab	23,35 ± 1,58	10,07 ± 0,19 ab
50	237,21 ± 10,66 ab	23,65 ± 1,20	10,01 ± 0,21 ab
75	243,06 ± 10,75 ab	25,40 ± 0,58	10,47 ± 0,28 ab
100	203,14 ± 13,97 bc	21,67 ± 1,06	10,58 ± 0,46 ab
150	190,59 ± 11,68 c	20,87 ± 1,39	11,01 ± 0,28 a

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

*Uygulamalar arasındaki fark istatistiki bakımdan önemli bulunmamıştır.



Şekil 3.2.Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (a), kuru ağırlık (b) ve % kuru madde miktarları (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

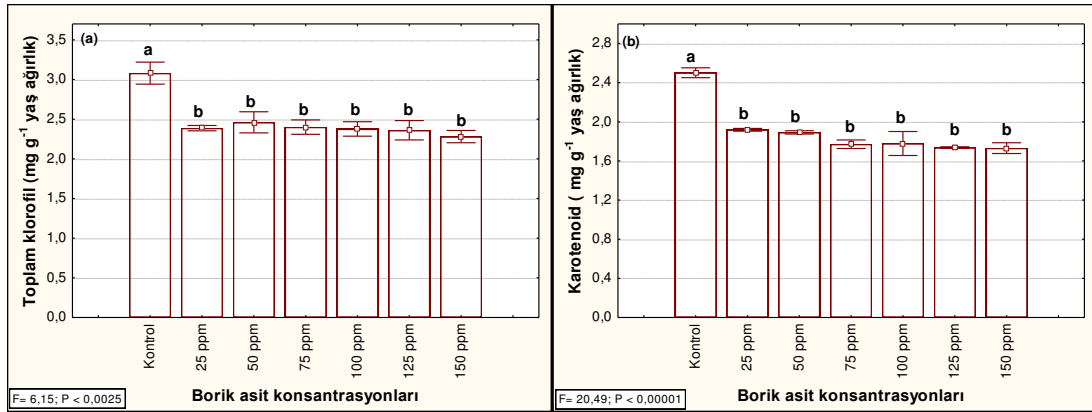
4 gün boyunca 7 farklı konsantrasyonda borik asit içeren besin ortamlarına maruz bırakılan bitkilerin ortalama gövde yaş ağırlık ve % kuru madde miktarları karşılaştırıldığında, kontrol ile diğer uygulamalar arasında istatistiki fark 100 ppm ve üstü borik asit uygulamalarında gözlenmeye başlanılmıştır.

Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları çizelge 3.2. ve şekil 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g⁻¹ yaş ağırlık)

Borik asit uygulamaları (ppm)	Toplam klorofil (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)	Karotenoid (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)
0 (Kontrol)	3,08 ± 0,14 a	2,50 ± 0,05 a
25	2,38 ± 0,03 b	1,91 ± 0,01 b
50	2,46 ± 0,14 b	1,89 ± 0,03 b
75	2,40 ± 0,09 b	1,77 ± 0,04 b
100	2,37 ± 0,09 b	1,77 ± 0,12 b
125	2,36 ± 0,12 b	1,73 ± 0,01 b
150	2,28 ± 0,08 b	1,73 ± 0,05 b

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.3.Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid miktarları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

Dört gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarlarındakontrolle göre bir azalma görülmüştür fakat borik asit konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığındaistatistiki açıdan bir fark gözlenmemiştir.

Yedi farklı borik asit konsantrasyonuna 8 gün boyunca maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin(Şekil 3.4.) ortalama gövde yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve kuru madde miktarları (%) şekil 3.5. ve çizelge 3.3.'de verilmiştir.8 günlük uygulama sonucunda 125 ve 150 ppm borik asit içeren ortamlarda yetiştirilen birçok bitkide kuruma gözlenmiştir. Kuruma gözlenmeyen bitkiler toplam klorofil ve karotenoid analizlerinde kullanılmıştır. Bu nedenle 125 ve 150 ppm borik asit içeren ortamda yetiştirilen bitkilerin ortalama gövde yaş, kuru ağırlık ve ortalama % kuru madde miktarları tespit edilememiştir.

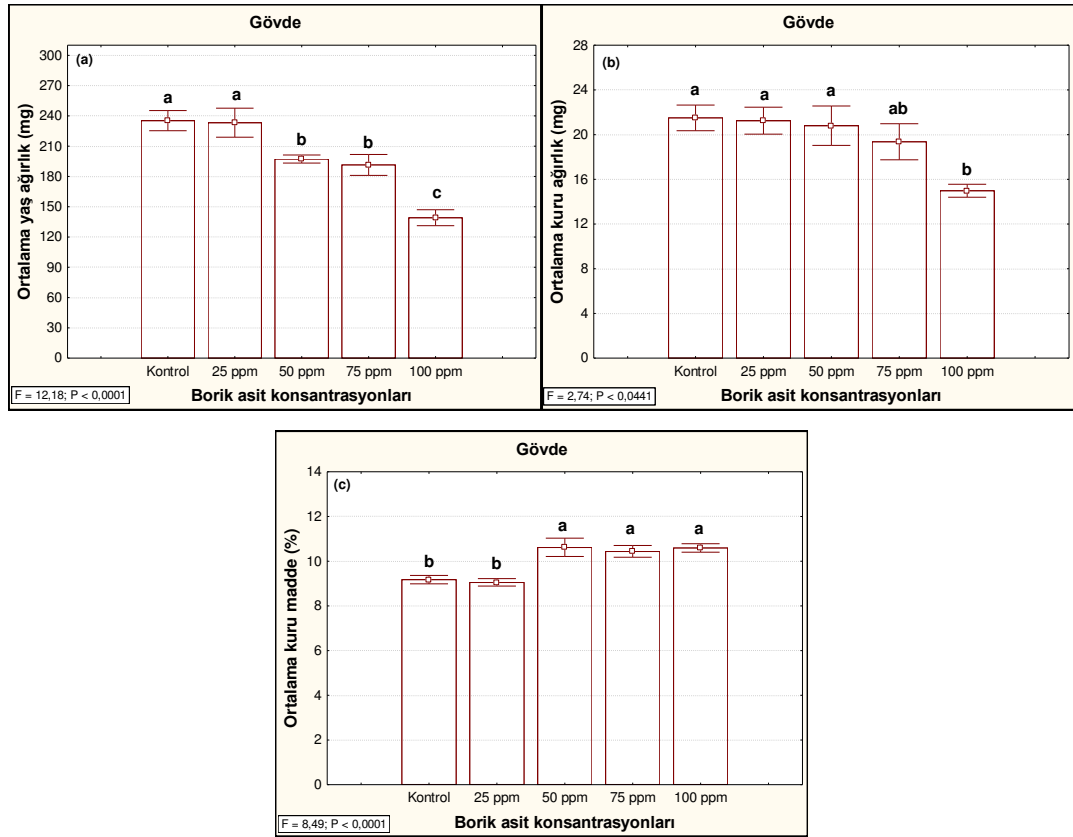


Şekil 3.4. Tohum ekimden 28 gün sonra sekiz gün süreyle farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkileri (Bar= 1cm)

Çizelge 3.3.Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve kuru madde miktarları (%)

Borik asit uygulamaları (ppm)	Gövde		
	Ortalama yaş ağırlık (mg)	Ortalama kuru ağırlık (mg)	Ortalama kuru madde (%)
0 (Kontrol)	235,30 ± 10,53 a	21,50 ± 1,20 a	9,17 ± 0,19 b
25	233,25 ± 15,12 a	21,25 ± 1,26 a	9,05 ± 0,17 b
50	197,25 ± 4,19 b	20,80 ± 1,85 a	10,62 ± 0,43 a
75	191,43 ± 10,89 b	19,36 ± 1,69 ab	10,44 ± 0,27 a
100	139,12 ± 8,30 c	14,98 ± 0,61 b	10,59 ± 0,19 a

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



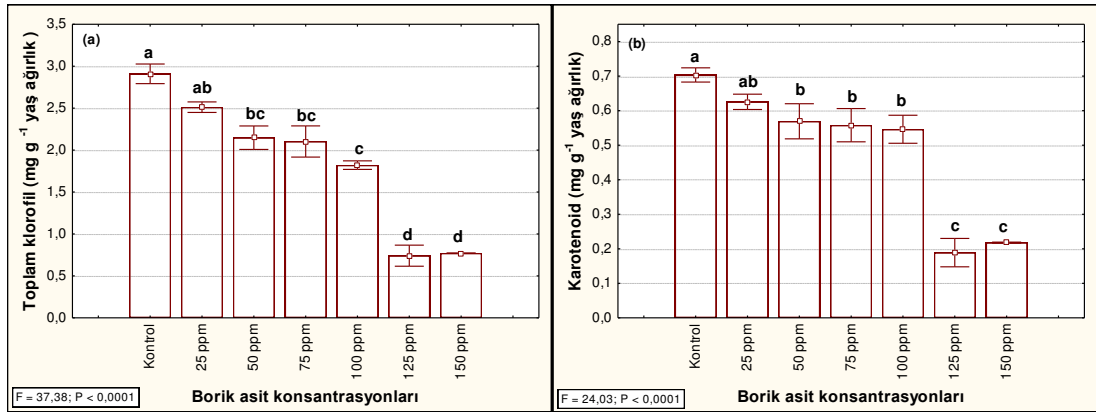
Şekil 35. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlık (a), kuru ağırlık (b) ve % kuru madde miktarları (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları çizelge 3.4. ve şekil 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.4. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g⁻¹ yaş ağırlık)

Borik asit uygulamaları (ppm)	Toplam klorofil (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)	Karotenoid (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)
0 (Kontrol)	2,90 ± 0,12 a	0,70 ± 0,02 a
25	2,51 ± 0,06 ab	0,62 ± 0,02 ab
50	2,14 ± 0,14 bc	0,56 ± 0,05 b
75	2,10 ± 0,19 bc	0,55 ± 0,05 b
100	1,82 ± 0,05 c	0,54 ± 0,04 b
125	0,74 ± 0,13 d	0,18 ± 0,04 c
150	0,77 ± 0,00 d	0,21 ± 0,00 c

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.6. Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid (b) miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05), ± standart hata değerleridir.

Sekiz gün boyunca farklı borik asit konsantrasyonlarına maruz bırakılan bitkilerin ortalama gövde yaş ağırlık, kuru ağırlık, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının borik asit konsantrasyonundaki artışa ters orantılı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ortalama % kuru maddede ise, kontrole göre istatistiki açıdan artış gözlenmiştir.

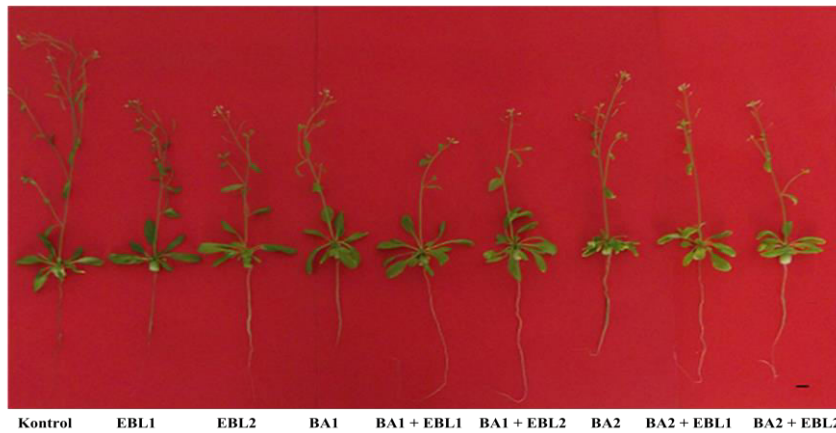
Araştırılan parametrelerde azalmaların özellikle 125 ve 150 ppm’de belirgin olması ve 8 gün sonunda analiz için çok az örnek kalması nedeniyle seçilen en yüksek doz 100 ppm olarak belirlenmiştir. Toksik etkinin görülmeye başlanıldığı en düşük doz ise 50 ppm olarak belirlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda uygulanacak borik asit konsantrasyonlarının 50 ve 100 ppm olmasına karar verilmiştir.

Yapılan gözlemler sonucu 4. günden başlayarak 50 ppm borik asit uygulamasından itibaren borun yarattığı semptomların (özellikle alt yapraklardan başlayarak yaprak uç ve kenarlarında sararma, bitki renginin daha açık yeşil renge dönüşmesi vb.) artan borik asit konsantrasyonuna paralel olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle biyokimyasal deneyler için ön borik asit uygulama süresi 4 gün olarak (EBL uygulamaları başlamadan önce) belirlenmiştir.

3.2. Biyokimyasal Araştırmaların Bulguları

3.2.1. Büyüme parametreleri

Yapılan 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları araştırılan büyüme parametrelerinde azalmalara neden olmuştur. Borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları ise gövde yaş ve kuru ağırlığında, meyve sayısı, boyu, ağırlığında ve yaprak alanı gibi büyüme parametrelerinde istatistiki bakımdan önemli artışlara neden olmuştur (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan 38 günlük *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin gelişim durumları (Bar = 1cm)

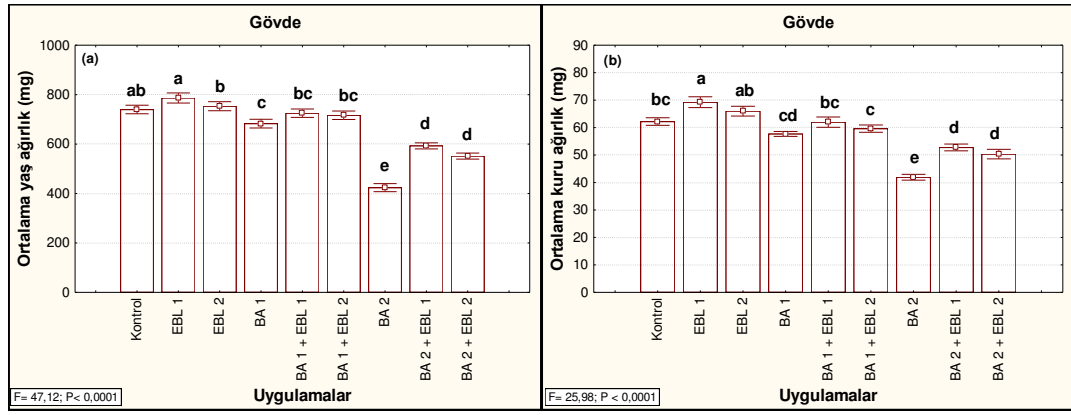
Yaş ve kuru ağırlık

Artan borik asit konsantrasyonları gövde yaş ve kuru ağırlıklarında azalmalara neden olmuştur. Bununla birlikte 100 ppm borik asit uygulaması kontrole göre gövde yaş ve kuru ağırlığında sırasıyla %42,7 ve %32,6 oranında düşüslere neden olmuştur. 50 ppm borik asit uygulaması ile birlikte yapılan EBL uygulamaları yaprak örneklerinin yaş ve kuru ağırlıklarını arttırarak kontrol sonuçlarına yaklaştırmıştır. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise yaş ve kuru ağırlıkları istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır (Çizelge 3.5.ve Şekil 3.8.).

Çizelge 3.5.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde yaş ağırlıkları (mg) ve kuru ağırlıkları (mg)

Uygulamalar	Gövde	
	Ortalama yaş ağırlık (mg)	Ortalama kuru ağırlık (mg)
Kontrol	740,00 ± 18,16 ab	62,21 ± 1,45 bc
EBL 1	786,57 ± 21,38 a	69,26 ± 2,07 a
EBL 2	753,33 ± 15,72 b	66,00 ± 1,87 ab
BA 1	682,85 ± 19,23 c	57,70 ± 0,94 cd
BA 1 + EBL 1	725,00 ± 17,84 bc	62,00 ± 1,97 bc
BA 1 + EBL 2	700,00 ± 13,41 bc	59,63 ± 1,40 c
BA 2	423,75 ± 17,10 e	41,93 ± 1,10 e
BA 2 + EBL 1	592,85 ± 13,04 d	52,78 ± 1,29 d
BA 2 + EBL 2	544,28 ± 13,94 d	50,35 ± 1,83 d

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



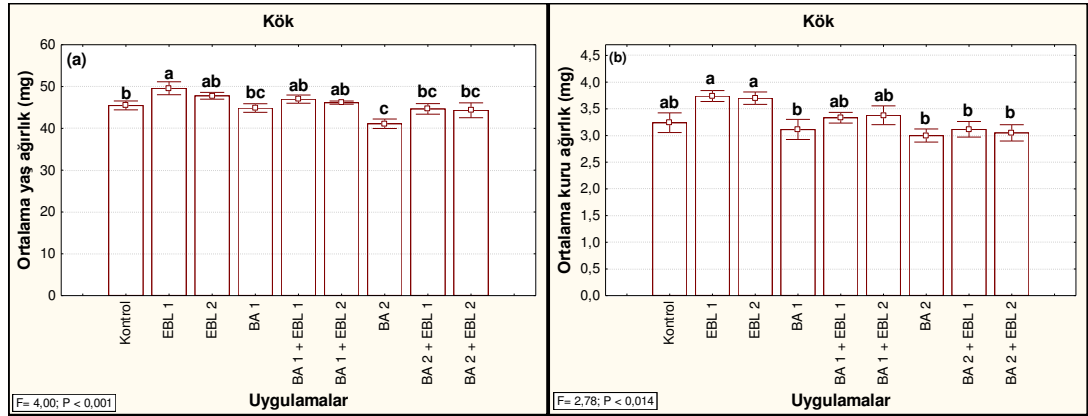
Şekil 3.8. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde yaş (a) ve kuru ağırlıkları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

Uygulamalara ait kök örneklerinin ortalama yaş ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrole nazaran 100 ppm borik asit uygulamasında istatistiki açıdan önemli bir azalma olmuştur. Ortalama kuru ağırlıklar karşılaştırıldığında ise 50 ve 100 ppm uygulamaları arasında istatistiki açıdan bir fark bulunmamıştır. Borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları kök örneklerinin yaş ve kuru ağırlıklarında artmalara neden olmuştur fakat bu artışlar istatistiki bakımdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 3.6. ve Şekil 3.9.).

Çizelge 3.6.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama kök yaş ağırlıkları (mg) ve kuru ağırlıkları (mg)

Uygulamalar	Kök	
	Ortalama yaş ağırlık (mg)	Ortalama kuru ağırlık (mg)
Kontrol	45,50 ± 1,11 b	3,24 ± 0,19 ab
EBL 1	49,60 ± 1,63 a	3,74 ± 0,10 a
EBL 2	47,80 ± 0,86 ab	3,70 ± 0,12 a
BA 1	44,87 ± 1,07 bc	3,11 ± 0,19 b
BA 1 + EBL 1	47,00 ± 1,03 ab	3,33 ± 0,10 ab
BA 1 + EBL 2	46,16 ± 0,90 ab	3,38 ± 0,18 ab
BA 2	41,11 ± 1,19 c	3,00 ± 0,12 b
BA 2 + EBL 1	44,66 ± 1,33 bc	3,11 ± 0,15 b
BA 2 + EBL 2	44,33 ± 1,87 bc	3,05 ± 0,16 b

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.9.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama kök yaş (a) ve kuru ağırlıkları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

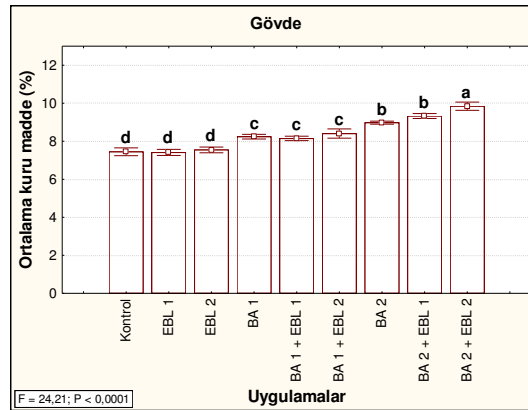
Kuru madde

Uygulamalara ait gövde örneklerinin ortalama % kuru madde miktarları karşılaştırıldığında kontrol, 0,01 μ M ve 1 μ M EBL uygulamaları istatistiki olarak bir grupta (d), 50 ppm borik asit ve 50 ppm borik asit + EBL uygulamaları farklı bir grupta (c) yer almıştır. 50 ppm borik asit uygulamasına EBL uygulamalarının etkisi istatistiki bakımdan önemli bulunmazken, 100 ppm borik asit uygulamasını takiben yapılan 1 μ M EBL uygulaması % kuru madde miktarını istatistiki açıdan da önemli olacak şekilde arttırmıştır (Çizelge 3.7.ve Şekil 3.10.). Beklenen sonucun aksine artan borik asit konsantrasyonlarına paralel olarak % kuru madde miktarı artmıştır. 38 günlük kültürün sonunda 50 ppm borik asit uygulamasında daha az olmakla birlikte özellikle 100 ppm borik asit uygulamalı birçok bitkinin alt yaprakta kuruma gözlenmiştir. Alt yapraklardan başlayan kuruma daha sonra üst yapraklara doğru devam etmiştir. Bu durumda 50 ve 100 ppm uygulamalarına ait bitkilerin gövde yaş ve kuru ağırlığı arasında fazla farkın olmaması (su kaybının fazla olmaması) % kuru madde miktarının yüksek çıkmasına neden olmuştur.

Çizelge 3.7. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde kuru madde miktarları (%)

Uygulamalar	Gövde
	Ortalama kuru madde (%)
Kontrol	7,44 ± 0,21 d
EBL 1	7,41 ± 0,16 d
EBL 2	7,54 ± 0,15 d
BA 1	8,24 ± 0,12 c
BA 1 + EBL 1	8,14 ± 0,12 c
BA 1 + EBL 2	8,40 ± 0,25 c
BA 2	8,98 ± 0,08 b
BA 2 + EBL 1	9,18 ± 0,18 b
BA 2 + EBL 2	10,04 ± 0,12 a

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



Şekil 3.10. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama gövde % kuru madde miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

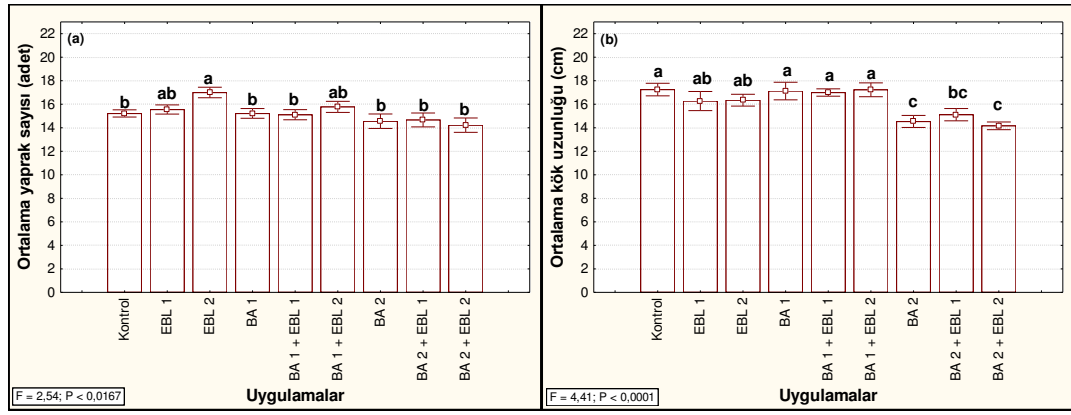
Yaprak sayısı ve kök boyu

Uygulamalara ait örneklerin ortalama yaprak sayıları karşılaştırıldığında kontrol ile 1µM EBL uygulaması arasında istatistiki bakımdan önemli bir fark gözlenirken, diğer uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmamıştır (Çizelge 3.8. ve Şekil 3.11a). Ortalama primer kök uzunlukları karşılaştırıldığında ise kontrol göre 100 ppm borik asit uygulamasında %15,7 oranında istatistiki bakımdan da önemli olan bir azalma olmuştur. Bununla birlikte borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları istatistiki bakımdan önemli bir fark yaratmamıştır (Çizelge 3.8. ve Şekil 3.11b).

Çizelge 3.8. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama yaprak sayıları (adet) ve kök uzunlukları (cm)

Uygulamalar	Ortalama yaprak sayısı (adet)	Ortalama kök uzunluğu (cm)
Kontrol	15,22 ± 0,32 b	17,25 ± 0,56 a
EBL 1	15,55 ± 0,41 ab	16,27 ± 0,85 ab
EBL 2	17,00 ± 0,47 a	16,34 ± 0,52 ab
BA 1	15,22 ± 0,43 b	17,12 ± 0,78 a
BA 1 + EBL 1	15,11 ± 0,45 b	17,00 ± 0,33 a
BA 1 + EBL 2	15,77 ± 0,49 b	17,23 ± 0,62 a
BA 2	14,55 ± 0,64 b	14,53 ± 0,53 c
BA 2 + EBL 1	14,66 ± 0,62 b	15,11 ± 0,54 bc
BA 2 + EBL 2	14,22 ± 0,64 b	14,16 ± 0,33 c

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.11. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin ortalama yaprak sayıları (a) ve kök uzunlukları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

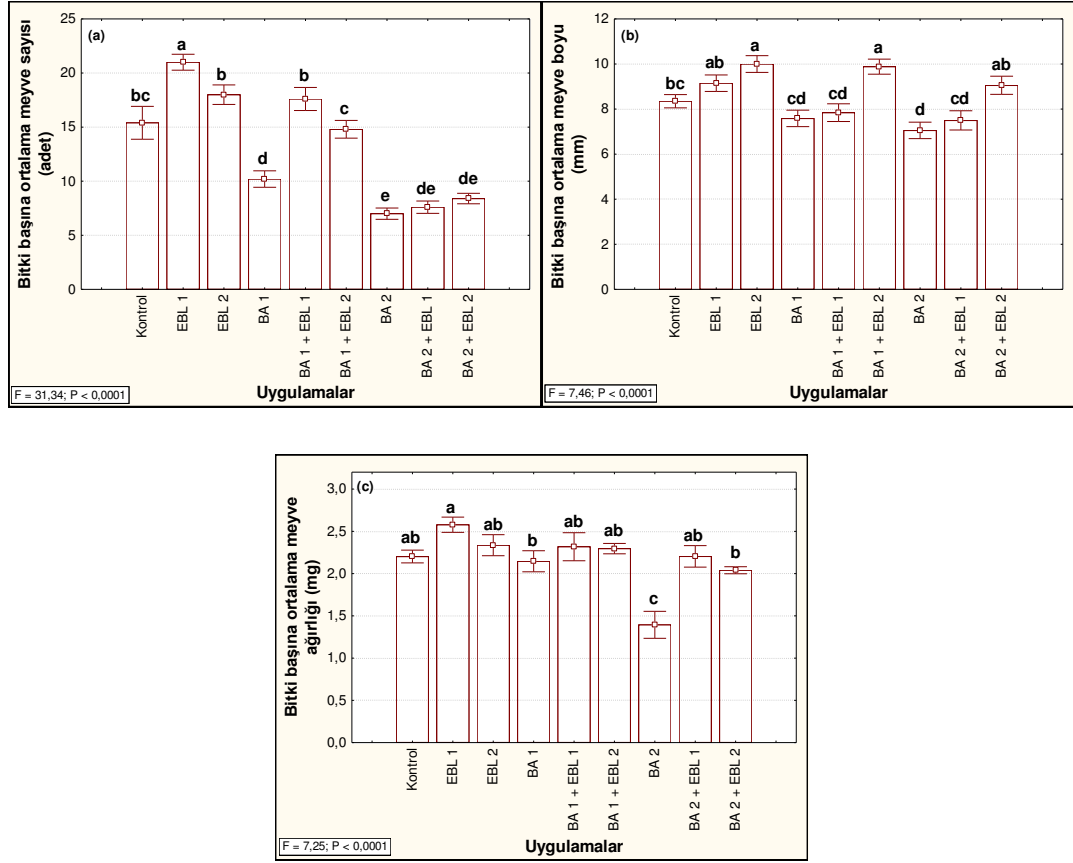
Meyve sayısı, boyu ve ağırlığı

50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları kontrole göre meyve sayısını sırasıyla %33,7 ve %54,5 oranlarında azaltmıştır. Tek başına yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması bitki başına ortalama meyve sayısını istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır. 50 ppm borik asit ve takiben yapılan EBL uygulamaları meyve sayısını istatistiki olarak önemli olacak şekilde arttırmıştır (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.12a). 50 ve 100 ppm uygulamaları, bitki başına ortalama meyve boyunda %9,2 ve %15,5 oranında azalmalar meydana getirmiştir. 1 μ M EBL uygulaması hem tek başına hem de 50 ppm ve 100 ppm borik asit uygulamalarıyla birlikte meyve boyunu istatistiki olarak önem arz edecek oranda arttırmıştır (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.12b). 100 ppm borik asit uygulaması kontrole nazaran bitki başına ortalama meyve ağırlığı %36,8 oranında azaltmıştır. 50 ve 100 ppm borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları belirgin derecede etki gösterip ortalama meyve ağırlığını kontrol sonuçlarına yaklaştırmıştır (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.12c).

Çizelge 3.9.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin bitki başına ortalama meyve sayısı (adet), meyve boyu (mm) ve meyve ağırlığı (mg)

Uygulamalar	Bitki başına ortalama meyve sayısı (adet)	Ortalama meyve boyu (mm)	Ortalama meyve ağırlığı (mg)
Kontrol	15,40 ± 1,60 bc	8,35 ± 0,31 bc	2,20 ± 0,07 ab
EBL 1	21,00 ± 0,77 a	9,15 ± 0,38 ab	2,57 ± 0,09 a
EBL 2	18,00 ± 0,94 b	10,0 ± 0,39 a	2,33 ± 0,13 ab
BA 1	10,20 ± 0,80 d	7,58 ± 0,38 cd	2,14 ± 0,13 b
BA 1 + EBL 1	17,60 ± 1,12 b	7,89 ± 0,40 cd	2,31 ± 0,17 ab
BA 1 + EBL 2	14,80 ± 0,86 c	9,88 ± 0,35 a	2,29 ± 0,06 ab
BA 2	7,00 ± 0,54 e	7,05 ± 0,38 d	1,39 ± 0,16 c
BA 2 + EBL 1	7,60 ± 0,60 de	7,51 ± 0,45 cd	2,20 ± 0,13 ab
BA 2 + EBL 2	8,40 ± 0,50 de	9,05 ± 0,42 ab	2,04 ± 0,04 b

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3. 12.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin bitki başına ortalama meyve sayısı (a), ortalama meyve boyu (b) ve ortalama meyve ağırlığı (c). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

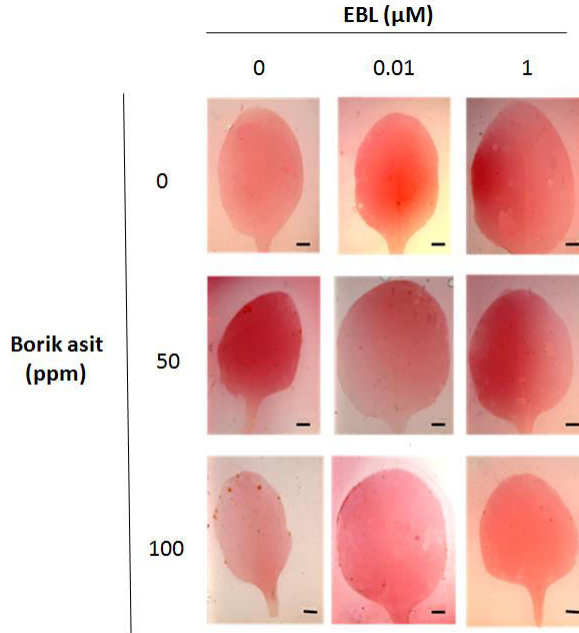
Yaprak alanı

Artan borik asit konsantrasyonları ile birlikte yaprak alanlarında %10,7 (50 ppm borik asit) ve %20,3 (100 ppm borik asit) oranlarında istatistiki bakımdan da önemli olacak şekilde azalmalar gözlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında 1 μ M EBL uygulaması yaprak alanını en çok arttıran uygulama olmuştur. Bununla birlikte her iki konsantrasyonda borik asit uygulamasını takiben yapılan EBL uygulamaları istatistiki önem arz edecek şekilde yaprak birim alanını arttırmış fakat 0,01 μ M EBL uygulaması yaprak alanının arttırılmasında 1 μ M EBL uygulamasına göre daha etkili olmuştur (Çizelge 3.10., Şekil 3.13. ve 3.14.).

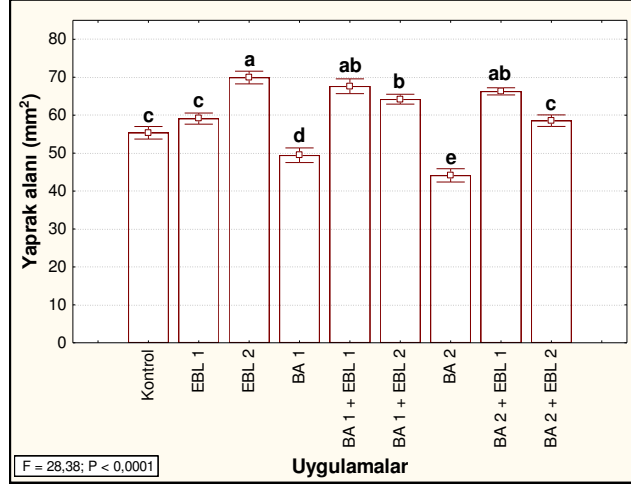
Çizelge 3. 10.Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde yaprak alanı (mm²) üzerine etkileri

Uygulamalar	Yaprak alanı (mm ²)
Kontrol	55,37 ± 1,74 c
EBL 1	59,10 ± 1,54 c
EBL 2	69,92 ± 1,76 a
BA 1	49,44 ± 2,03 d
BA 1 + EBL 1	67,63 ± 2,05 ab
BA 1 + EBL 2	64,22 ± 1,37 b
BA 2	44,13 ± 1,85 e
BA 2 + EBL 1	66,29 ± 0,99 ab
BA 2 + EBL 2	58,55 ± 1,59 c

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.13.Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde 5. ve 6. yaprak alanı üzerine etkileri (Bar = 1mm)



Şekil 3.14.Borik asit ve/veya EBL uygulamalarının *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde 5. ve 6. yaprak alanı üzerine etkileri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

3.2.2.Pigment içeriği

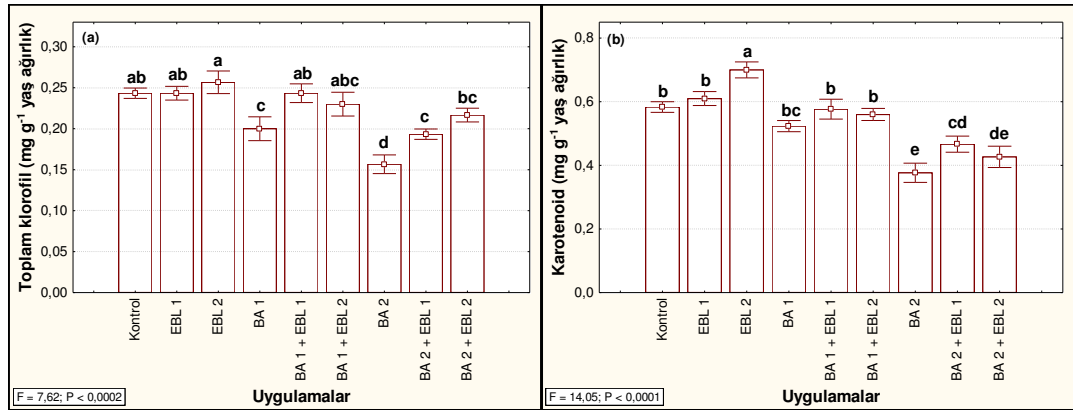
50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları total klorofil miktarlarını sırasıyla %16,6 ve %41,6 oranlarında azaltmıştır ve bu durum istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. 50 ppm borik asit uygulamasında 0,01 μ M EBL, 100 ppm borik asit uygulamasında ise 1 μ M EBL konsantrasyonu klorofil miktarını arttırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.11.ve Şekil 3.15a).

Uygulamalar arasında karotenoid miktarında en fazla artış tek başına yapılan 1 μ M EBL uygulamasında tespit edilirken, 100 ppm borik asit uygulaması kontrole göre önemli oranda (%36,2) azalmaya neden olmuştur. 100 ppm borik asit uygulamasını takiben yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması karotenoid miktarını istatistiki açıdan önemli oranda arttırmıştır (Çizelge 3.11.ve Şekil 3.15b).

Çizelge 3.11.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil ve karotenoid miktarları (mg g⁻¹ yaş ağırlık)

Uygulamalar	Toplam klorofil (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)	Karotenoid (mg g ⁻¹ yaş ağırlık)
Kontrol	0,24 ± 0,01 ab	0,58 ± 0,01 b
EBL 1	0,24 ± 0,02 ab	0,61 ± 0,02 b
EBL 2	0,25 ± 0,01 a	0,70 ± 0,02 a
BA 1	0,20 ± 0,01 c	0,52 ± 0,01 bc
BA 1 + EBL 1	0,24 ± 0,12 ab	0,57 ± 0,03 b
BA 1 + EBL 2	0,23 ± 0,15 abc	0,56 ± 0,02 b
BA 2	0,14 ± 0,12 d	0,37 ± 0,03 e
BA 2 + EBL 1	0,19 ± 0,01 c	0,46 ± 0,02 cd
BA 2 + EBL 2	0,21 ± 0,01 bc	0,42 ± 0,03 de

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



Şekil 3.15.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin toplam klorofil (a) ve karotenoid (b) miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

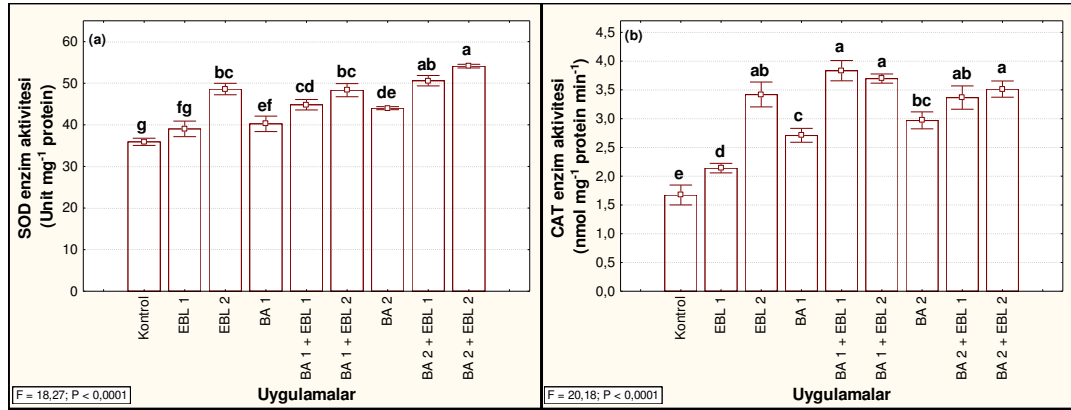
3.3.3.Antioksidatif sistem

50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları SOD enzim aktivitesini kontrole göre sırasıyla %12 ve %22,5 oranlarında arttırmıştır. Tek başına yapılan 1 μ M EBL uygulaması ise enzim aktivitesinin kontrole göre %33,8 oranında artmasını sağlamıştır. Bununla birlikte borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları SOD aktivitesini artan EBL konsantrasyonuna paralel olarak istatistiki bakımdan önemli olacak oranda arttırmıştır (Çizelge 3.12.ve Şekil 3.16a). Tek başına yapılan EBL uygulamaları (0,01 ve 1 μ M) istatistiki bakımdan önemli olacak (sırasıyla %27,5 ve %104,1) şekilde CAT enzim aktivitesini arttırmıştır. 50 ppm borik asit uygulaması enzim aktivitesini kontrole göre %61,6 oranında arttırırken borik asit uygulamasını takiben yapılan 0,01 ve 1 μ M EBL uygulamalarının aktiviteyi sırasıyla %129,3 ve %120,9 oranlarında arttırdığı saptanmıştır. 100 ppm borik asit uygulamasını takiben yapılan 1 μ M EBL uygulamasının (%110,1) 0,01 μ M EBL uygulamasına (%101,2) göre CAT enzim aktivitesini arttırmada daha da etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.12.ve Şekil 3.16b).

Çizelge 3.12.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD (unit mg⁻¹ protein) ve CAT enzim aktiviteleri (nmol mg⁻¹ protein min⁻¹)

Uygulamalar	SOD (unit mg ⁻¹ protein)	CAT (nmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹)
Kontrol	35,91 ± 0,90 g	1,67 ± 0,18 e
EBL 1	39,02 ± 1,97 fg	2,13 ± 0,87 d
EBL 2	48,06 ± 1,44 bc	3,41 ± 0,22 ab
BA 1	40,24 ± 1,95 ef	2,70 ± 0,12 c
BA 1 + EBL 1	44,83 ± 1,32 cd	3,83 ± 0,08 a
BA 1 + EBL 2	48,33 ± 1,66 bc	3,69 ± 0,08 a
BA 2	44,01 ± 0,38 de	2,97 ± 0,15 bc
BA 2 + EBL 1	50,01 ± 1,31 ab	3,36 ± 0,21 ab
BA 2 + EBL 2	54,11 ± 0,46 a	3,51 ± 0,14 a

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).



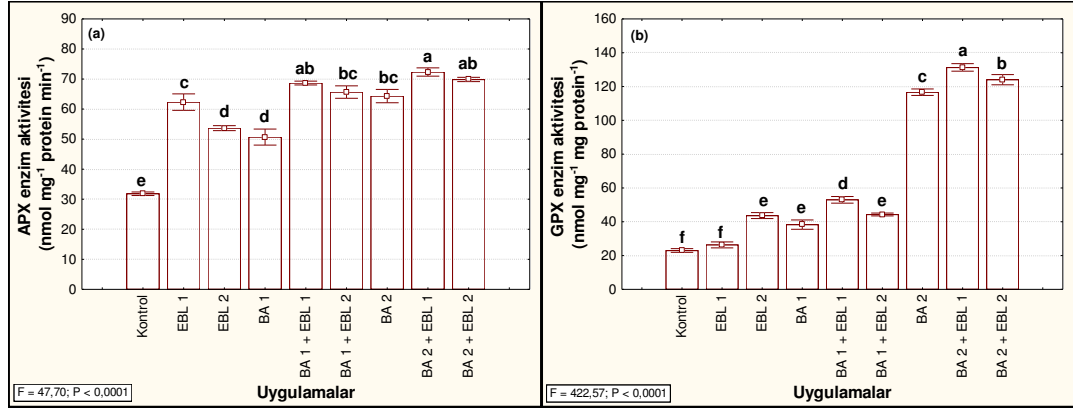
Şekil 3.16.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD (a) ve CAT (b) enzim aktiviteleri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

Uygulama yapılan bitkilerin APX enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, 0,01 μM EBL uygulamasının tek başına ya da 50 veya 100 ppm borik uygulamalarını takiben uygulandığında 1 μM EBL uygulamalarına göre aktiviteyi arttırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.17., Şekil 3.13a). GPX aktiviteleri karşılaştırıldığında ise tek başına yapılan 1 μM EBL uygulaması enzim aktivitesini istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır. 50 ppm borik asit uygulamasını takiben yapılan 0,01 μM EBL uygulaması GPX enzim aktivitesinde istatistiki açıdan önem arz edecek bir artış meydana getirirken, 100 ppm borik asit uygulamasında her iki EBL uygulamasında enzim aktivitesini önemli oranda arttırmıştır (Çizelge 3.17. ve Şekil 3.13b).

Çizelge 3.13.Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin APX ($\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$) ve GPX enzim aktiviteleri ($\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$)

Uygulamalar	APX ($\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$)	GPX ($\text{nmol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$)
Kontrol	31,83 $\pm$ 0,61 e	23,01 $\pm$ 1,15 f
EBL 1	62,32 $\pm$ 2,87 c	26,30 $\pm$ 1,85 f
EBL 2	53,66 $\pm$ 0,88 d	43,69 $\pm$ 1,87 e
BA 1	50,69 $\pm$ 2,81 d	38,05 $\pm$ 2,90 e
BA 1 + EBL 1	68,66 $\pm$ 0,66 ab	53,56 $\pm$ 2,08 d
BA 1 + EBL 2	65,66 $\pm$ 2,18 bc	44,34 $\pm$ 0,88 e
BA 2	64,33 $\pm$ 2,33 bc	116,23 $\pm$ 2,02 c
BA 2 + EBL 1	72,33 $\pm$ 1,45 a	131,04 $\pm$ 2,22 a
BA 2 + EBL 2	69,86 $\pm$ 0,75 ab	124,06 $\pm$ 3,16 b

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



Şekil 3.17. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin APX (a) ve GPX (b) enzim aktiviteleri. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

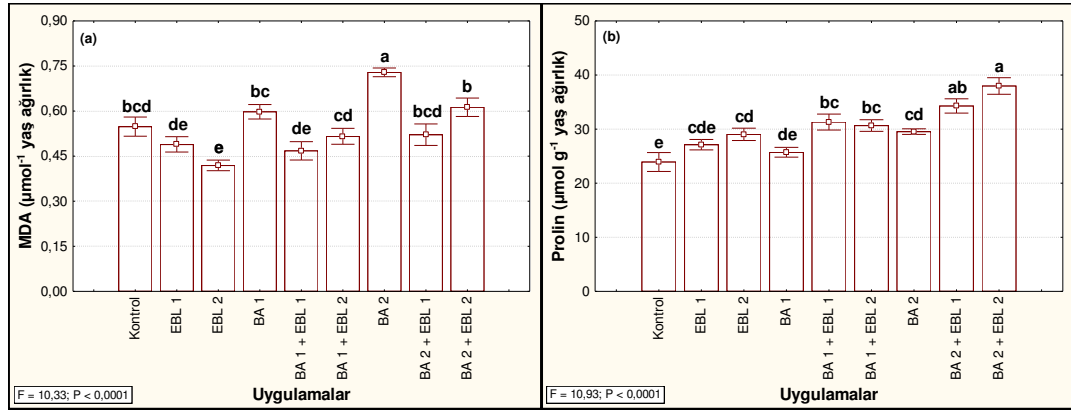
Uygulamalara ait yaprak örneklerinin lipid peroksidasyon miktarları karşılaştırıldığında 1 μ M EBL uygulaması MDA içeriğini kontrole göre istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde azaltmıştır. 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları MDA miktarlarını sırasıyla %9,2 ve %33,3 oranlarında arttırmıştır. Borik asit uygulamalarını takiben yapılan EBL uygulamaları ise MDA içeriğinde istatistiki bakımdan önemli azalmalara neden olmuştur (Çizelge 3.14.ve Şekil 3.18a).

1 μ M EBL uygulaması kontrole nazaran prolin miktarını %21,4 oranında arttırmış ve bu oran istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. Bununla birlikte kontrole nazaran 50 ve 100 ppm borik asit uygulamalarının prolin miktarlarında sırasıyla %7,5 ve %23,4 oranlarında artmameydana getirdiği tespit edilmiştir. Borik asit uygulamalarını takiben yapılan iki farklı konsantrasyonda EBL uygulamaları benzer şekilde prolin miktarlarını arttırmış ve bu artışlar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Çizelge 3.14.ve Şekil 3.18b).

Çizelge 3.14. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ yaş ağırlık) ve prolin miktarları ($\mu\text{mol g}^{-1}$ yaş ağırlık)

Uygulamalar	MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ yaş ağırlık)	Prolin ($\mu\text{mol g}^{-1}$ yaş ağırlık)
Kontrol	0,54 $\pm$ 0,03 bcd	23,92 $\pm$ 1,83 e
EBL 1	0,48 $\pm$ 0,02 de	27,12 $\pm$ 1,01 cde
EBL 2	0,41 $\pm$ 0,01 e	29,04 $\pm$ 1,20 cd
BA 1	0,59 $\pm$ 0,02 bc	25,72 $\pm$ 0,95 de
BA 1 + EBL 1	0,46 $\pm$ 0,02 de	31,31 $\pm$ 1,55 bc
BA 1 + EBL 2	0,51 $\pm$ 0,02 cd	30,66 $\pm$ 1,13 bc
BA 2	0,72 $\pm$ 0,01 a	29,54 $\pm$ 0,51 cd
BA 2 + EBL 1	0,52 $\pm$ 0,03 bcd	34,28 $\pm$ 1,39 ab
BA 2 + EBL 2	0,61 $\pm$ 0,03 b	37,97 $\pm$ 1,61 a

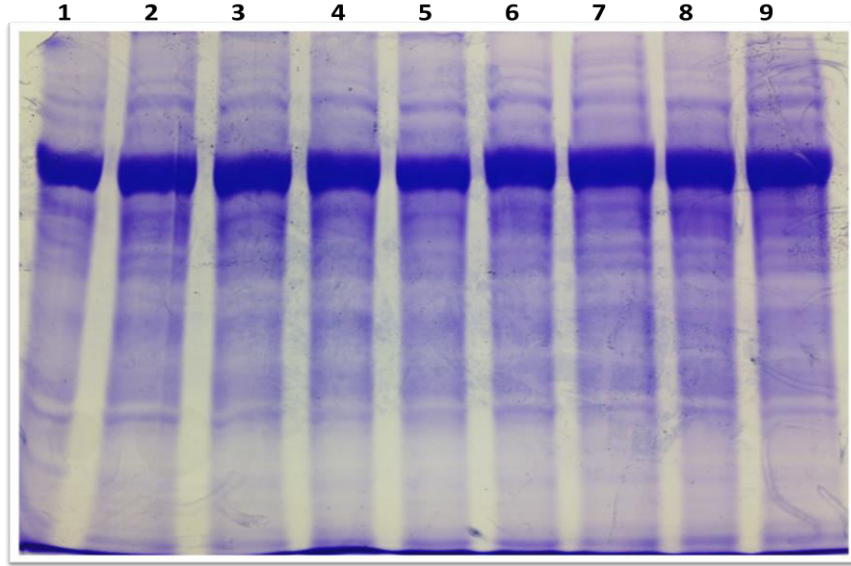
Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



Şekil 3.18. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin MDA (a) ve prolin miktarları (b). Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

3.2.4. SDS-PAGE analizi

SDS-PAGE jel görüntüsü incelenmiş ve uygulamalara ait protein profilleri arasında belirgin bir bant farklılığına rastlanmamıştır (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak dokularına ait SDS-PAGE görüntüsü 1: Kontrol, 2: 0,01 μ M EBL, 3: 1 μ M EBL, 4: 50 ppm borik asit, 5: 50 ppm borik asit + 0,01 μ M EBL, 6: 50 ppm borik asit + 1 μ M EBL, 7: 100 ppm borik asit, 8: 100 ppm borik asit + 0,01 μ M EBL, 9: 100 ppm borik asit + 1 μ M EBL

3.2.5.Yaprak, kök ve çiçek salkımında bor miktarı

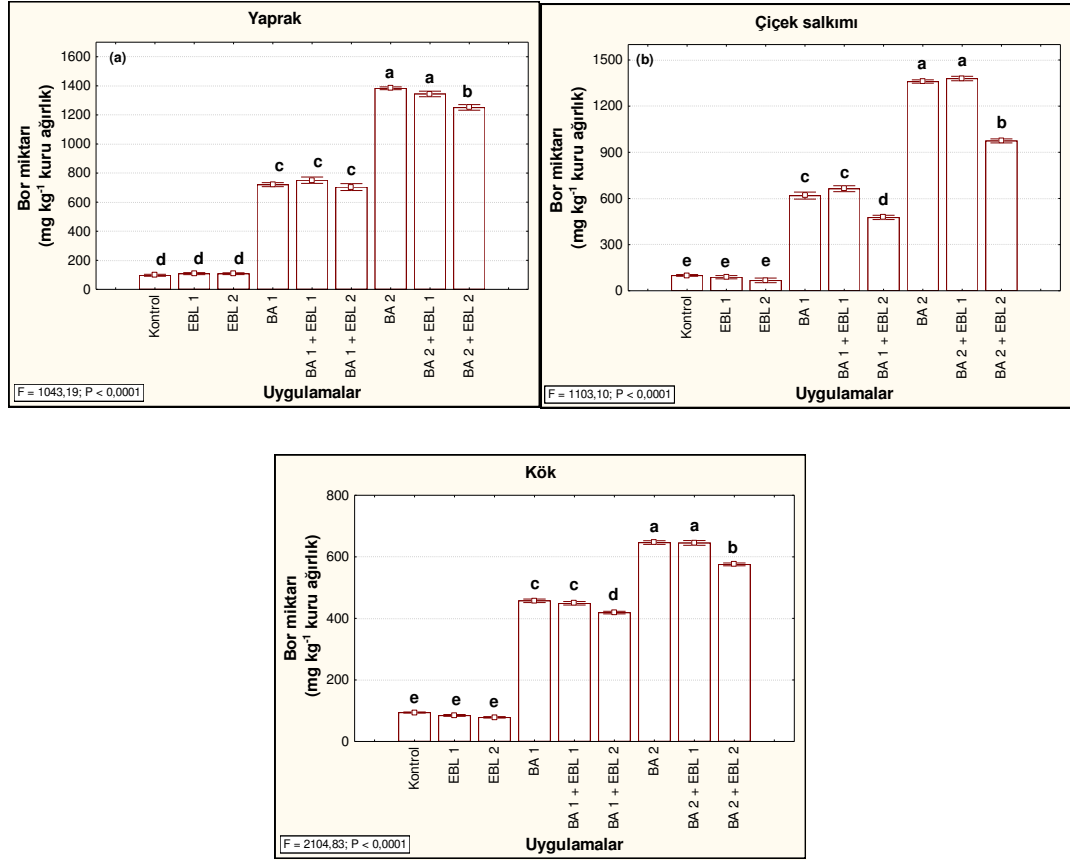
Uygulamalara ait bitkilerin yaprak, kök ve çiçek salkımı kısımlarının bor içerikleri karşılaştırıldığında yaprak ve çiçek salkımı dokularında kök dokusuna göre daha yüksek miktarda bora rastlanmıştır. Genel olarak bor miktarı tayini yapılan tüm dokularda kontrol, 0.01 ve 1 μ M EBL uygulamaları aynı grupta yer almıştır. Benzer şekilde 50 ppm borik asit ile 50 ppm borik asit + 0.01 μ M EBL uygulaması ve 100 ppm borik asit ile 100 ppm borik asit + 0.01 μ M EBL uygulaması aynı grupta yer almıştır.

Borik asit ile birlikte uygulanan 1 μ M EBL uygulaması istatistiki açıdan önemli olacak şekilde tüm dokulardaki (yaprak dokularında 50 ppm borik asit + 1 μ M EBL uygulaması hariç) bor miktarını azaltmıştır (Çizelge 3.15.ve Şekil 3.20.).

Çizelge 3.15. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak, çiçek salkımı ve kök dokularındaki bor miktarları (mg kg⁻¹ kuru ağırlık)

Uygulamalar	Bor konsantrasyonu (mg kg ⁻¹ kuru ağırlık)					
	Yaprak		Çiçek salkımı		Kök	
Kontrol	96,96	± 7,23 d	99,96	± 5,77 e	94,21	± 1,85 e
EBL 1	108,27	± 7,25 d	88,33	± 10,92 e	84,73	± 3,03 e
EBL 2	107,95	± 6,43 d	67,67	± 15,89 e	78,51	± 2,47 e
BA 1	720,35	± 14,43 c	618,66	± 24,25 c	457,22	± 6,05 c
BA 1 + EBL 1	751,04	± 23,11 c	663,41	± 20,26 c	449,06	± 6,04 c
BA 1 + EBL 2	697,10	± 18,76 c	476, 79	± 14,54 d	418,93	± 4,35 d
BA 2	1383,33	± 10,13 a	1360,19	± 11,54 a	646,46	± 6,32 a
BA 2 + EBL 1	1344,27	± 20,22 a	1379,56	± 15,13 a	645,23	± 8,16 a
BA 2 + EBL 2	1251,66	± 20,25 b	970,86	± 14,72 b	575,57	± 4,86 b

Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır (P<0.05, ± standart hata değeri).

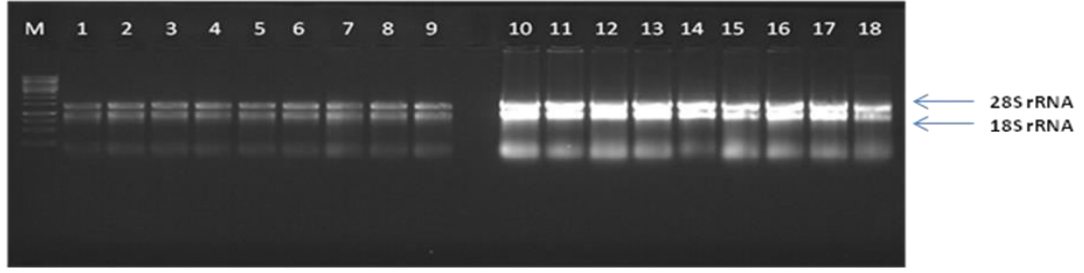


Şekil 3.20. Borik asit ve/veya EBL uygulamaları yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak (a), çiçek salıkmı (b) ve kök (c) dokularındaki bor miktarları. Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

3.3. Moleküler Araştırmaların Bulguları

3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Borik asit ve/veya EBL ilaveli besin ortamlarına 60 saat boyunca maruz bırakılan bitkilerin rozet yaprak (5. ve 6. yaprak) ve kök kısımları ayrılarak total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların kaliteleri ve olası degradasyon durumlarını tespit etmek amacıyla agarozjelde yürütülmüştür. Degradasyon olmadan RNA izolasyonunun gerçekleştiği 28S ve 18S olmak üzere iki bantın net olarak görüntülenmesiyle anlaşılmaktadır. Hem yaprak hem de kök örneklerinden RNA izolasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lara ait agaroz jel sonuçları şekil 3.21.'de verilmiştir.



Şekil 3.21.Borik asit ve /veya EBL ilaveli besin ortamlarına 60 saat süreyle maruz bırakılan bitkilerin yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları. 1-9 arası yaprak örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL1, 3: EBL2, 4: BA 1, 5: BA 1 + EBL 1, 6: BA 1 + EBL 2, 7: BA 2, 8: BA 2 + EBL 1, 9: BA 2 + EBL 2), 10-18 arası kök örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL 1, 3: EBL 2, 4: BA 1, 5: BA 1 + EBL 1, 6: BA 1 + EBL 2, 7: BA 2, 8: BA 2 + EBL 1, 9: BA 2 + EBL 2). %8'lik agaroz jelde 100 Voltta 30 dakika yürütülmüştür. 3 µl RNA örneği ve 2 µl 6X yükleme boyası olmak üzere kuyucuklaratoplam 5 µl yükleme yapılmıştır. M:Marker 1 kb.

DNazI uygulamasını takiben tüm RNA örneklerinden materyal ve yöntem kısmında belirtildiği protokoller uygulanarak cDNA sentezi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Semi-quantitative RT-PCR

3.3.1.1.Yaprak örneklerinde RT-PCR

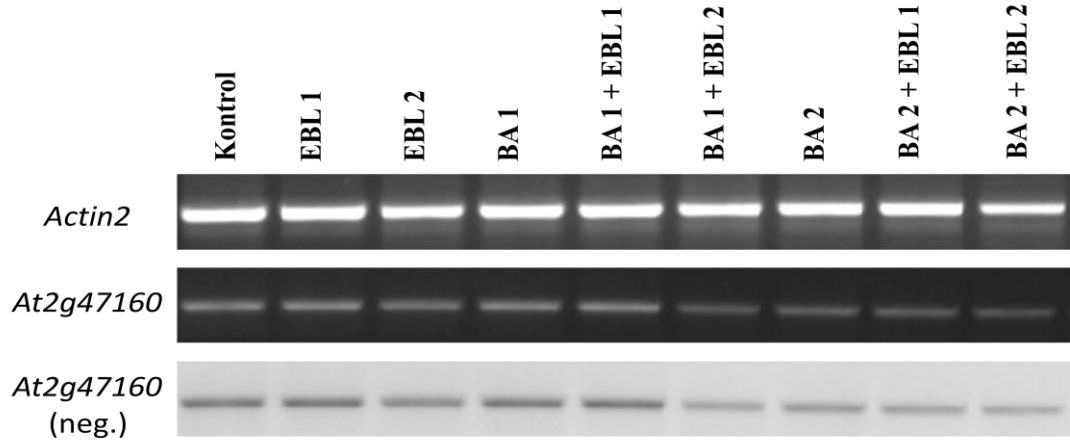
Dokuz farklı uygulamaya maruz bırakılan bitkilerin yaprak örneklerinde belirlenen 14 gene ait mRNA seviyesi semi-quantitative RT-PCR tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Genlere ait jel görüntüleri ve mRNA seviyelerini gösteren grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.22.–3.35.). Jel görüntüleri bantların daha net görünmesi sağlayan negatifleri ve kontrolü oluşturan Actin2 ile birlikte verilmiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak örneklerinde araştırılan genlerin ekspresyonlarının kontrole göre oransal değişimleri çizelge 3.16.'da verilmiştir.

RT-PCR analizleri sonucu borik asit ve/veya EBL uygulamalarına maruz bırakılan bitkilerin yapraklarında At2g47160 (*BOR1*) ve At3g06450 (*BOR3*) genlerinin ekspresyonları benzer ekspresyon modelleri göstermiştir (Şekil 3.22. ve 3.23.). 50 ppm borik asit uygulaması *BOR1* geninin ekspresyon seviyesini 1,16, 100 ppm borik asit uygulaması ise kontrole göre ekspresyonu 1,84 oranında azaltmıştır. 0,01 µM EBL uygulamasının tek başına yada borik asit uygulamaları ile birlikte *BOR1* geninin ekspresyonunu kontrole yada borik asit uygulamalarına göre değiştirmedigi saptanmıştır.

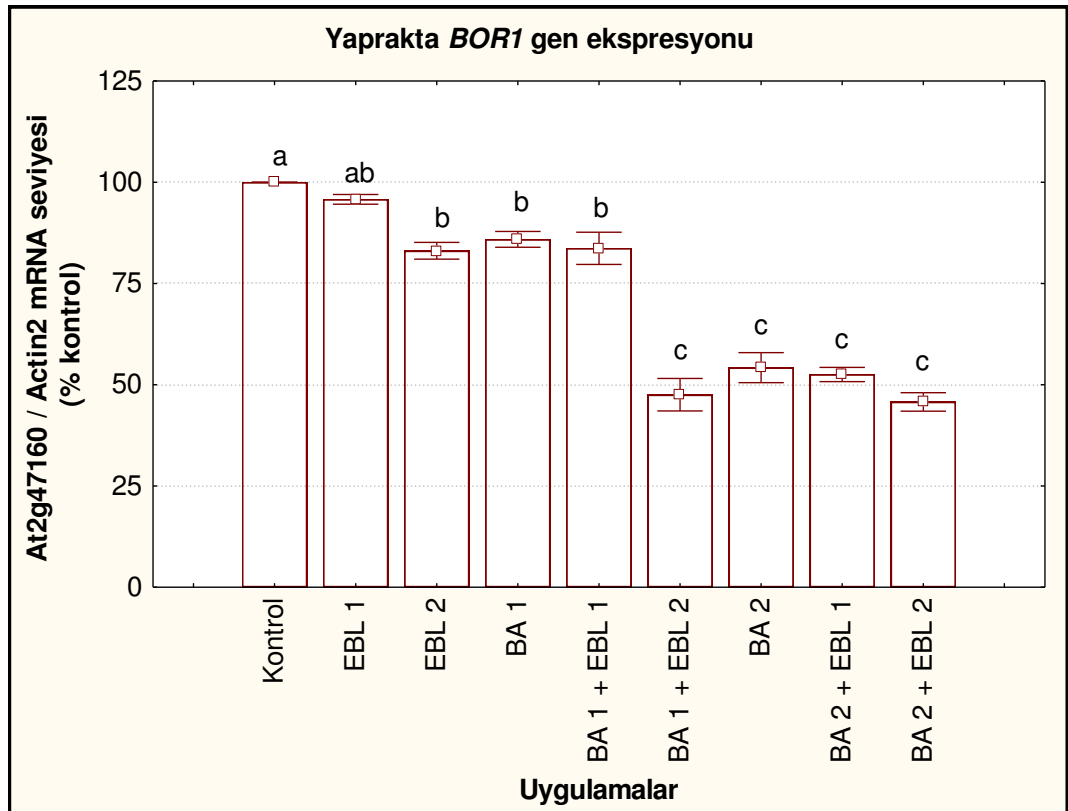
1 μ M EBL uygulaması tek başına *BOR1* geninin ekspresyon oranını 1,20 oranında azaltırken, 50 ve 100 ppm borik asit ile birlikte uygulandığında bu oran sırasıyla 2,10 ve 2,18 olarak değişmiştir (Şekil 3.22. ve Çizelge 3.16.). *BOR3* geninin ekspresyonu 50 ppm borik asit uygulaması sonucu azalmış, 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ile daha da azalmış ve bu durum istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise tek başına yapılan 100 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyon seviyesini düşük oranlarda artırmaya ya da azalma göstermiştir (Şekil 3.24.).

At3g62270 (*BOR2*) geninin ekspresyonu borik asit ve/veya EBL uygulamaları ile artış göstermiştir (Şekil 3.23.). 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları ekspresyon oranını kontrole göre sırasıyla 1,34 ve 1,77 oranlarında arttırmıştır. 1 μ M EBL uygulaması tek başına ya da borik asit uygulamalarıyla birlikte ekspresyon seviyesinin istatistiki olarak önem arz edecek şekilde artmasına neden olmuştur (Çizelge 3.16.).

At1g15460 (*BOR4*) geninin ekspresyon profili genel olarak At3g62270 (*BOR2*) genine benzerlik göstermiştir. 0,01 ve 1 μ M EBL uygulamaları kontrole göre *BOR4* geninin ekspresyon oranını sırasıyla 1,74 ve 2,10 oranlarında arttırmışlardır (Şekil 3.25.). 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan 0,01 ve 1 μ M EBL uygulamalarının ekspresyon oranını tek başına yapılan 50 ppm borik asit uygulamasına göre sırasıyla 1,35 ve 1,49 oranlarında arttırdığı tespit edilmiştir. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulaması ise tek başına yapılan 100 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyonu 1,20 oranında arttırmıştır (Şekil 3.25. ve Çizelge 3.16.).

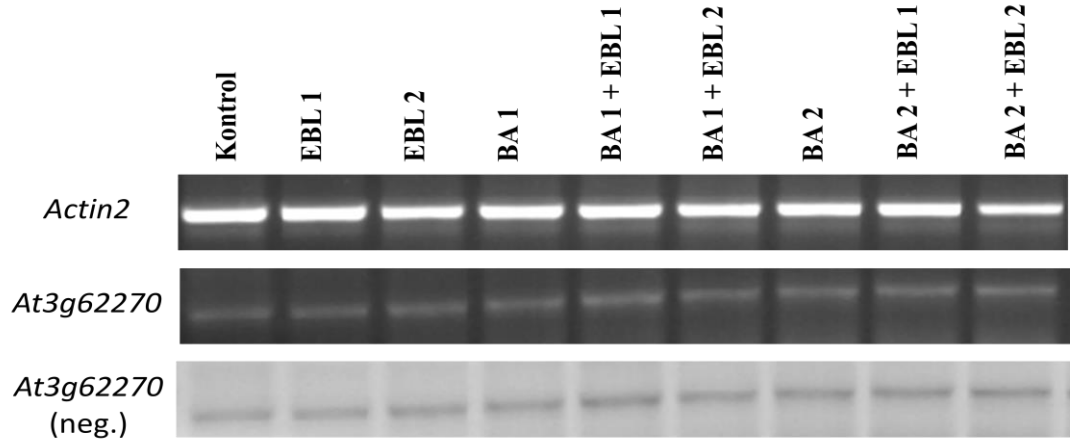


(a)

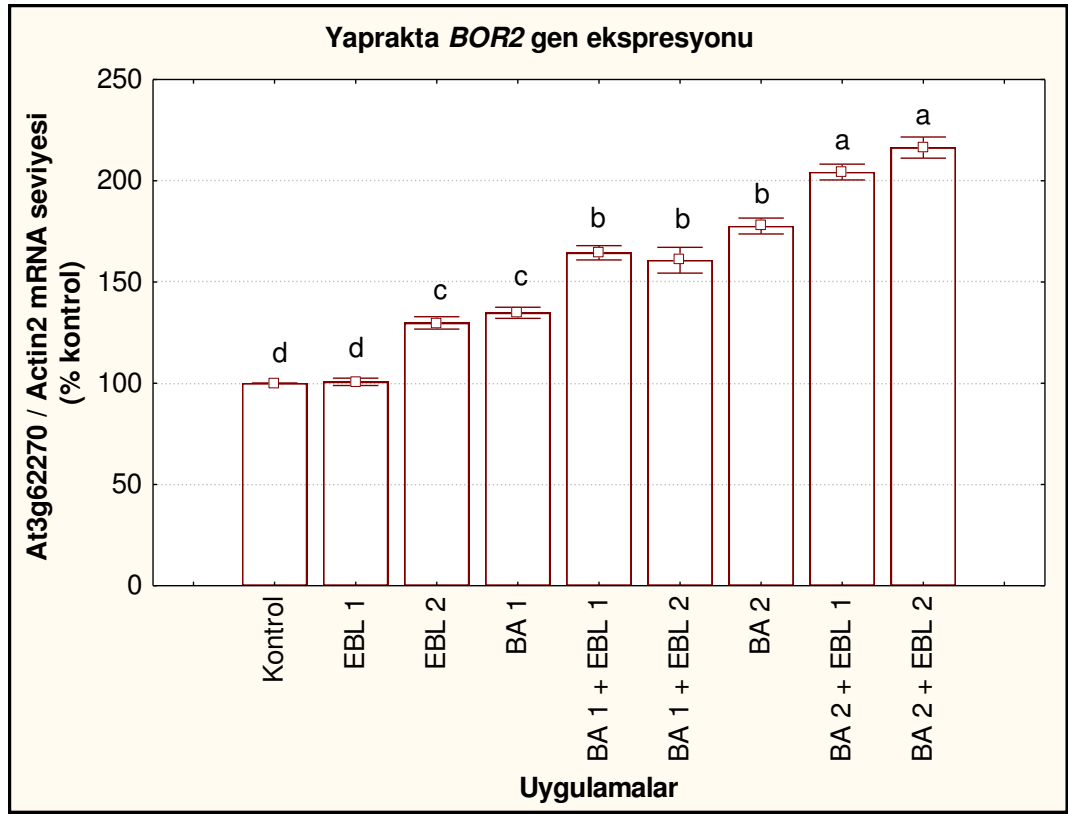


(b)

Şekil 3.22.Yaprakta At2g47160 (*BOR1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

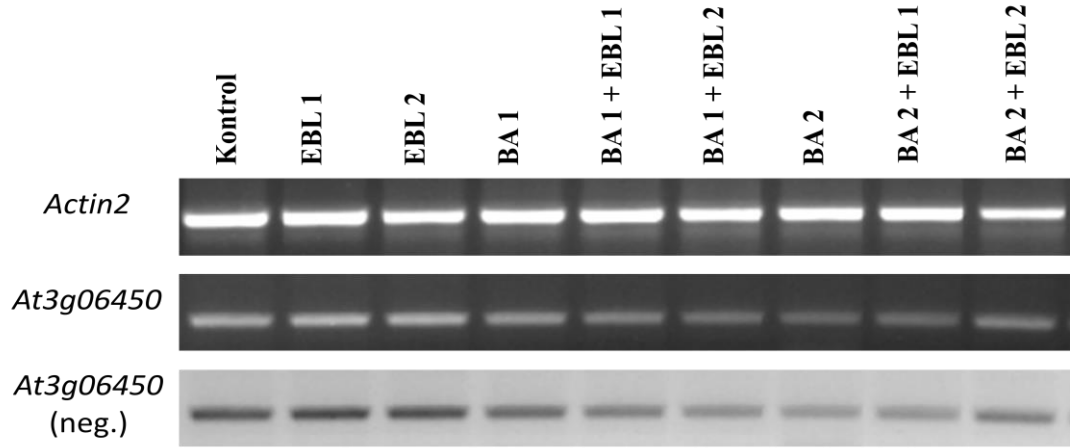


(a)

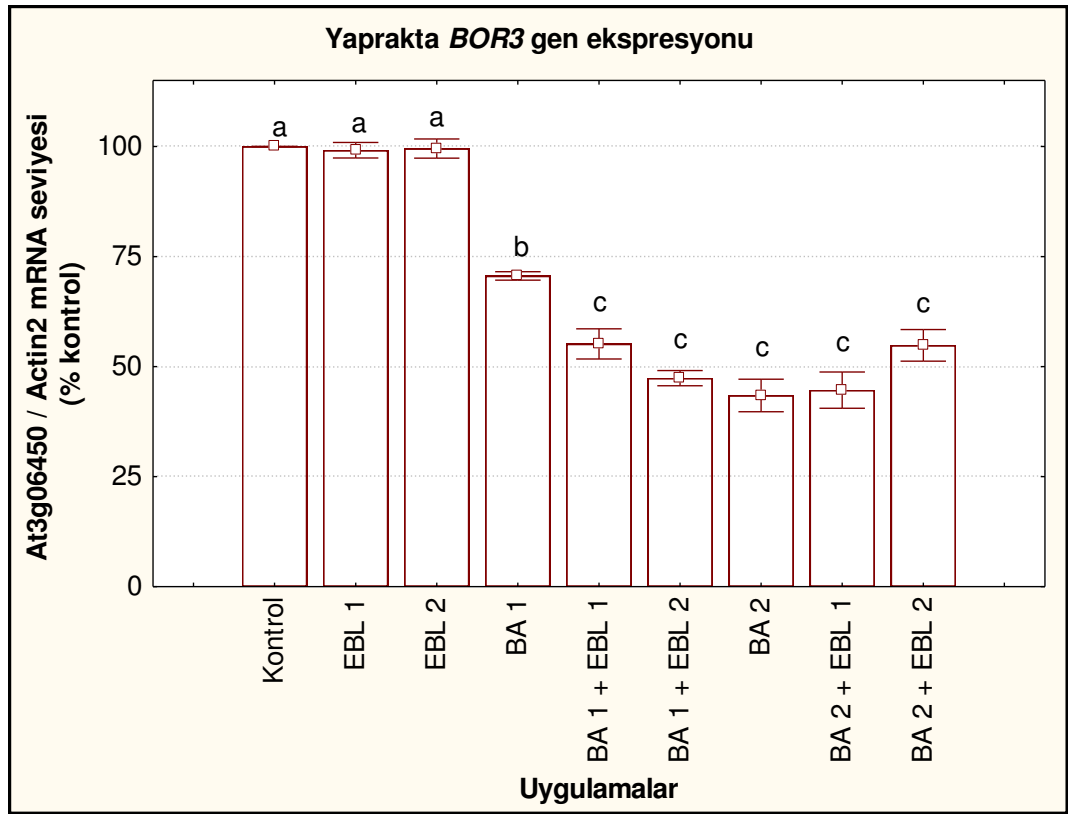


(b)

Şekil 3.23.Yaprakta At3g62270 (*BOR2*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

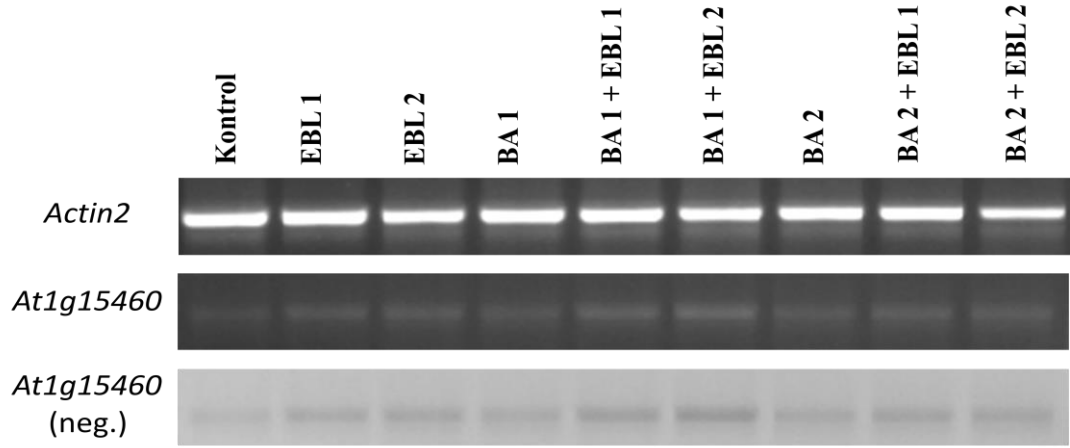


(a)

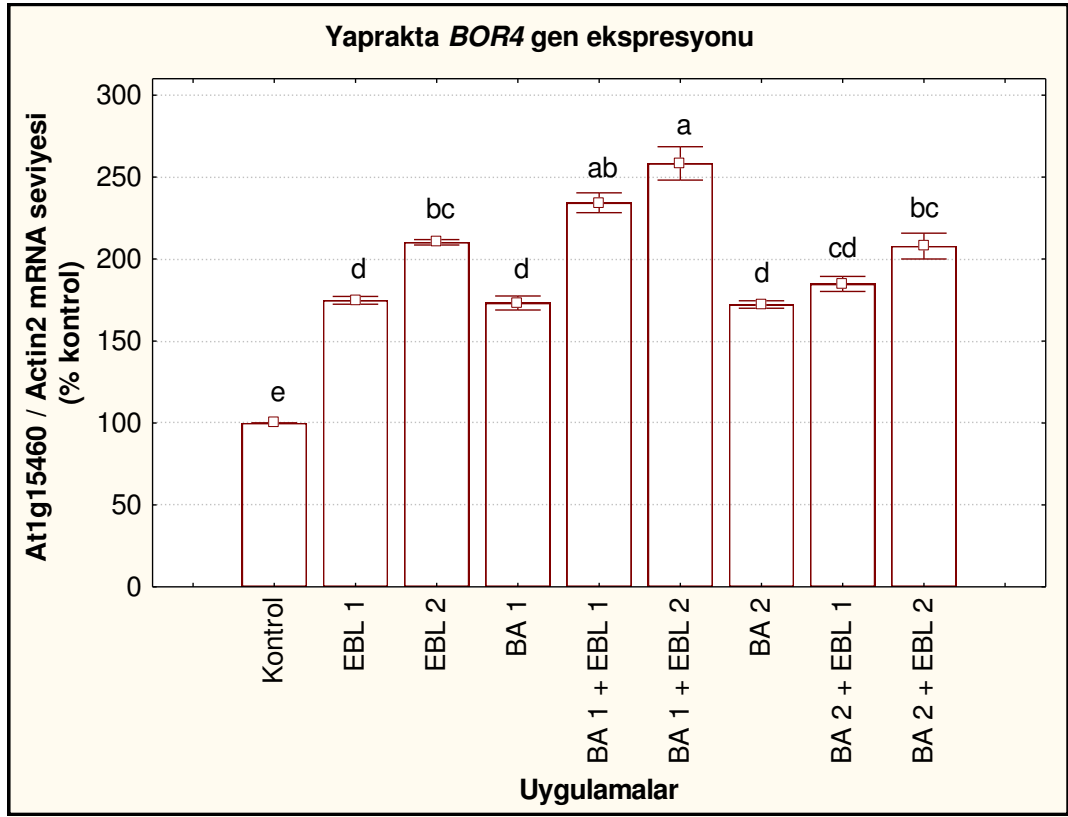


(b)

Şekil 3.24.Yaprakta At3g06450 (*BOR3*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

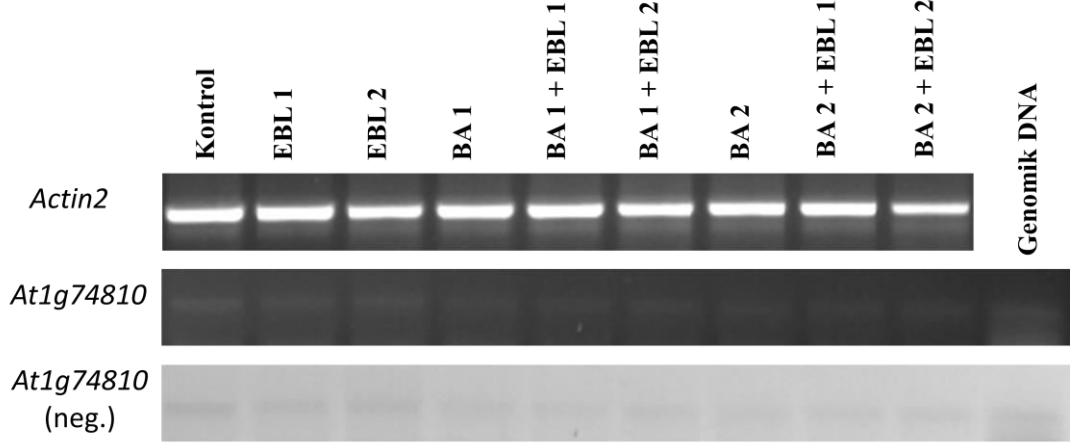


(a)



(b)

Şekil 3.25.Yaprakta At1g15460 (*BOR4*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

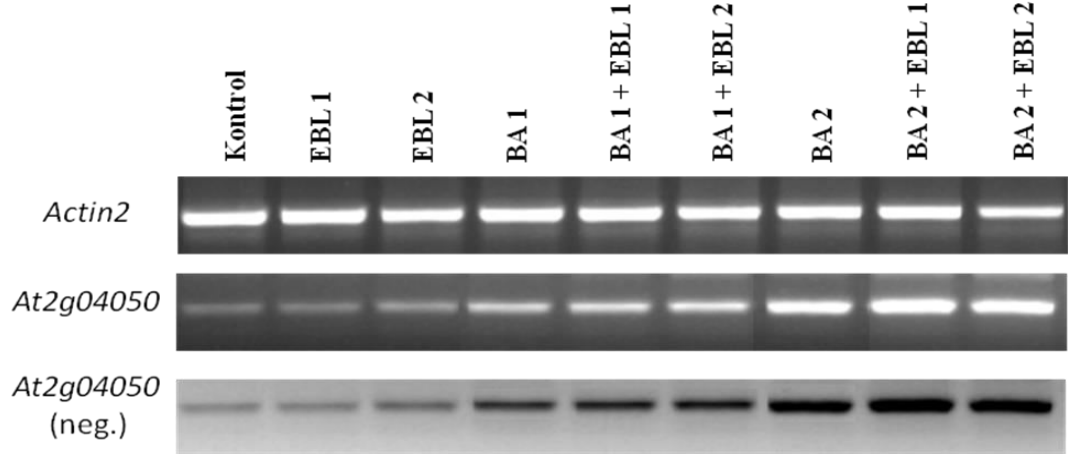


Şekil 3.26.Yaprakta At1g74810 (*BOR5*) genine ait jel resmi

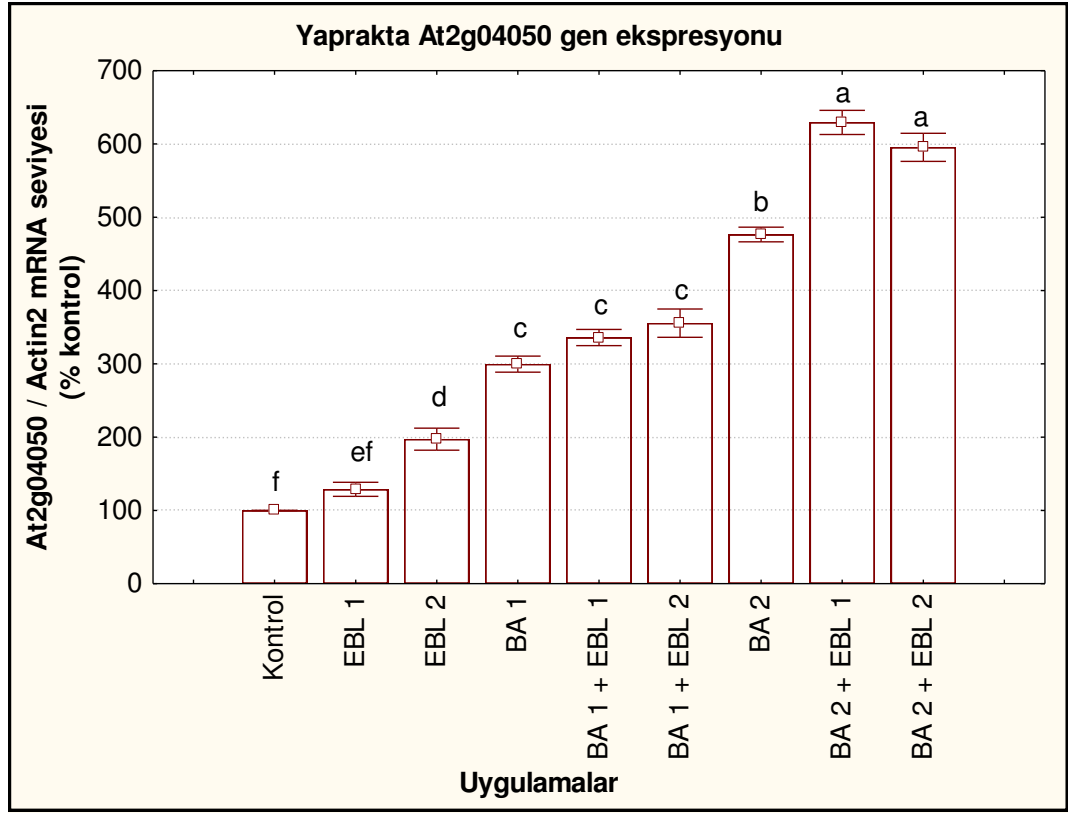
Optimizasyon çalışmalarına rağmen yaprak dokusunda At1g74810 (*BOR5*) genine ait tutarlı ekspresyon sonuçları gözlenmemiştir. PCR reaksiyonunda pozitif kontrol olarak kullanılan genomik DNA'nın çok az çalışma durumu primerlerin bağlanması ile bir sorun olabileceği sonucunu düşündürmektedir(Şekil 3.26.).

Borik asit uygulamaları At2g04050 geninin ekspresyonunda artışa neden olmuştur. 50 ppm borik asit uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını 2,99, 100 ppm borik asit uygulaması ise 4,76 oranında arttırmıştır. Tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması ekspresyon oranını 1,97, 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise yaklaşık 3,40 oranında artışlar meydana getirmiştir. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan 0,01 ve 1 µM EBL uygulamaları ise ekspresyon oranını kontrole göre sırasıyla 6,29 ve 5,95 oranında, 100 ppm borik asit uygulamasına göre ise 1,87 ve 1,74 oranlarında arttırmışlardır (Şekil 3.27.).

50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları At5g51440 geninin ekspresyonunun kontrole göre arttırmış, bununla birlikte 100 ppm borik asit uygulamasının neden olduğu artış istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. 1 µM EBL uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını 1,26 oranında arttırırken, 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları tek başına yapılan 50 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyon oranını daha fazla arttırmıştır. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan 0,01 ve 1 µM EBL uygulamaları ise kontrole göre ekspresyonun sırasıyla 2,22 ve 2,45 oranlarında artmasını sağlamıştır (Şekil 3.28. ve Çizelge 3.16.).

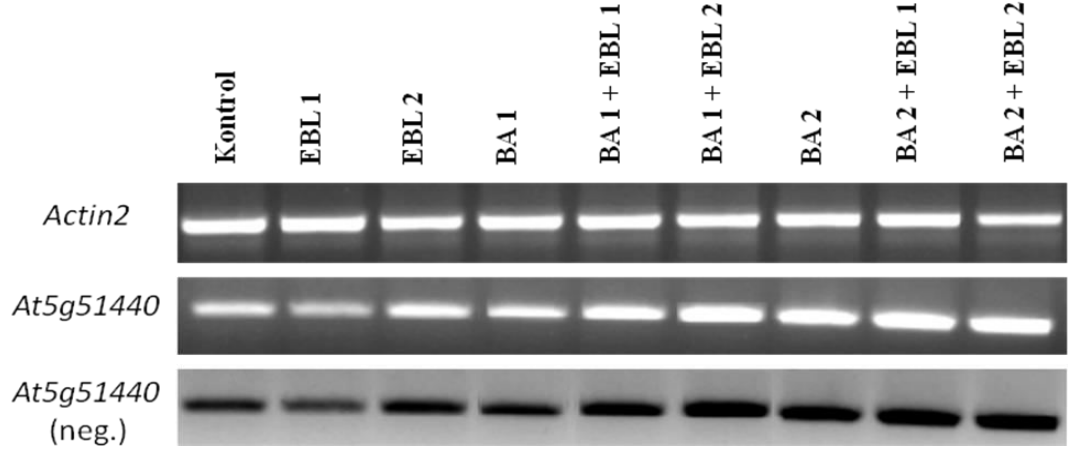


(a)

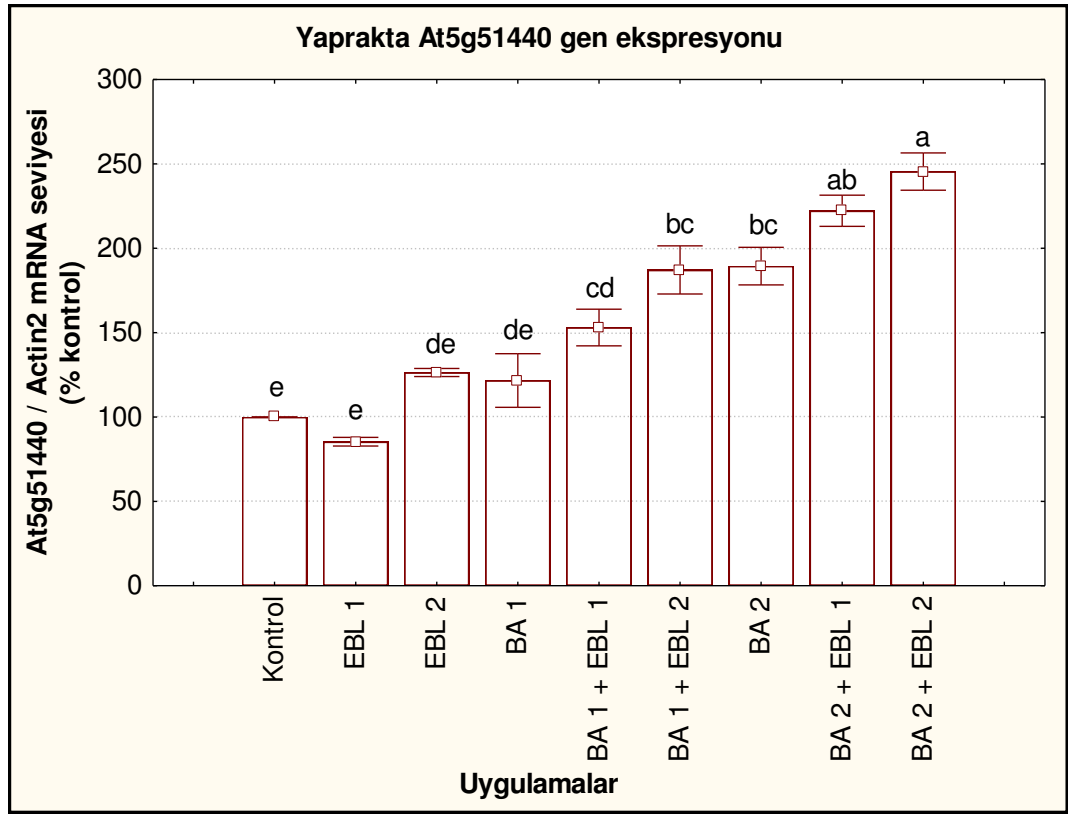


(b)

Şekil 3.27.Yaprakta At2g04050 (MATE) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)



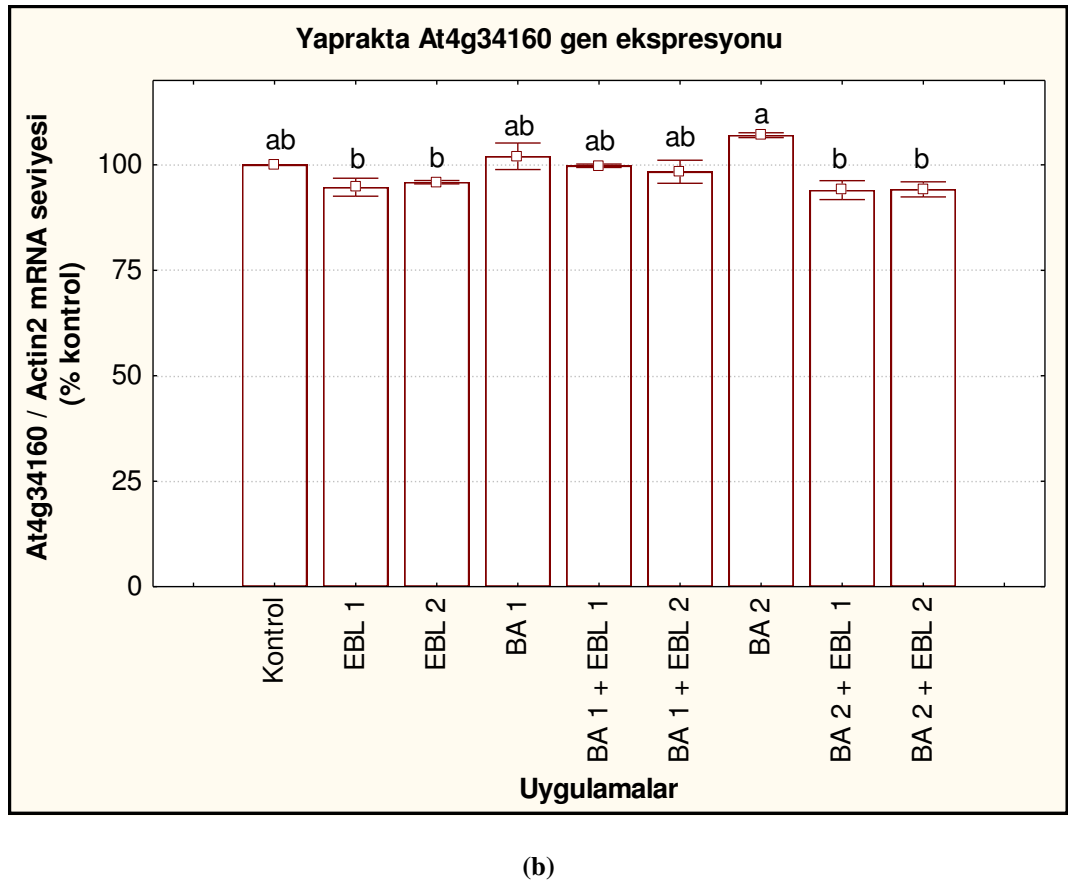
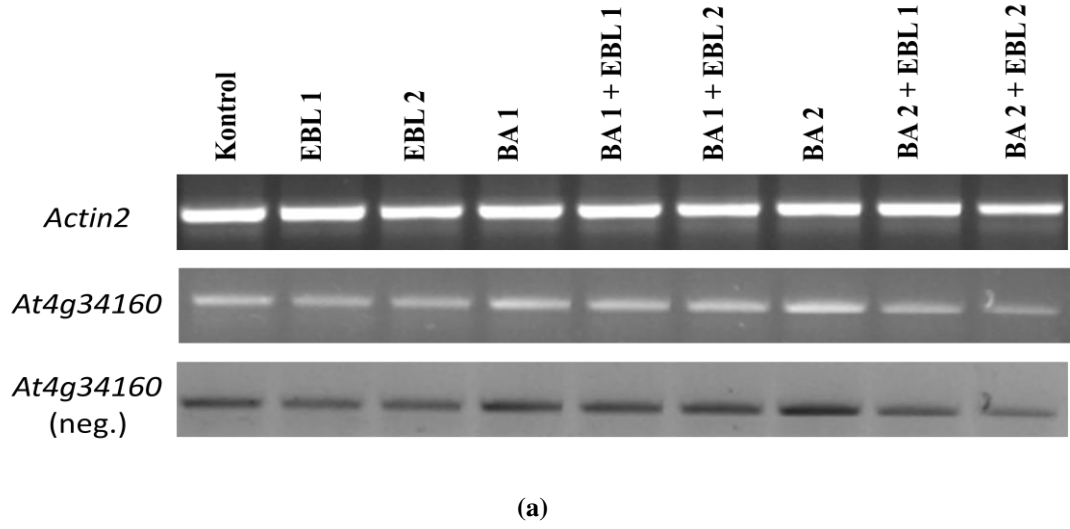
(b)

Şekil 3.28.Yaprakta At5g51440 (*Hsp-like*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

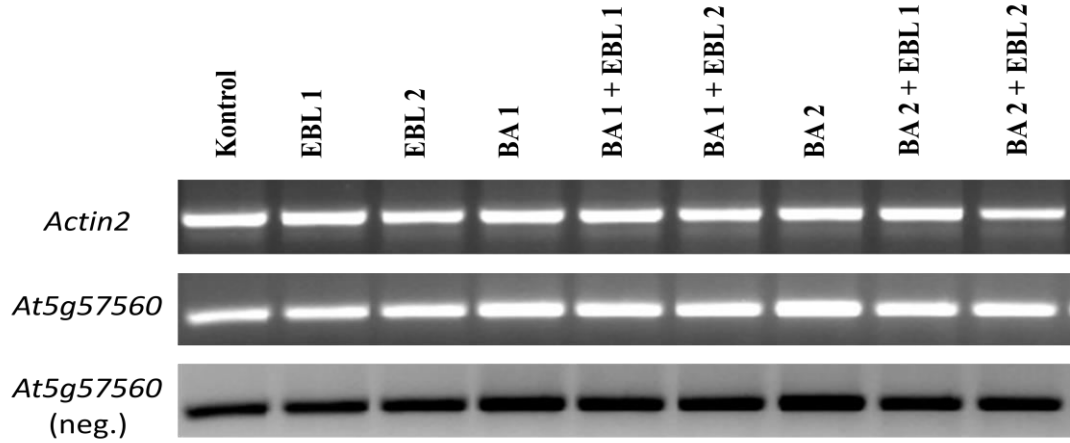
60 saat boyunca yapılan borik asit ve/veya EBL uygulamaları At4g34160 geninin ekspresyonunda düşük oranlarda değişimler meydana getirmiştir. Tek başına yapılan 100 ppm borik asit uygulaması ekspresyon seviyesini arttırmıştır. Borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise At4g34160 geninin ekspresyonunu kontrole göre istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde etkilememiştir (Şekil 3.29.).

At5g57560 geninin ekspresyonunu 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları sonucu istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde artış göstermiştir. Tek başına yapılan 1µM EBL uygulaması ekspresyonu kontrole göre 1,20 oranında arttırmıştır. 50 ppm borik asit uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını 1,32 oranında artırırken, 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamalarının 50 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyonu değiştirmediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.16.). 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise ekspresyon seviyesini 100 ppm borik asit uygulamasına göre arttırmış fakat bu artışlar istatistiki önem arz etmemiştir (Şekil 3.30.).

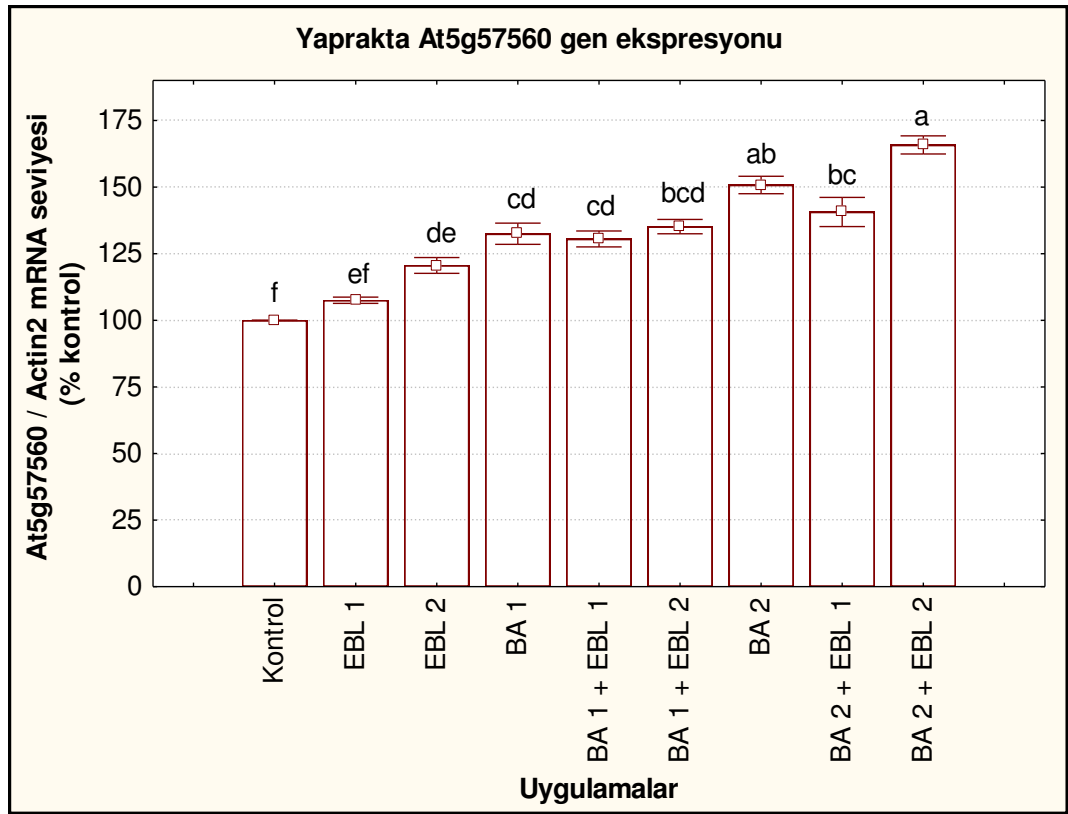
Uygulamaların At5g49720 geninin ekspresyon profilinde meydana getirdiği değişimler istatistiki bakımdan önemli bulunmamıştır (Şekil 3.31. ve Çizelge 3.16.). Borik asit ve/veya EBL uygulamaları At3g12580 geninin ekspresyonunda düşük oranlarda değişimlere (artma ya da azalmalara) neden olmuştur (Şekil 3.32. ve Çizelge 3.16.).



Şekil 3.29.Yaprakta At4g34160 (*CycD3;1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kulanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

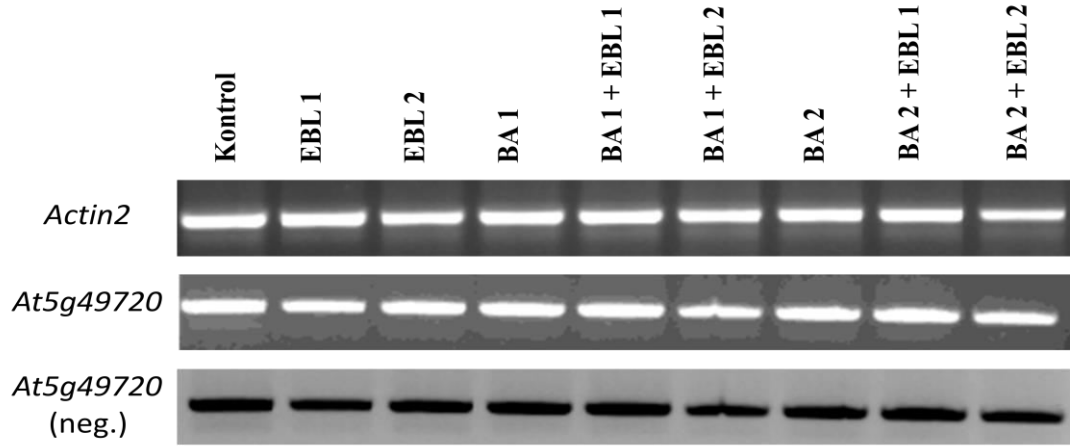


(a)

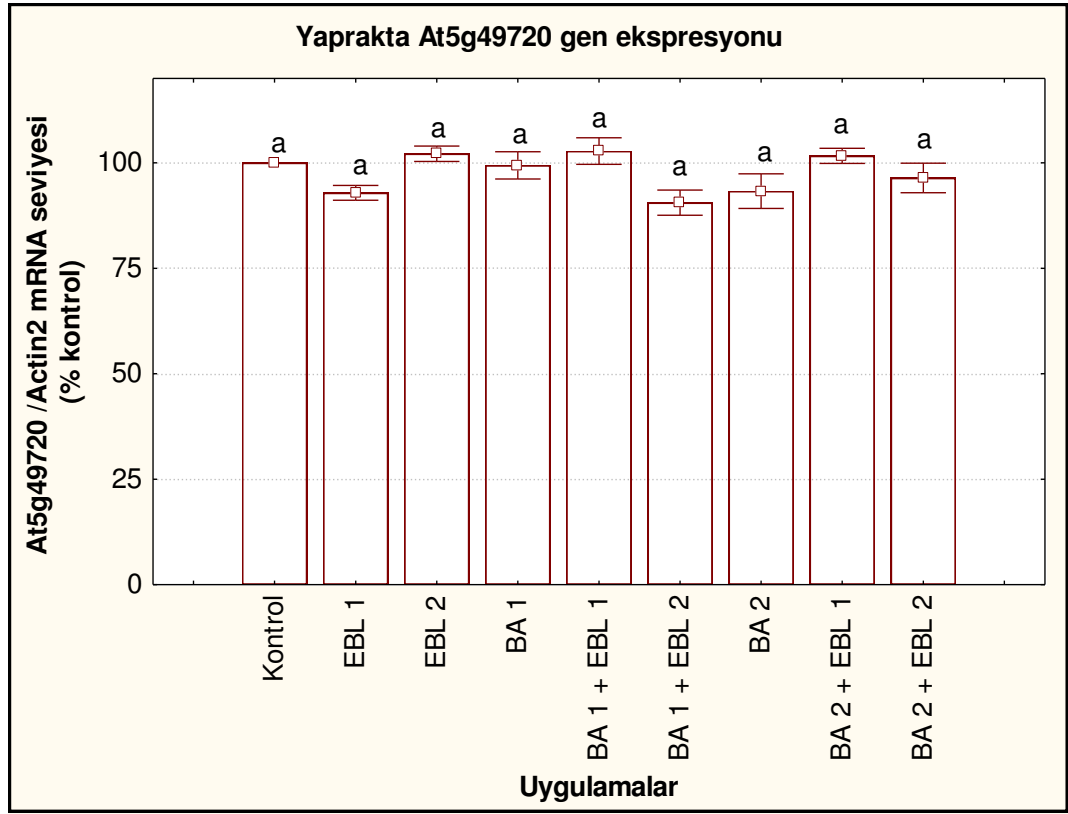


(b)

Şekil 3.30.Yaprakta At5g57560 (*TCH4*) genine ait (a) jel resmi ve(b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

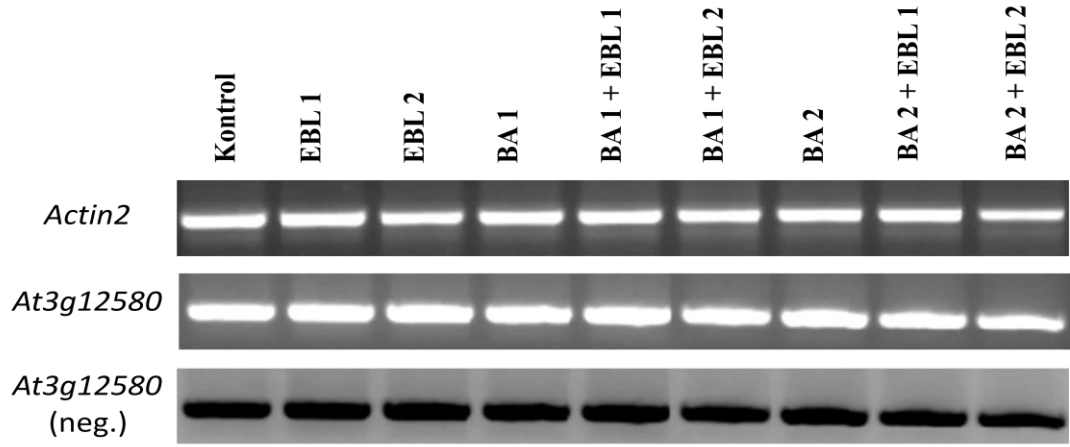


(a)

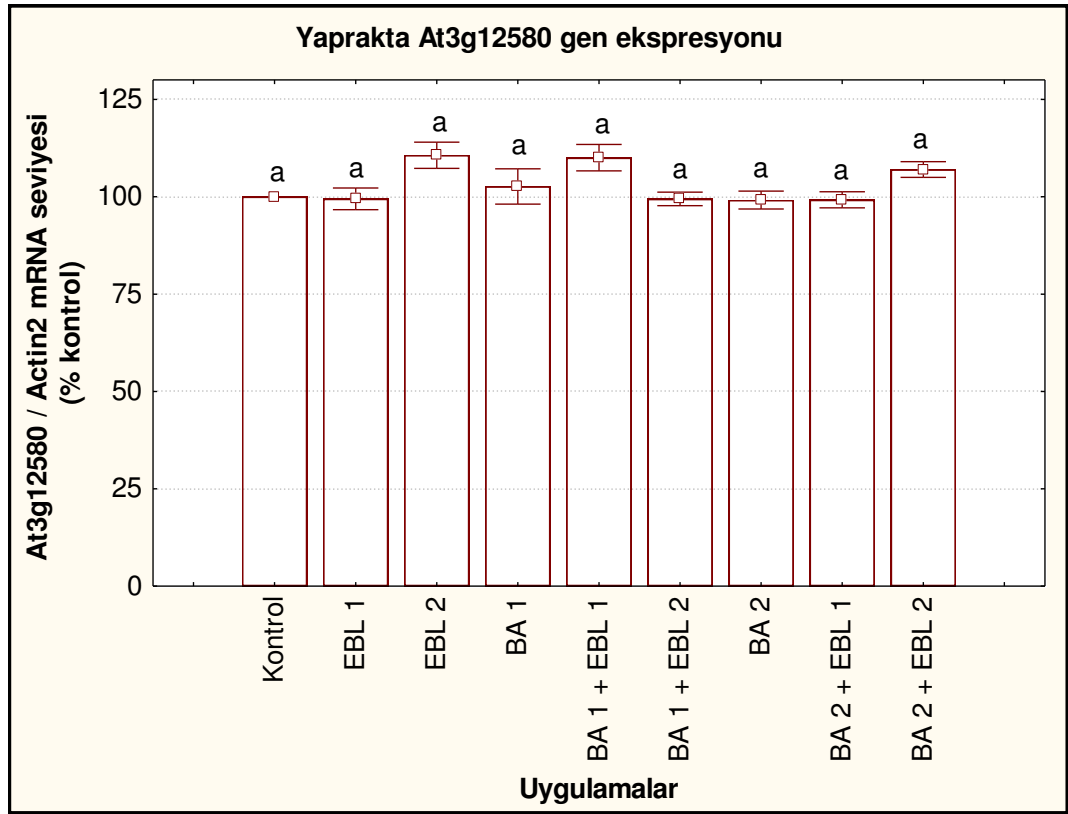


(b)

Şekil 3.31.Yaprakta At5g49720 (*KOR*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P<0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)



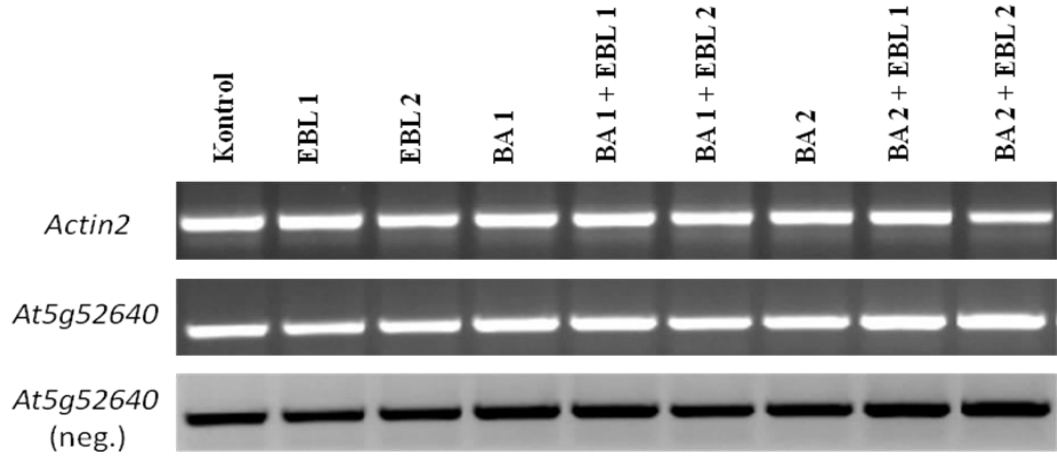
(b)

Şekil 3.32.Yaprakta At3g13580 (*Hsp70-4*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

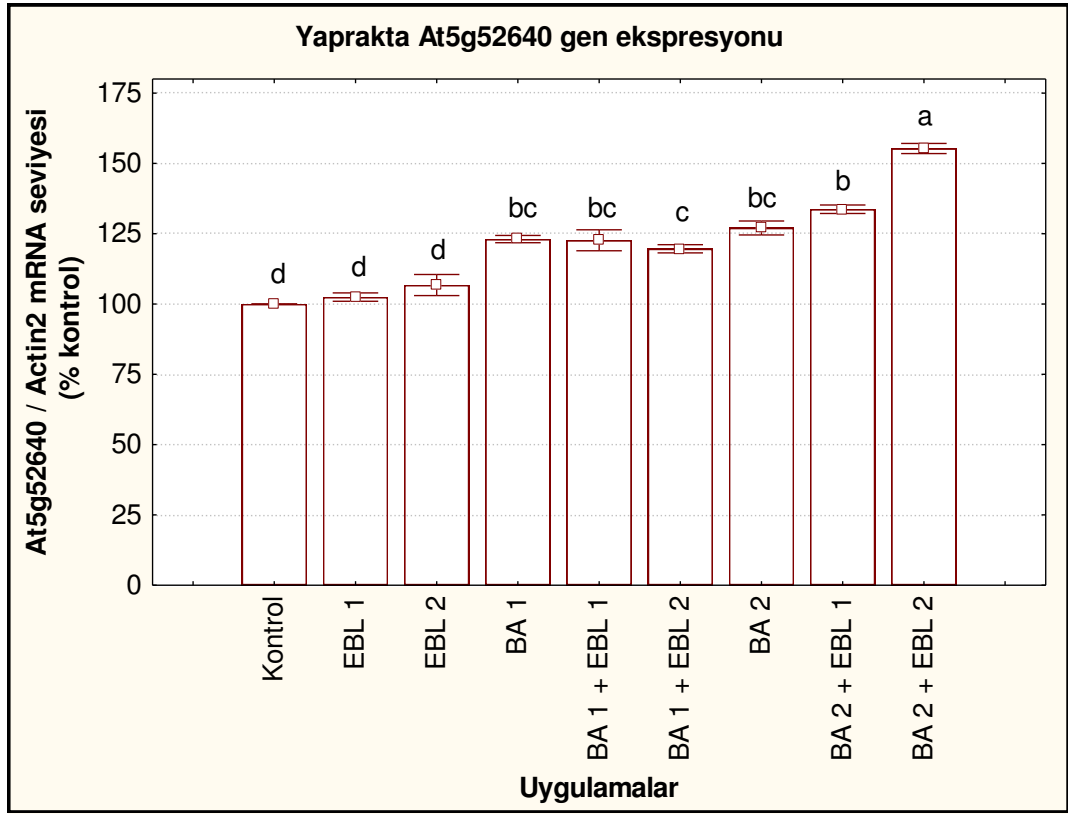
Çalışılan genlerden bir diğeri olan At5g52640 geninin ekspresyonu 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları sonucu benzer oranlarda (sırasıyla 1,23 ve 1,27) artış göstermiş ve bu artış istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Çizelge 3.16.). Tek başına ya da 50 ppm borik asit borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ekspresyon seviyesini 50 ppm borik asit uygulamalarına göre değiştirmemiştir. 100 ppm borik asit ile birlikte uygulanan 1 µM EBL uygulaması ise ekspresyon oranını kontrole göre 1,55, tek başına yapılan 100 ppm borik asit uygulamasına göre ise 1,17 oranında istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır (Şekil 3.33.).

At5g52310 geninin ekspresyonu 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları sonucu kontrole göre 1,33 oranlarında artış göstermiştir. Tek başına yapılan 0,01 ve 1 µM EBL uygulamaları ekspresyon seviyesini istatistiki olarak önemli oranda arttırmıştır. 1 µM EBL uygulaması 50 ppm borik asit ile birlikte ekspresyonun 1,51, 100 ppm borik asit ile birlikte ise ekspresyonda kontrole göre 1,56 oranında artışa neden olmuştur (Şekil 3.34. ve Çizelge 3.16.).

Borik asit uygulamalarının ekspresyonunda artışa neden olan diğeri bir gen ise At5g06760 genidir. 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları ekspresyonda kontrole göre sırasıyla 1,71 ve 1,25 oranlarında artışlar meydana getirmiştir. Tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması ekspresyon oranını 1,63, 50 ppm borik asit ile birlikte ise 2,04 oranında arttırmıştır. 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise tek başına yapılan 100 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyonda düşük oranlarda artışlar meydana getirmiştir (Şekil 3.35.ve Çizelge 3.16.).

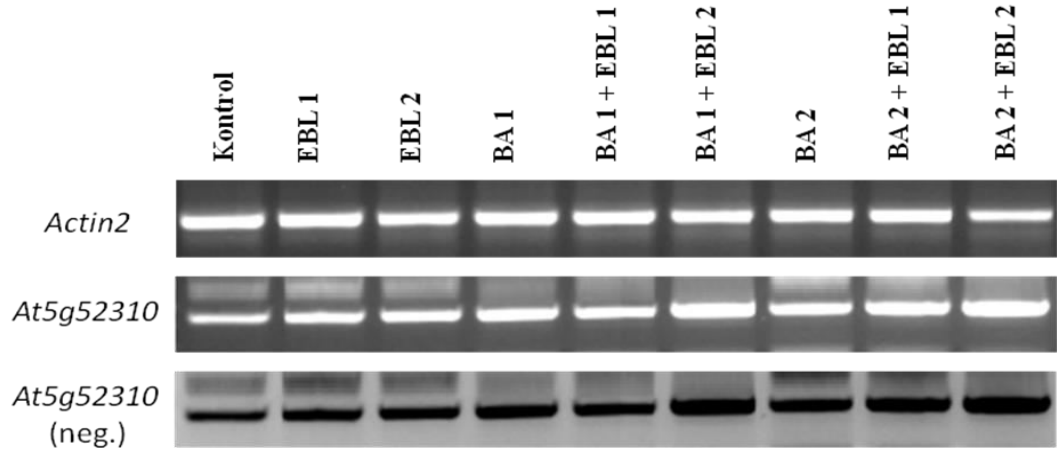


(a)

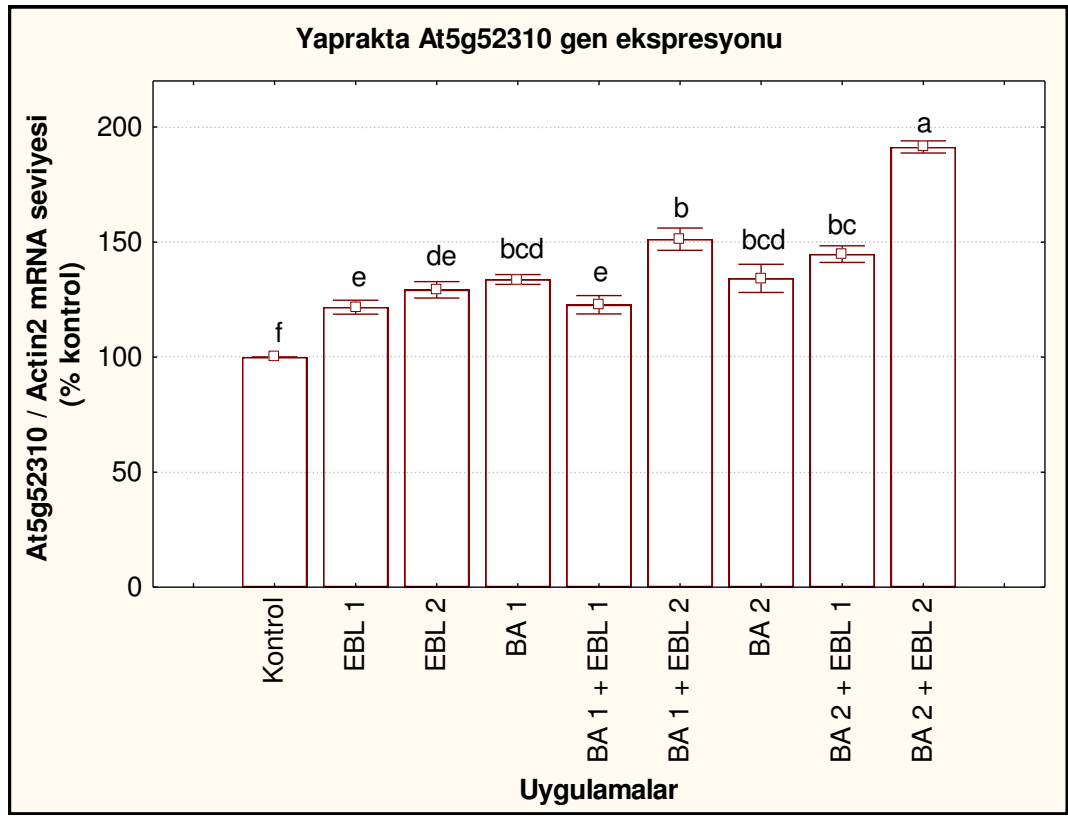


(b)

Şekil 3.33.Yaprakta At5g52640 (*Hsp90-1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

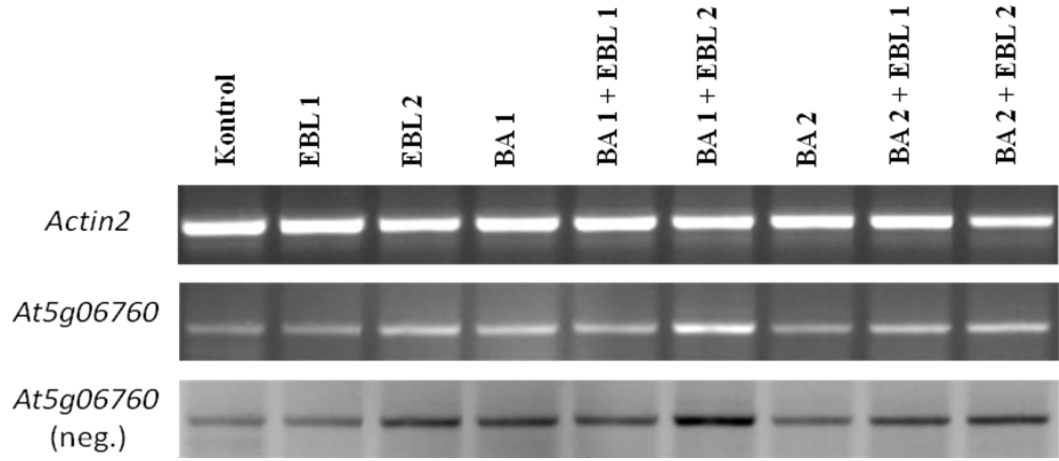


(a)

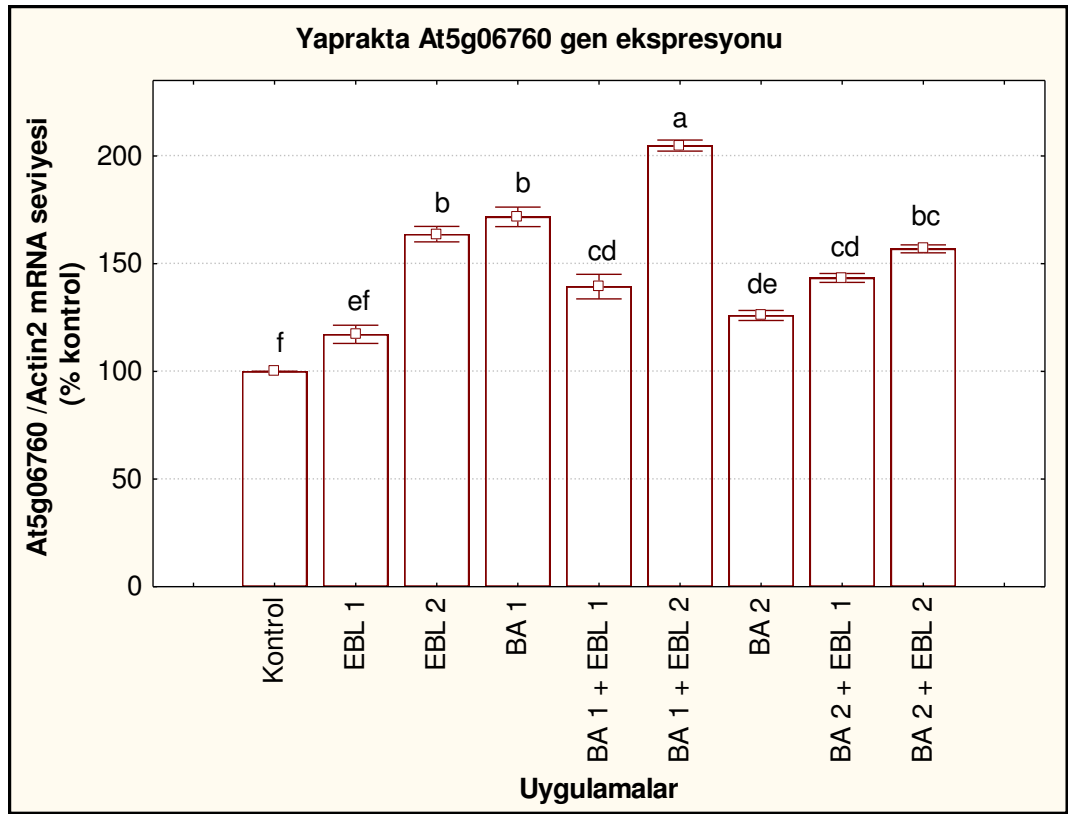


(b)

Şekil 3.34.Yaprakta At5g52310 (*LTI/COR78*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)



(b)

Şekil 3.35.Yaprakta At5g06760 (*LEA4-5*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

Çizelge 3.16.Dokuz farklı uygulamaya maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak örneklerinde belirlenen 14 adet genin mRNA seviyelerinin kontrole göre oransal değişimleri

Gen isimleri	Uygulamalar								
	Kontrol	EBL 1	EBL 2	BA1	BA 1 + EBL 1	BA 1 + EBL 2	BA 2	BA 2 + EBL 1	BA 2 + EBL 2
At2g47160 (BOR1)	1,00 ± 0,00	-1,04 ± 0,01	-1,20 ± 0,02	-1,16 ± 0,02	-1,19 ± 0,04	-2,10 ± 0,04	-1,84 ± 0,03	-1,90 ± 0,01	-2,18 ± 0,02
At3g62270 (BOR2)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,01	1,29 ± 0,03	1,34 ± 0,02	1,64 ± 0,03	1,60 ± 0,06	1,77 ± 0,04	2,04 ± 0,04	2,16 ± 0,05
At3g06450 (BOR3)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	-1,41 ± 0,01	-1,81 ± 0,03	-2,11 ± 0,01	-2,30 ± 0,03	-2,23 ± 0,04	1,82 ± 0,03
At1g15460 (BOR4)	1,00 ± 0,00	1,74 ± 0,02	2,10 ± 0,01	1,73 ± 0,04	2,34 ± 0,06	2,58 ± 0,10	1,72 ± 0,02	1,84 ± 0,04	2,07 ± 0,08
At1g74810 (BOR5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
At2g04050 (MATE)	1,00 ± 0,00	1,28 ± 0,10	1,97 ± 0,15	4,76 ± 0,10	2,99 ± 0,11	3,35 ± 0,11	3,55 ± 0,11	6,29 ± 0,17	5,95 ± 0,20

Çizelge 3.16. ^(devam)

At5g51440 (<i>Hsp-like</i>)	1,00 ± 0,00	-1,71 ± 0,02	1,26 ± 0,02	1,87 ± 0,15	1,53 ± 0,11	1,21 ± 0,16	1,89 ± 0,11	2,22 ± 0,09	2,45 ± 0,11
At4g34160 (<i>CycD3;1</i>)	1,00 ± 0,00	-1,04 ± 0,02	-1,04 ± 0,00	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,03	1,06 ± 0,00	-1,06 ± 0,02	-1,15 ± 0,01
At5g57560 (<i>TCH4</i>)	1,00 ± 0,00	1,07 ± 0,01	1,20 ± 0,03	1,32 ± 0,04	1,30 ± 0,03	1,35 ± 0,02	1,50 ± 0,03	1,40 ± 0,05	1,65 ± 0,03
At5g49720 (<i>KOR</i>)	1,00 ± 0,00	-1,07 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,03	1,02 ± 0,03	-1,10 ± 0,03	-1,07 ± 0,04	1,01 ± 0,04	-1,03 ± 0,03
At3g12580 (<i>Hsp70-4</i>)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,02	1,10 ± 0,03	1,02 ± 0,04	1,10 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,07 ± 0,02
At5g52640 (<i>Hsp90-1</i>)	1,00 ± 0,00	1,03 ± 0,01	1,06 ± 0,03	1,23 ± 0,01	1,22 ± 0,03	1,19 ± 0,01	1,27 ± 0,02	1,33 ± 0,01	1,55 ± 0,01
At5g52310 (<i>LTI/COR78</i>)	1,00 ± 0,00	1,21 ± 0,03	1,29 ± 0,03	1,33 ± 0,02	1,22 ± 0,04	1,51 ± 0,05	1,34 ± 0,06	1,44 ± 0,03	1,91 ± 0,02
At5g06760 (<i>LEA4-5</i>)	1,00 ± 0,00	1,17 ± 0,04	1,63 ± 0,03	1,71 ± 0,04	1,39 ± 0,05	2,04 ± 0,02	1,25 ± 0,02	1,43 ± 0,02	1,56 ± 0,01

"-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde artma oranlarını ifade etmektedir, ± standart hata değerleridir.

3.3.1.2.Kök örneklerinde RT-PCR

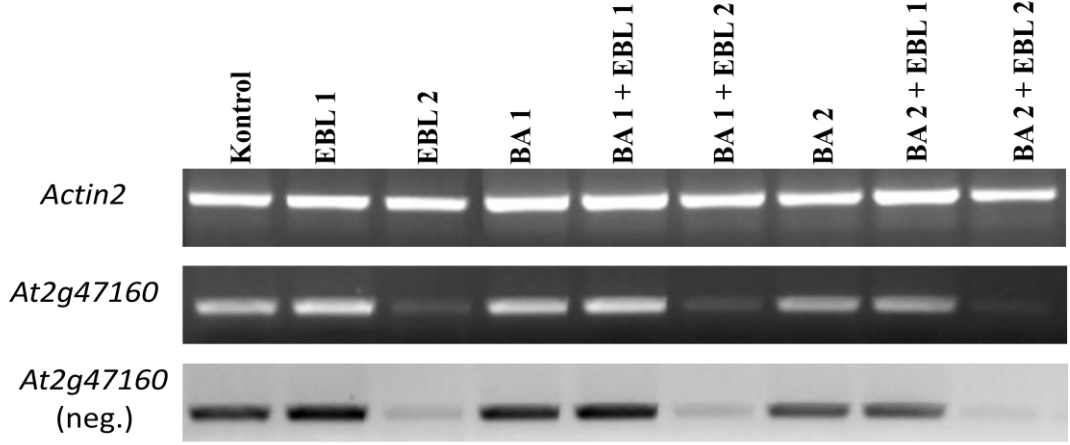
Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına maruz bırakılan bitkilerin kök örneklerinde de 14 farklı gene ait mRNA seviyesi semi-quantitative RT-PCR tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Genlere ait jel fotoğrafları ve mRNA seviyelerini gösteren grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.36. – 3.49.). *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin kök örneklerinde araştırılan genlerin ekspresyonlarının kontrole göre oransal değişimleri çizelge 3.17.'de verilmiştir.

RT-PCR analizleri sonucu At2g47160 (*BOR1*) ve At3g06450 (*BOR3*) genlerinin ekspresyonlarını yaprak örneklerinde olduğu gibi benzer ekspresyon profili göstermiştir. Tek başına yapılan 0,01 μ M EBL uygulamaları kontrole göre ekspresyonu fazla değiştirmez iken borik asit uygulamaları ile birlikte *BOR1* ve *BOR3* genlerinin ekspresyonları azalmıştır (Şekil 3.36. ve Şekil 3.38.). 1 μ M EBL tek başına uygulandığında *BOR1* geninin ekspresyonunu 2,45 oranında azaltırken 50 ve 100 ppm borik asit ile birlikte uygulandığında bu oranlar sırasıyla 3,47 ve 7,58 olarak değişmiştir. 1 μ M EBL uygulaması *BOR3* geninin ekspresyon profili üzerinde benzer etki göstermiş ve ekspresyon seviyesini kontrole göre 1,70, 50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları ile birlikte ise sırasıyla 2,75 ve 4.99 oranlarında azaltmıştır (Çizelge 3.17.).

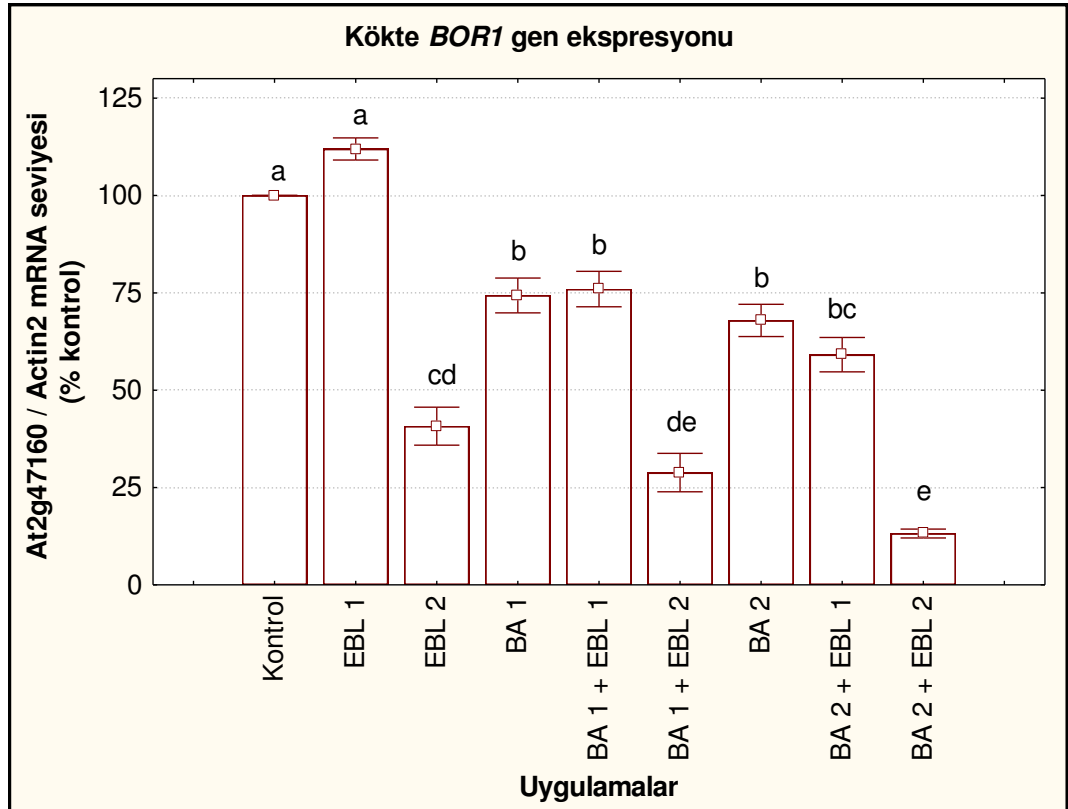
At3g62270 (*BOR2*) geninin ekspresyonunu *BOR1* ve *BOR3* geninin aksine her iki EBL uygulaması da arttırmıştır. Bununla birlikte artan borik konsantrasyonlarına paralel olarak da genin ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulaması kontrole ve tek başına yapılan 50 ppm uygulamasına göre ekspresyonu arttırmıştır. Yüksek konsantrasyonda borik asit (100 ppm) ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise ekspresyonun artmasına neden olmuş fakat bu artış istatistiki bakımdan önemli bulunmamıştır (Şekil 3.37.).

At1g15460 (*BOR4*) geninin ekspresyonu ise artan borik konsantrasyonları ile birlikte artış göstermiştir. Düşük konsantrasyonda (0,01 μ M) yapılan EBL uygulaması tek başına uygulandığında kontrole, borik asit ile birlikte uygulandığında ise tek başına yapılan borik asit uygulamalarına benzer ekspresyon seviyeleri gösterdiği tespit edilmiştir. 1 μ M EBL ise tek başına yada 50 ppm borik asit uygulamasıyla birlikte uygulandığında ekspresyonun yüksek oranlarda (sırasıyla 5,57 ve 5,26)

azalmasınaneden olmuştur. Bununla birlikte 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulaması sonucu *BOR4* geninde ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 3.39.).

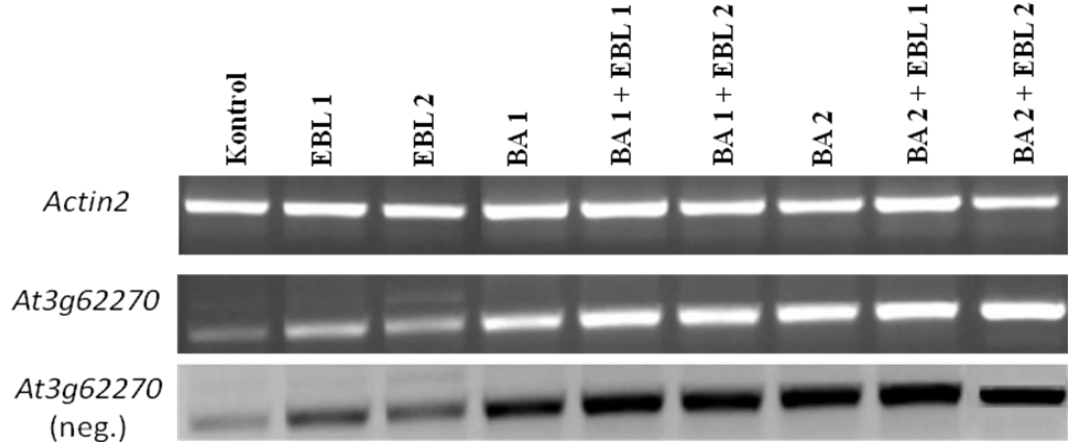


(a)

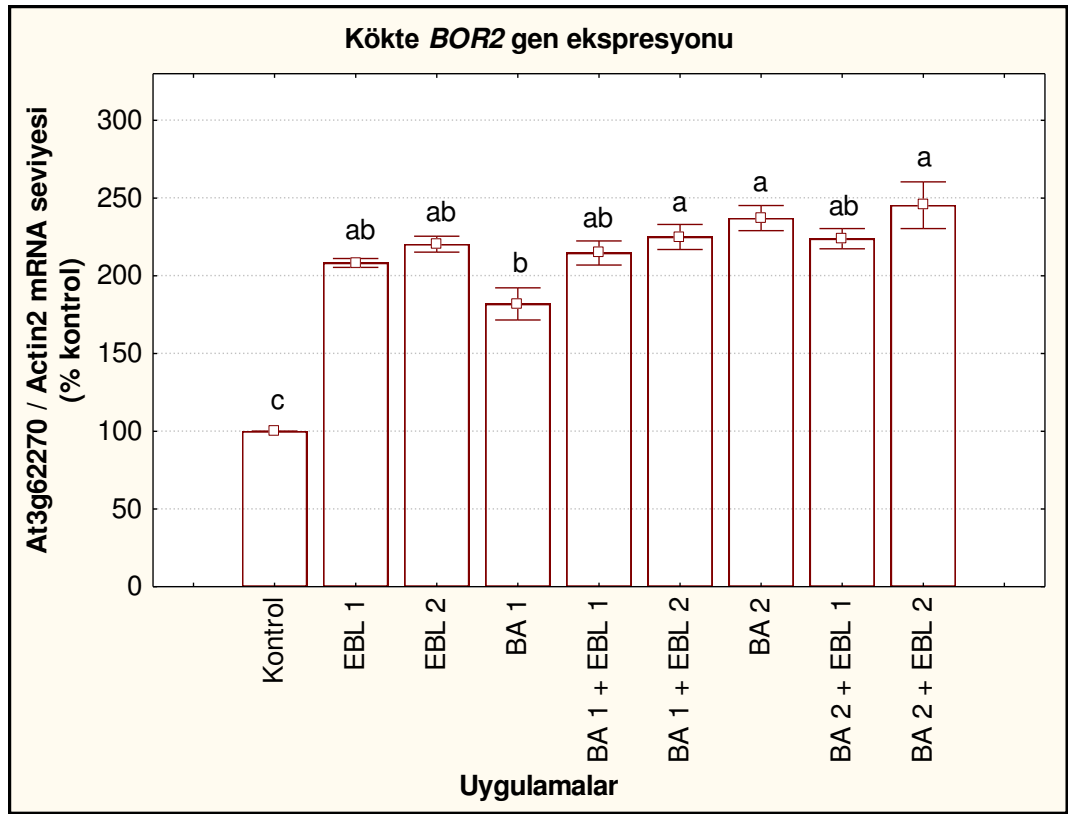


(b)

Şekil 3.36.Kökte At2g47160 (*BOR1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır(P<0.05, $\pm$ standart hata değeri).

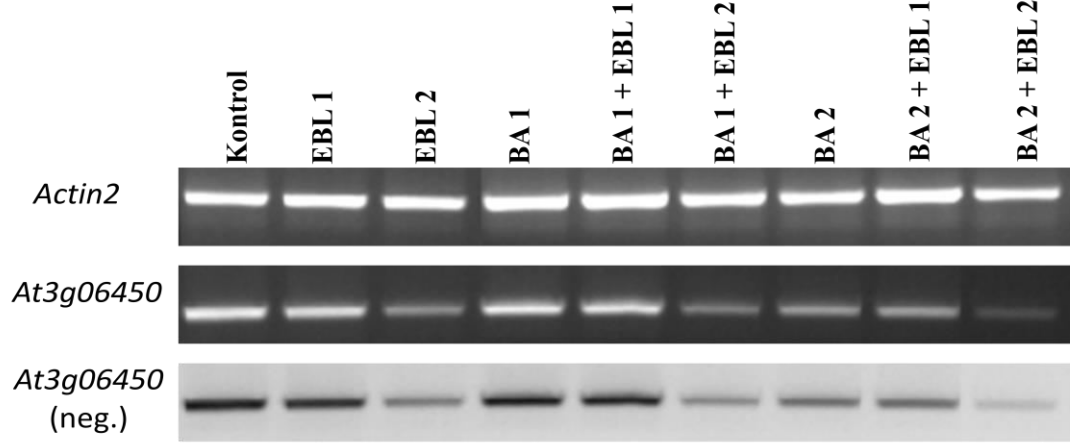


(a)

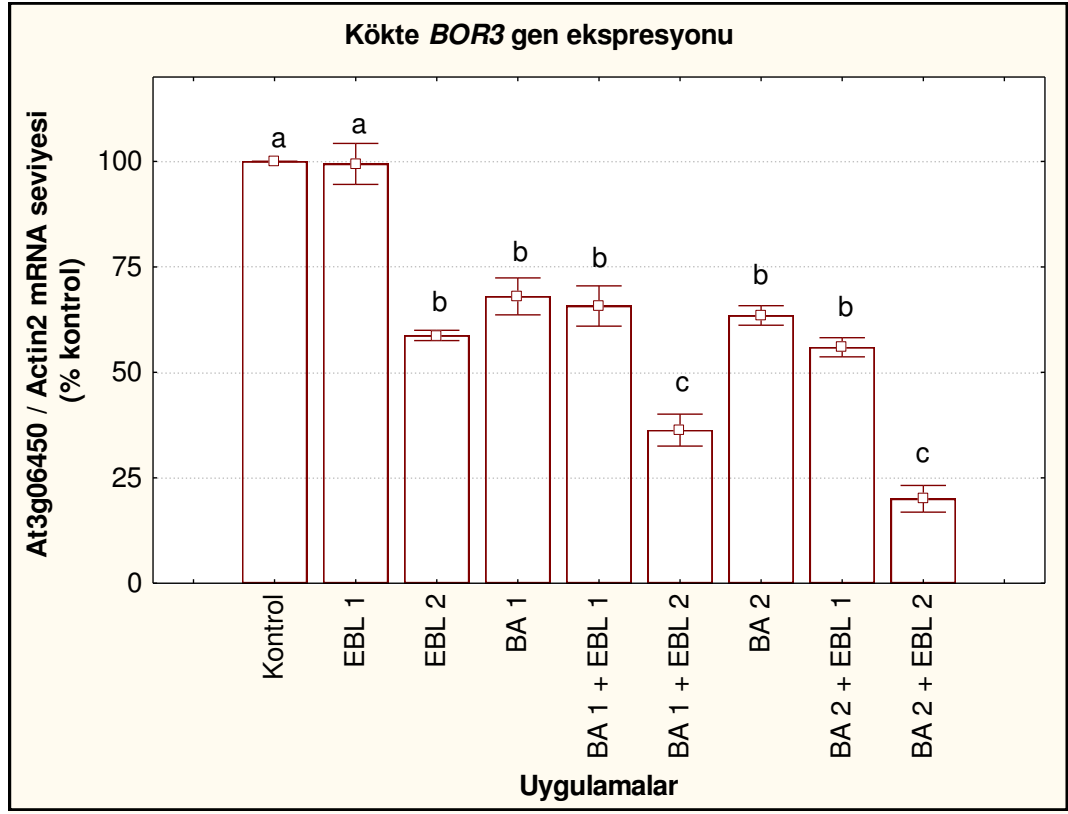


(b)

Şekil 3.37.Kökte *At3g62270* (*BOR2*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

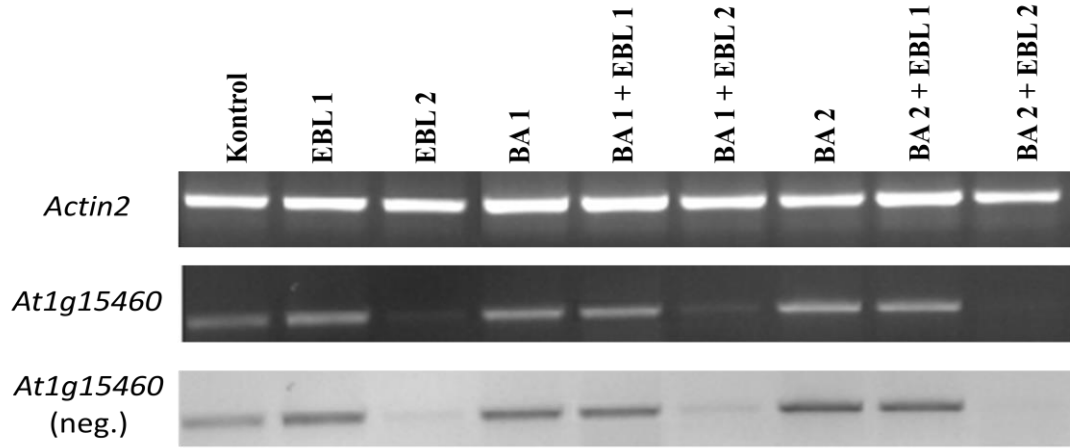


(a)

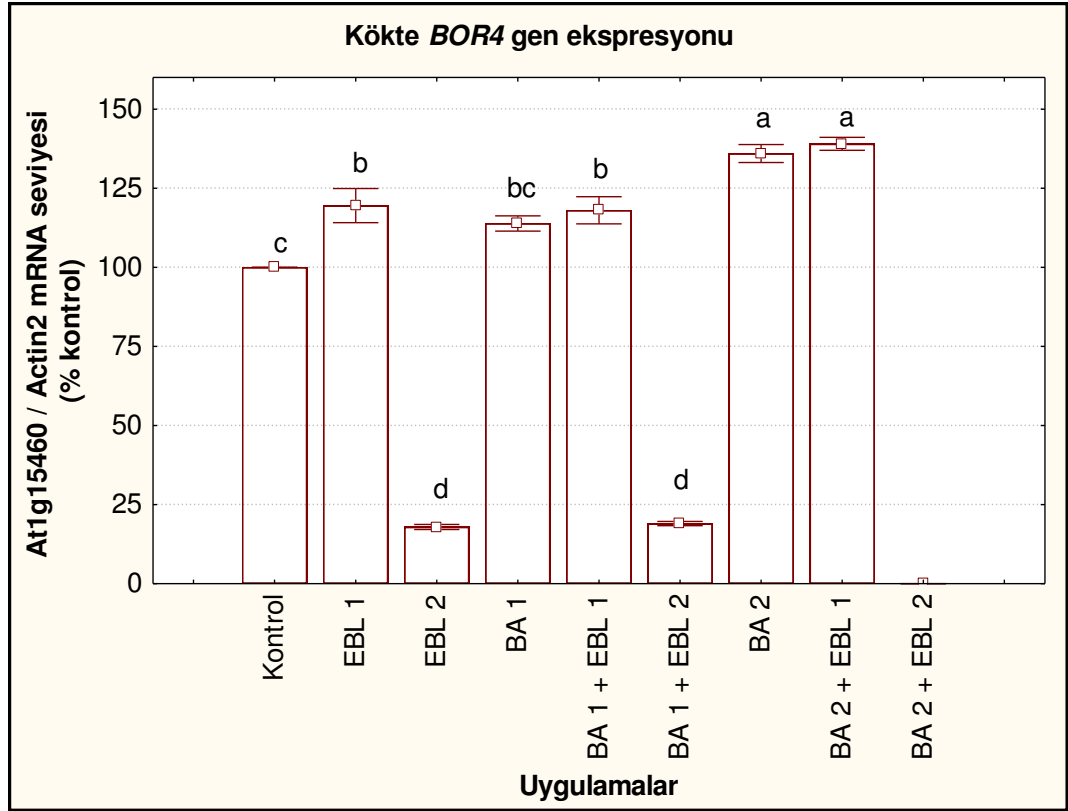


(b)

Şekil 3.38.Kökte At3g06450 (*BOR3*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

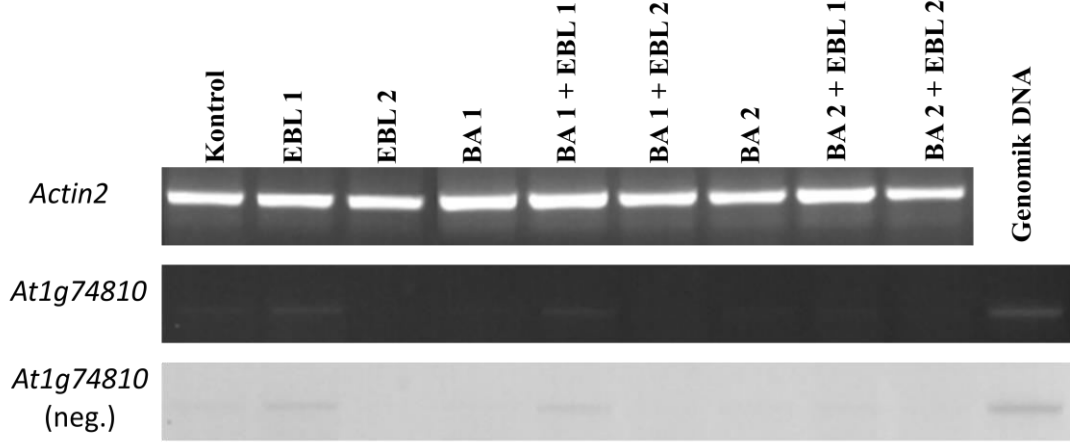


(a)



(b)

Şekil 3.39.Kökte At1g15460 (*BOR4*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



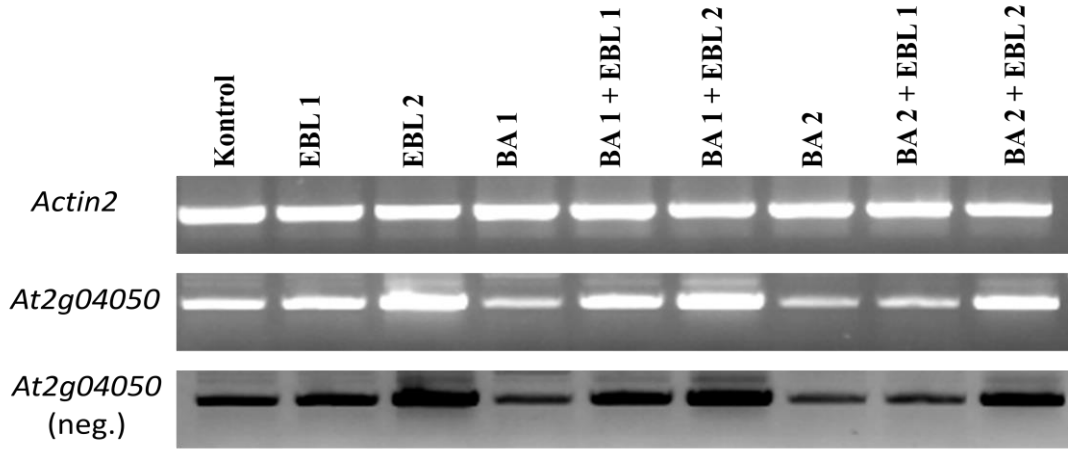
Şekil 3.40.Kökte At1g74810 (*BOR5*) genine ait jel resmi

Kök örneklerinde At1g74810 (*BOR5*) genine ait bazı örneklerde çok az ekspresyon gözlenmiştir. Fakat RT-PCR reaksiyonunun tekrarlanması sonucu tutarlı sonuçlar elde edilememesinden dolayı değerlendirilmemiştir (Şekil 3.40.)

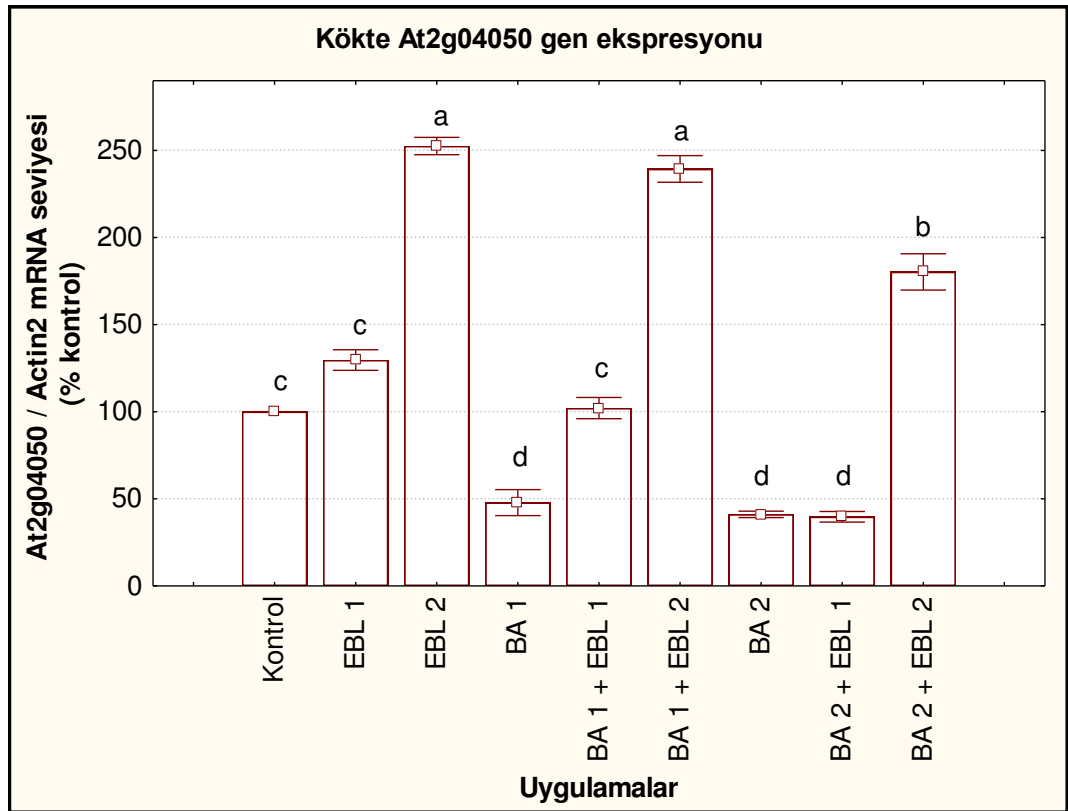
50 ve 100 ppm borik asit uygulamaları sonucu At2g04050 geninin ekspresyonundakontrolle göre sırasıyla 2,08 ve 2,43 oranında azalmalar tespit edilmiştir (Çizelge 3.17.). Tek başına ya da 100 ppm borik asit uygulamalarıyla birlikte yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması ekspresyonu kontrole ve 100 ppm borik asit uygulamasına göre değiştirmemiştir. 50 ppm borik asit ile birlikte yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması ise At2g04050 geninin ekspresyonu arttırmıştır. Yapılan uygulamalar arasında ekspresyonu en çok arttıran uygulama ise 1 μ M EBL olmuştur. 1 μ M EBL uygulaması tek başına ya da borik asit uygulamalarıyla (50 ve 100 ppm) birlikte ekspresyonu kontrole göre sırasıyla 2,52, 5,00 ve 4,38 oranlarında arttırmıştır (Şekil 3.41.).

At5g51440 geninin ekspresyonu borik asit uygulamaları ile artış göstermiş ve bu artışlar benzer oranlarda olmuştur. Düşük konsantrasyonda (0,01 μ M) yapılan EBL uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını 1,75 oranında arttırmıştır (Çizelge 3.17.). Fakat borik asit uygulamaları ile birlikte yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması tek başına yapılan borik asit uygulamalarından farklı bir ekspresyon oranı göstermemiştir. 1 μ M EBL uygulaması ise At2g04050 genine benzer şekilde At5g51440 geninin ekspresyonunda da artışlara sebep olmuştur (Şekil 3.42.). Tek başına, 50 veya 100 ppm borik asit ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulaması

ekspresyonu kontrole göre benzer oranlarda (sırasıyla 2,71, 2,49, 2,82) arttırmış ve bu artışlar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Çizelge 3.17.).

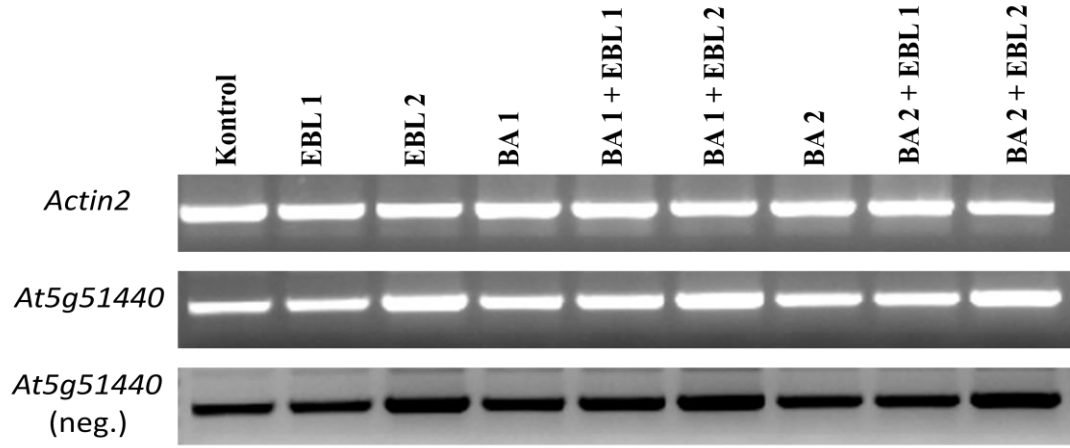


(a)

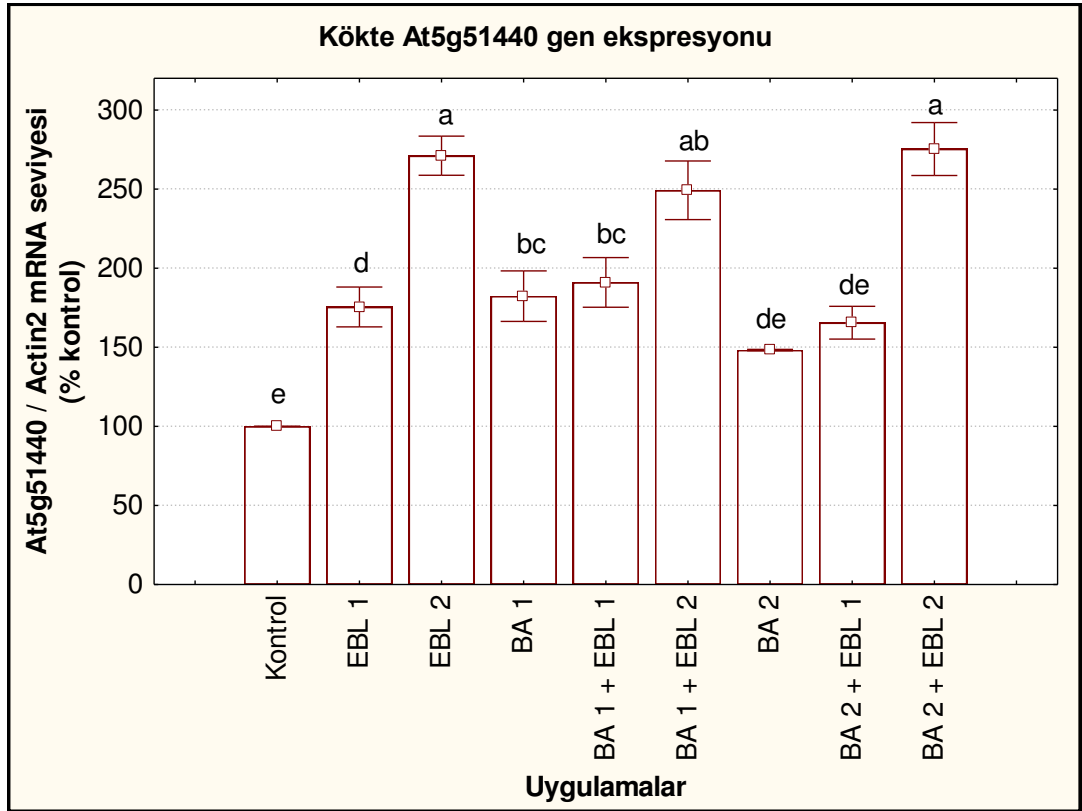


(b)

Şekil 3.41.Kökte At2g04050 (MATE) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)



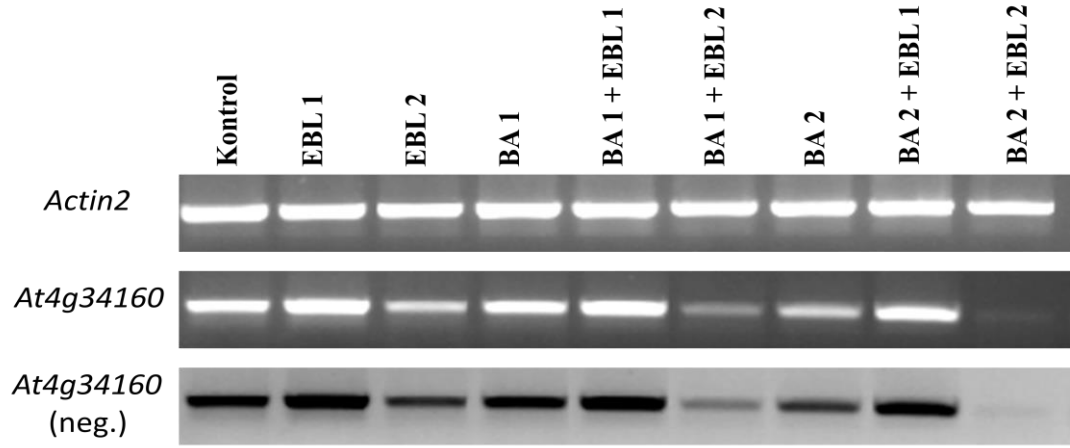
(b)

Şekil 3.42.Kökte At5g51440 (*Hsp-like*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

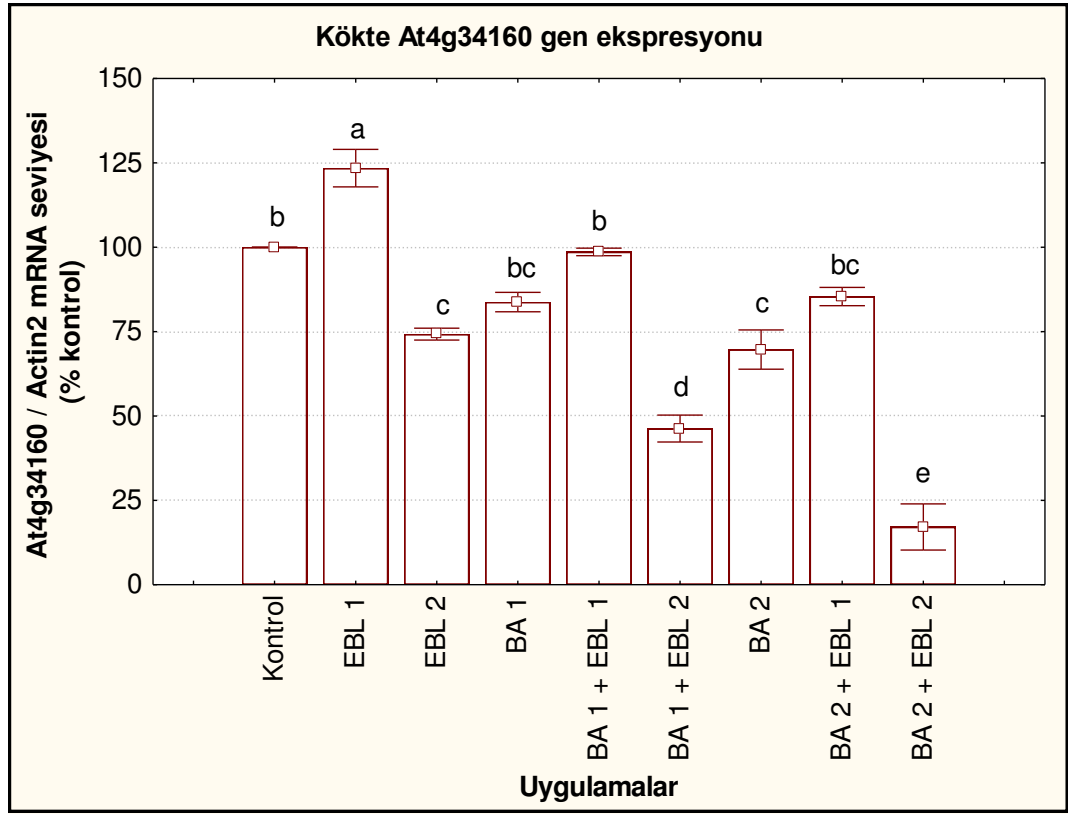
At4g34160 geninin ekspresyonu artan borik asit konsantrasyonları ile azalır iken, düşük konsantrasyonda (0,01 μ M) EBL uygulaması tek başına yada borik asit ile birlikte uygulandığında ekspresyonda istatistiki bakımdan önemli artışlara neden olmuştur. Yüksek konsantrasyon EBL (1 μ M) uygulaması ise tek başına yada borik asit (50 ve 100 ppm) ile birlikte uygulandığında kontrole göre belirgin oranlarda azalmalara (sırasıyla 1,34, 2,69 ve 6,27) neden olmuştur (Şekil 3.43.).

At5g57560 geninin ekspresyonu tek başına yapılan EBL uygulamaları sonucu istatistiki olarak anlamlı oranlarda artmıştır. 100 ppm borik asit uygulaması kontrole göre ekspresyonu arttırırken, EBL uygulamaları içinde en fazla artış 100 ppm borik asit ile birlikte uygulanan 1 μ M EBL sonucu alınmıştır (Şekil 3.44. ve Çizelge 3.17.).

Borik asit ve 0,01 μ M EBL uygulamaları At5g49720 geninin ekspresyonunu kontrole göre ya düşük oranda arttırmış yada değiştirmemiştir (Şekil 3.45.). 1 μ M EBL uygulaması tek başına ya da borik asit uygulamaları ile birlikte ekspresyonu sırasıyla 2,45 ve yaklaşık 1,90 oranlarında arttırmışlardır (Şekil 3.45.).

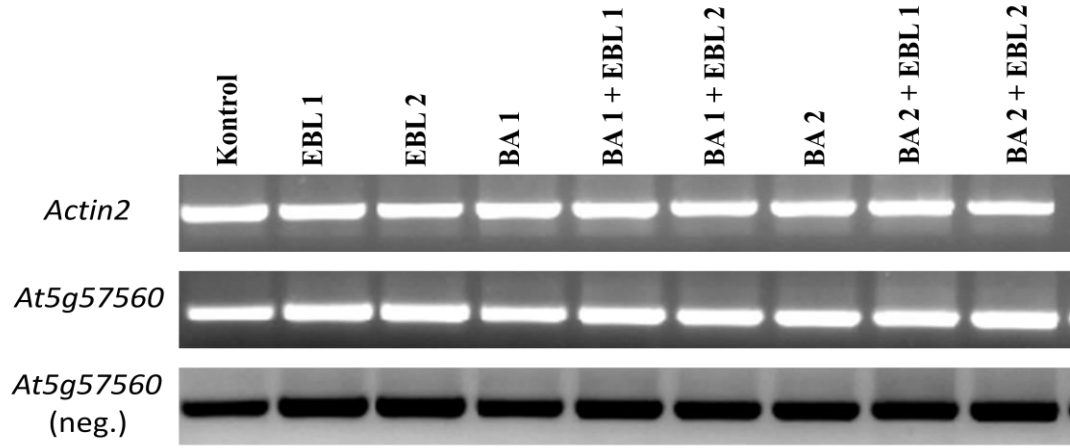


(a)

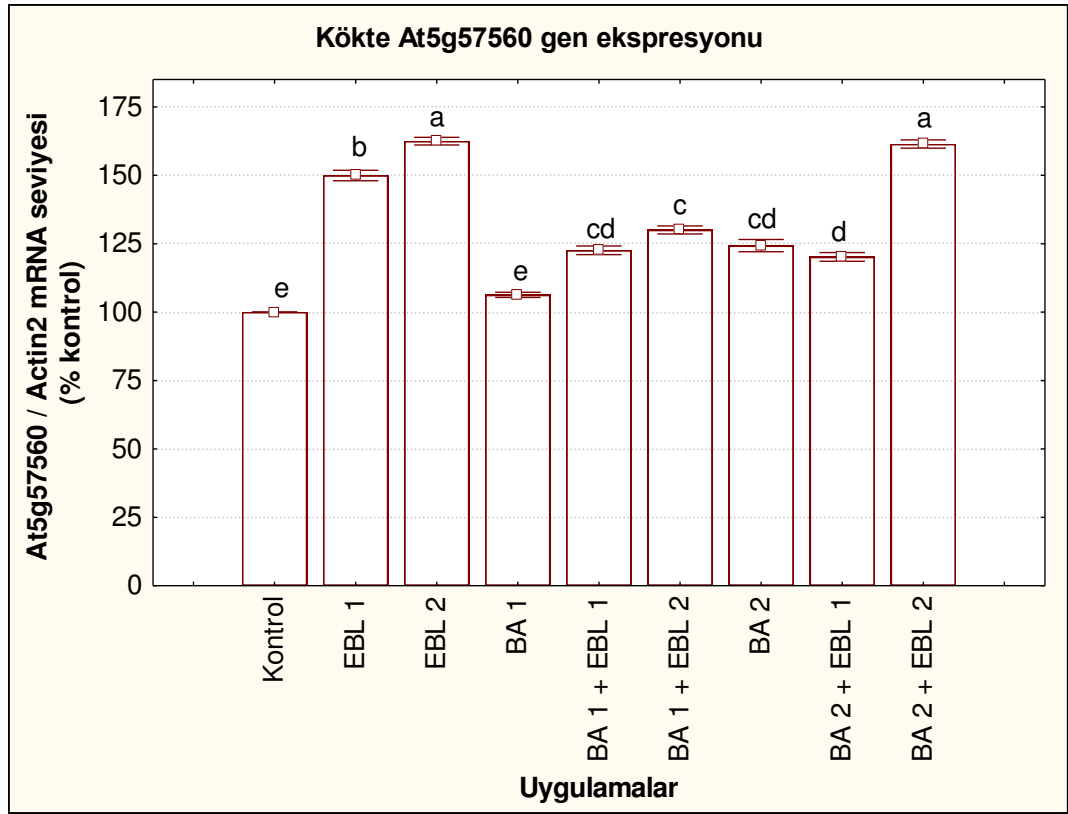


(b)

Şekil 3.43.Kökte At4g34160 (*CycD3;1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

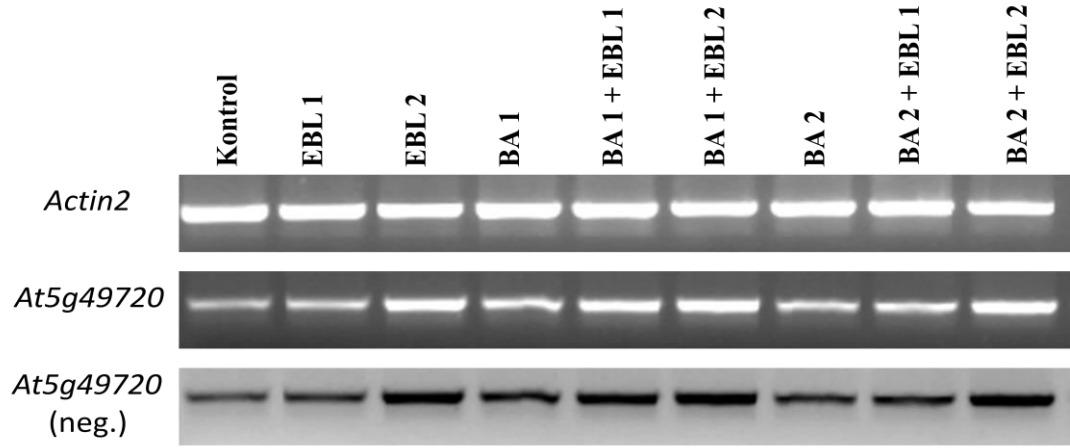


(a)

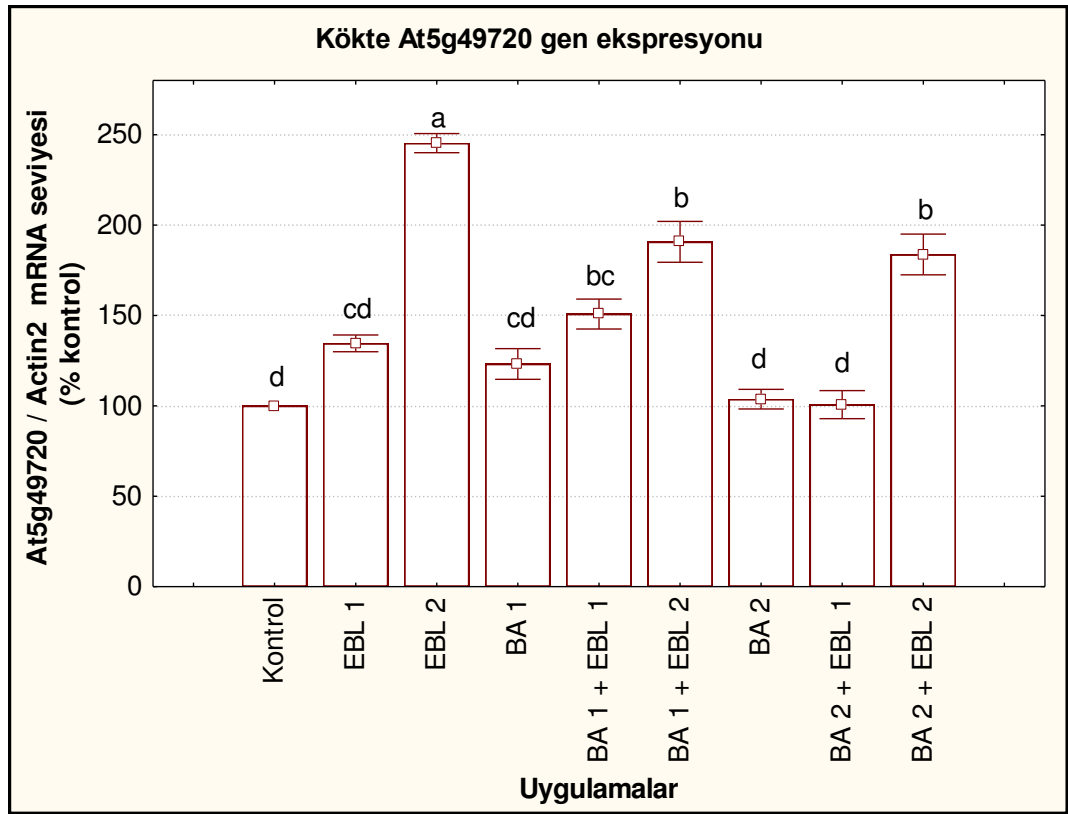


(b)

Şekil 3.44.Kökte At5g57560 (*TCH4*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)

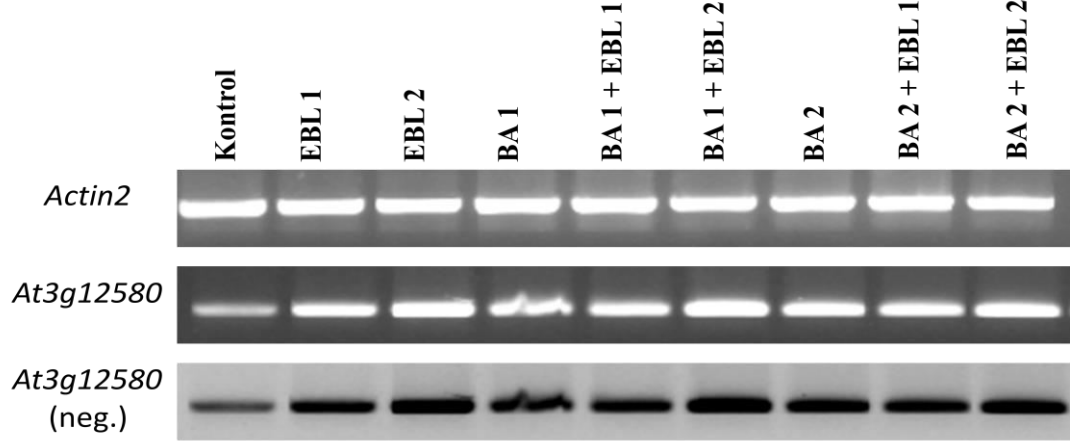


(b)

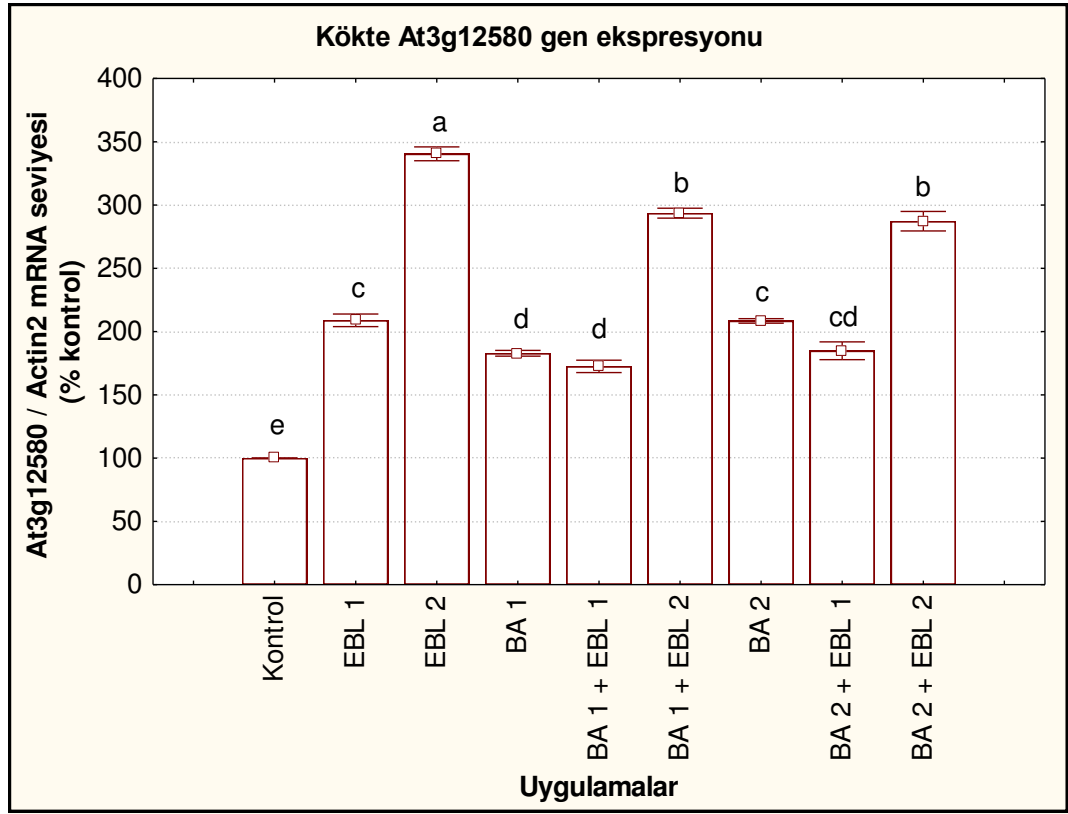
Şekil 3.45.Kökte At5g49720 (*KOR*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

At3g12580 geninin ekspresyonu 50 ppm borik asit uygulaması sonucu 1,82, 100 ppm borik asit uygulaması sonucu ise 2,08 oranında artmıştır. Tek başına yapılan 0,01 μ M EBL uygulaması ise kontrole göre ekspresyonu 2,08 oranında arttırmıştır (Çizelge 3.17.). 1 μ M EBL uygulaması tek başına ekspresyonu 3,40, 50 ve 100 ppm borik asit uygulamalarıyla birlikte ise kontrole göre sırasıyla 2,93 ve 2,87 oranlarında arttırmıştır (Şekil 3.46.).

Borik asit uygulamaları sonucu ekspresyonu artan diğer bir gen ise At5g52640 olmuştur. Düşük konsantrasyonda (0,01 μ M) EBL uygulaması ekspresyon oranını kontrole göre 1,65 oranında, 50 ppm borik asit ile birlikte uygulandığında ise 2,53 oranında arttırmıştır. At5g52640 geninin ekspresyonu yüksek konsantrasyonda EBL (1 μ M) uygulaması sonucu kontrole göre 3,19 oranında artarken, borik asit ile birlikte uygulandığında ise bu oranın daha fazla arttığı ve bu artışların istatistiki bakımdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.47.).

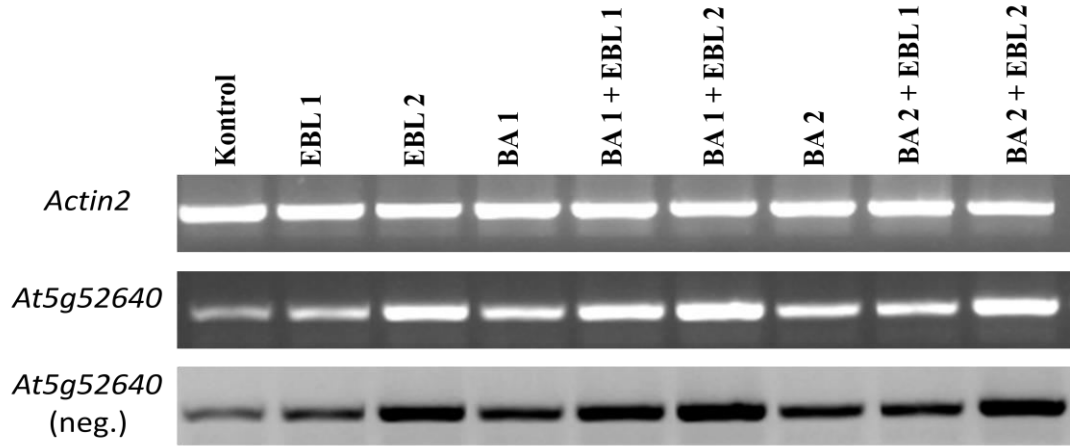


(a)

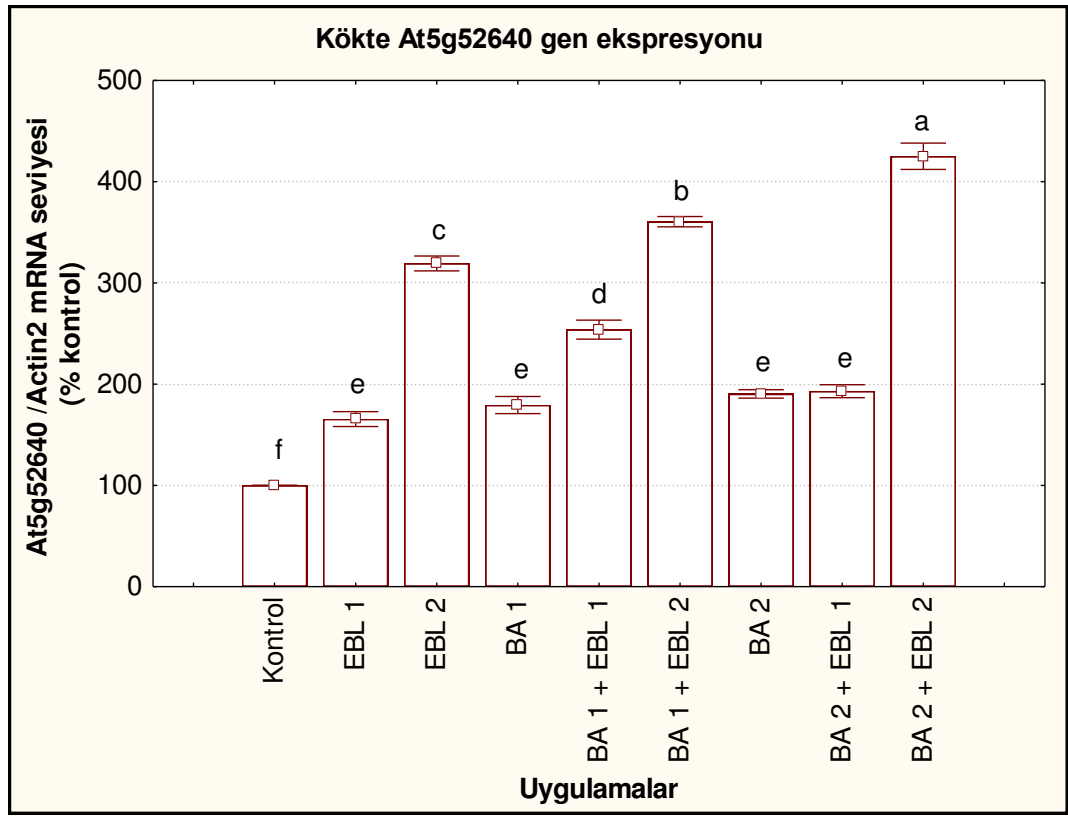


(b)

Şekil 3.46.Kökte At3g12580 (*Hsp70-4*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)

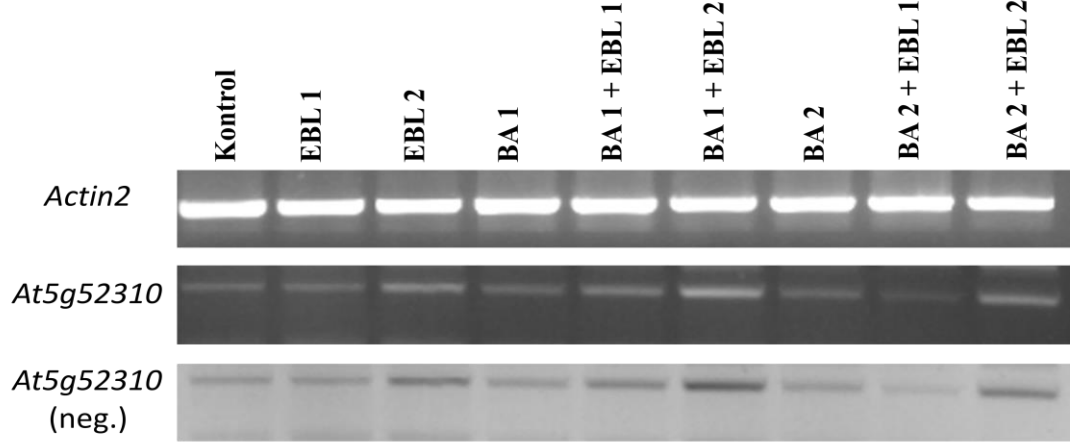


(b)

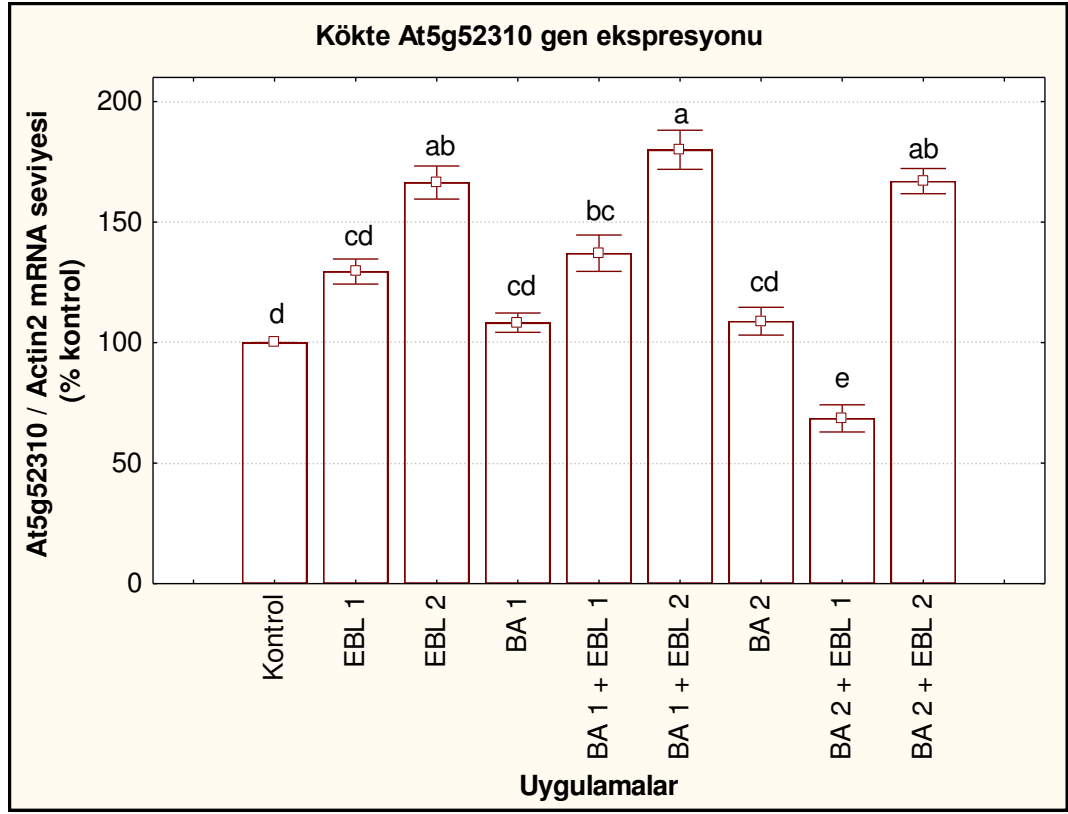
Şekil 3.47.Kökte At5g52640 (*Hsp90-1*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

Borik asit uygulamaları sonucu At5g52310 geninin ekspresyonu kontrole benzer ekspresyon seviyeleri göstermiştir. Tek başına 1 μ M EBL uygulaması kontrole göre ekspresyonu 1,66 oranında arttırırken, 50 ppm borik asit ile birlikte uygulandığında, 50 ppm borik asit uygulamasına göre 1,83, 100 ppm borik asit ile birlikte uygulandığında ise 100 ppm borik asit uygulamasına göre ekspresyonun 1,65 oranında artmasını sağlamıştır (Şekil 3.48. ve Çizelge 3.17.).

Artan borik asit konsantrasyonları ile birlikte At5g06760 geninin ekspresyonu artmış fakat 100 ppm borik asitin neden olduğu artış istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. Tek başına yapılan 1 μ M EBL uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını arttırırken, borik asit uygulamalarıyla birlikte uygulanması sonucu gözlenen artış yada azalmalar düşük oranlarda olmuştur. 100 ppm borik asit uygulaması ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulaması kontrole göre ekspresyon oranını 1,61 oranında arttırmıştır (Şekil 3.49. ve Çizelge 3.17.).

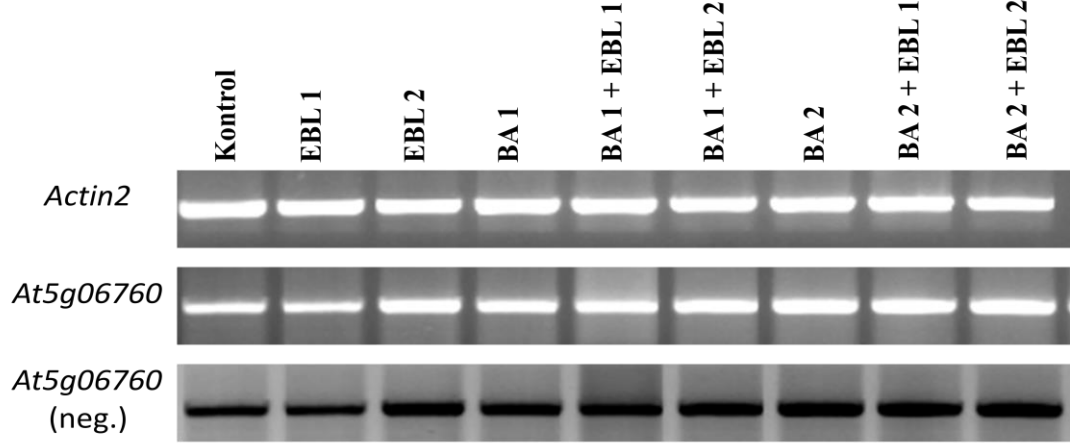


(a)

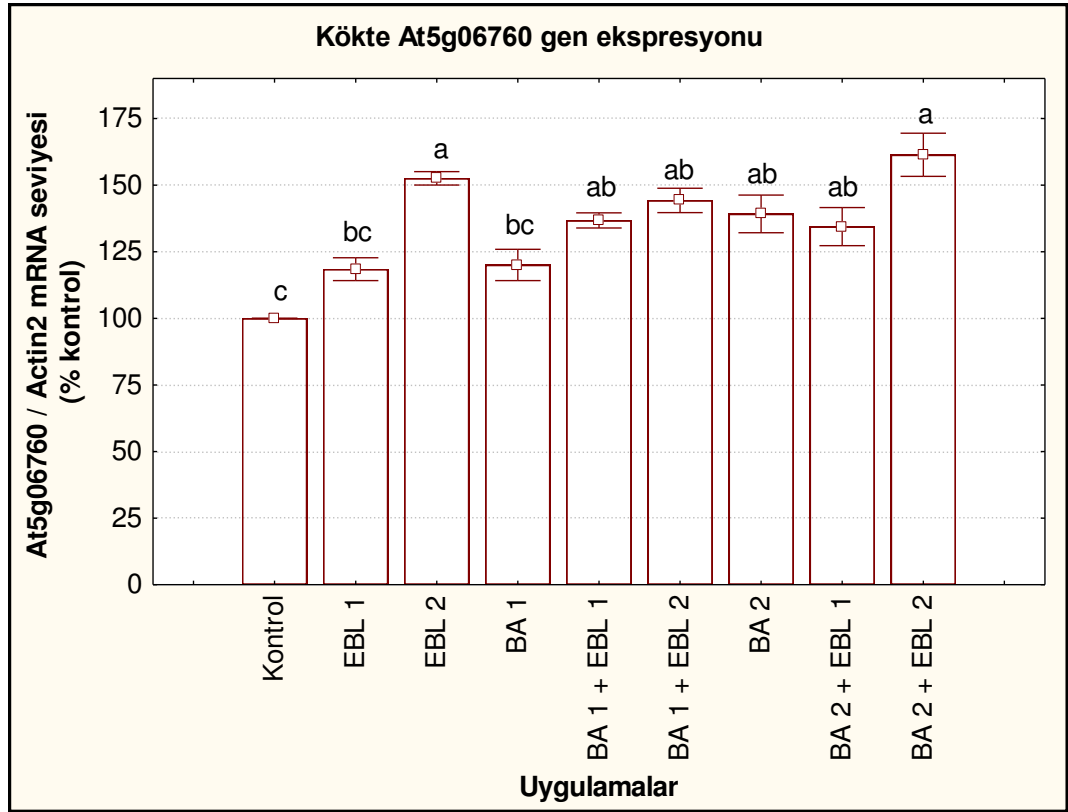


(b)

Şekil 3.48.Kökte At5g52310 (*LTI/COR78*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi yapılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).



(a)



(b)

Şekil 3.49.Kökte At5g06760 (*LEA4-5*) genine ait (a) jel resmi ve (b) mRNA seviye grafiği. Tukey HSD testi kullanılmıştır ($P < 0.05$, $\pm$ standart hata değeri).

Çizelge 3.17.Dokuz farklı uygulamaya maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin kök örneklerinde belirlenen14 adet genin mRNA seviyelerinin kontrole göre oransal değişimleri

Gen isimleri	Uygulamalar								
	Kontrol	EBL 1	EBL 2	BA1	BA 1 + EBL 1	BA 1 + EBL 2	BA 2	BA 2 + EBL 1	BA 2 + EBL 2
At2g47160 (BOR1)	1,00 ± 0,00	1,12 ± 0,02	-2,45 ± 0,05	-1,35 ± 0,04	-1,32 ± 0,04	-3,47 ± 0,05	-1,47 ± 0,04	-1,69 ± 0,04	-7,58 ± 0,01
At3g62270 (BOR2)	1,00 ± 0,00	2,08 ± 0,02	2,23 ± 0,05	1,81 ± 0,10	2,14 ± 0,08	2,25 ± 0,08	2,20 ± 0,08	2,19 ± 0,06	2,38 ± 0,01
At3g06450 (BOR3)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-1,70 ± 0,01	-1,47 ± 0,04	-1,52 ± 0,05	-2,75 ± 0,03	-1,58 ± 0,02	-1,79 ± 0,02	- 4,99 ± 0,03
At1g15460 (BOR4)	1,00 ± 0,00	1,19 ± 0,05	-5,57 ± 0,00	1,13 ± 0,02	1,18 ± 0,04	-5,26 ± 0,00	1,35 ± 0,02	1,39 ± 0,02	-10,00 ± 0,00
At1g74810 (BOR5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
At2g04050 (MATE)	1,00 ± 0,00	1,29 ± 0,06	2,52 ± 0,05	-2,08 ± 0,07	1,02 ± 0,06	2,39 ± 0,08	-2,43 ± 0,01	-2,51 ± 0,03	1,80 ± 0,10

Çizelge 3.17. (devam)

At5g51440 (<i>Hsp-like</i>)	1,00 ± 0,00	1,75 ± 0,13	2,71 ± 0,13	1,82 ± 0,16	1,91 ± 0,16	2,49 ± 0,19	1,48 ± 0,04	1,65 ± 0,10	2,82 ± 0,17
At4g34160 (<i>CycD3;1</i>)	1,00 ± 0,00	1,33 ± 0,01	-1,34 ± 0,01	-1,17 ± 0,03	-0,01 ± 0,00	-2,69 ± 0,02	-1,79 ± 0,03	-1,32 ± 0,00	-6,27 ± 0,04
At5g57560 (<i>TCH4</i>)	1,00 ± 0,00	1,51 ± 0,05	1,62 ± 0,01	1,07 ± 0,02	1,21 ± 0,02	1,30 ± 0,01	1,34 ± 0,05	1,30 ± 0,05	1,71 ± 0,05
At5g49720 (<i>KOR</i>)	1,00 ± 0,00	1,34 ± 0,04	2,45 ± 0,05	1,23 ± 0,08	1,50 ± 0,08	1,90 ± 0,11	1,03 ± 0,05	1,00 ± 0,08	1,83 ± 0,11
At3g12580 (<i>Hsp70-4</i>)	1,00 ± 0,00	2,08 ± 0,05	3,40 ± 0,05	1,82 ± 0,02	1,72 ± 0,05	2,93 ± 0,04	2,08 ± 0,01	1,84 ± 0,07	2,87 ± 0,08
At5g52640 (<i>Hsp90-1</i>)	1,00 ± 0,00	1,65 ± 0,07	3,19 ± 0,07	1,79 ± 0,08	2,53 ± 0,09	3,60 ± 0,05	1,90 ± 0,04	1,93 ± 0,06	4,25 ± 0,13
At5g52310 (<i>LTI/COR78</i>)	1,00 ± 0,00	1,16 ± 0,06	1,56 ± 0,10	-1,43 ± 0,08	-1,1 ± 0,08	1,26 ± 0,10	1,40 ± 0,03	-2,20 ± 0,11	1,33 ± 0,13
At5g06760 (<i>LEA4-5</i>)	1,00 ± 0,00	1,18 ± 0,04	1,52 ± 0,02	1,20 ± 0,06	1,36 ± 0,02	1,44 ± 0,04	1,39 ± 0,07	1,34 ± 0,07	1,61 ± 0,08

"-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde artma oranlarını ifade etmektedir, ± standart hata değerleridir.

4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Biyokimyasal Araştırmalar ile İlgili Tartışma ve Öneriler

Laboratuvarımızda modifiye edilen hidroponik kültür sistemi ile yapılan uygulamalar için maksimum cevabın alınması hedeflenmiş, kontrollü ortam şartlarında uniform Arabidopsis bitkileri yetiştirilmiş ve kök gelişimi sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen sistemin ekipmanları tekrar tekrar kullanılabilir olması, maliyetinin ucuz olması ve birkaç ufak değişiklik ile diğer bitkilerde uygulanabilir olması avantajlarını oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmada, özellikle yüksek bor konsantrasyonunda (100 ppm) araştırılan büyüme parametrelerinde önemli azalmalar gözlenmiştir. Yüksek bor konsantrasyonu altında, borun dokulardaki yüksek orandaki birikimi, normal biyosentez aktivitelerini ve protein sentezini engelleyerek birçok hücrel proseslerde ve dolayısıyla büyümede gecikmeye neden olmuştur (Yusuf vd., 2011). Borik asit uygulamaları ile biyokütledeki azalmaya klorofil içeriğinin düşmesi ve devamında fotosentez inhibisyonunun sebep olabileceği düşünülmektedir. Borik asit uygulamalarını takiben yapılan ekzogen EBL uygulamaları sonucu, araştırılan büyüme parametrelerinde (gövde yaş ve kuru ağırlığı, yaprak alanı, meyve boyu ve ağırlığı) iyileşmeler gözlenmiştir. Stres koşulları altında ekzogen BR uygulamaları sonucu, bitki dokularında geniş spektrumda reaksiyoların tetiklendiği gözlenmiştir (Bajguz, 2000). BR'ler nükleik asit ve protein sentezini teşvik etmekte, su alımını, enzim aktivitelerini ve fotosentez oranını hızlandırmaktadır. Düzenlenen bütün bu işlevlerin kümülatif olarak etkisi ise bitkide gelişimi teşvik etmektedir (Ali vd., 2008).

Konuya ilişkin moleküler çalışmaları içeren literatürlerin bulguları, bu çalışmanın sonuçlarını destekleyici niteliktedir. β -tubulin geninin ekspresyonunun nohut ve Arabidopsis'te brassinolidin büyümeyi teşvik edici etkisi ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Araştırmacılar, brassinosteroid-duyarlı bir yolak olduğunu ve bu yolağın mikrotübül organizasyonunda ve hücre uzamasına imkan verdiğini belirtmişlerdir (Sasse, 2003). BR'lerin biyokütle üzerine pozitif etkileri, Xie vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada ortaya konulmuş olup, BR'lerin Arabidopsiste selüloz sentetaz geninin ekspresyonunu kontrol ederek selüloz biyosentezini teşvik ettiği ki bu genin Arabidopsiste toplam biyokütle birikiminde önemli katkısı bulunduğu gösterilmiştir.

Bor toksisitesinin bilinen semptomlarından birisi de kök gelişiminin inhibe olmasıdır (Reid vd., 2004; Aquea vd., 2012). Yaptığımız çalışmada 100 ppm borik asit uygulaması kök örneklerinin yaş ağırlığında ve primer kök uzunluğunda kontrol ile kıyaslandığında önemli bir oranda azalmaya neden olmuştur. Yüksek konsantrasyonda borun kök hücrelerinde genotoksik yıkım oluşturduğu, bu durumun moleküler çerçevede hücre döngüsünü modifiye ettiği ve kök gelişimini inhibe ettiği bulunmuş ve bu sonuç 2011 yılında bor toksisite mekanizmasının DNA'nın çift zincirini kırdığını ve mümkün olan replikasyonu bloke ettiğini öne süren makale ile desteklenmiştir (Aquea vd., 2012). Bizim çalışmamızda borun kök büyümesindeki olumsuz etkisine karşı EBL uygulamalarının kök yaş ve kuru ağırlığı ile kök uzunluğuna önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, borik asit uygulamaları sonucu yaprak alanında meydana gelen azalmalara karşı yapılan EBL uygulamaları yaprak alanında önemli artışlara sebep olmuştur. Bu sonuç, yaprakların EBL ile muamelesinin etki ettiği yüzey alanına bağlı olarak hücre bölünmesini ve/veya hücreSEL büyüme ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik ettiği sonucuna götürmüştür (Clouse ve Sasse, 1998). Sasse (2003), EBL'in Arabidopsis kallus ve süspansiyon kültürlerinde özellikle hücre döngüsünde önemli olan *CycD3* geninin ekspresyonunu arttırdığını belirlemiş, *CycD3;1* geninin yüksek oranda ekspresyonunun yaprak anatomisini belirgin bir şekilde etkilediğini ve hücreSEL çoğalmadan farklılaşmaya geçişte kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

Yaptığımız çalışmada bor uygulamalı bitkilerin alt yaprak uçlarında klorotik ya da nekrotik bölgeler gözlenmiştir. Bu durumun, borun yaşlı (olgun) yapraklarda birikmesi sonucu önce uç daha sonra laminaya yayılmasıyla oluşan toksik etki olup nekrotik bölgeleri meydana getirdiği belirtilmektedir (Kastori vd., 2008; Herrera-Rodriguez vd., 2010).

Daha detyalı olarak borun teşvik ettiği oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) yaprak alanında hücre ölümlerine neden olması sonucu bu bölgeler gözlenmekte olup bu durum fotosentezi negatif etkileyerek, büyük ölçüde karbon asimilasyonunu azaltmaktadır (Landi vd., 2013).

Bor toksisitesinin diğer olumsuz etkilerinden biri de, meyve verimi üzerine olmakla birlikte bunun uzun süre bor uygulaması sonucu oluşan indirek bir etki olduğu belirtilmektedir. Yüksek bor konsantrasyonu altında kök gelişimi inhibe olmakta, esansiyel besinler ve su alınımları sınırlanmakta, yapraklardaki nekrozis fotosentezi düşürmekte ve böylece meyve, tohum ve generatif organ gelişimi olumsuz etkilenmektedir (Reid, 2007). Çalışmamızda, EBL uygulamaları tek başına ya da borik asit uygulamalarını takiben yapıldığında meyve verimine ilişkin parametrelerde önemli artışlar sağladığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde meyve verimine ilişkin olumlu etkiler, kadmiyum uygulamasını takiben yapılan BR uygulaması sonucu domates bitkilerinde de elde edilmiştir (Hayat vd., 2012). Fu vd. (2008) yaptıkları çalışmada BR'lerin meyve gelişimde regülatör rol oynadığını ve bununla birlikte meyve gelişiminin kompleks bir süreç olduğunu belirterek BR'lerin diğer fitohormonlarla bu süreçte kolektif bir rolde oynayabileceğini öngörmüşlerdir.

Bitkide reaktif oksijen türlerinin artması fotosentetik pigmentlerin degradasyonuna sebep olmakta ve bu durum fotosentezi azaltmaktadır (Jiang vd., 2012). Bununla birlikte bor uygulamasının dozuna bağlı olarak, fotosentez oranında azalma görülmesinin sebebi yüksek miktarda bor nedeniyle tilakoidlerin yapısında bozulmalar olması ve böylece elektronların fotosentezde taşınımının etkilenmesi olarak düşünülmektedir (Yusuf vd., 2011). Ayrıca Benson-Calvin döngüsünün kritik enzimi olan RuBisCo direkt olarak ROS tarafından parçalanmaktadır (Ahammed vd., 2013). Yaptığımız çalışmada, artan bor konsantrasyonuna paralel olarak pigment içeriğinde azalma meydana gelmiş ve borik asit uygulamasını takiben yapılan EBL uygulamaları pigment içeriğinin önemli oranda artmasını sağlamıştır.

BR'lerin Benson-Calvin döngüsündeki fotosentetik genlerin transkripsiyonu ve bazı enzimlerin aktivitesini arttırarak fotosentetik kapasiteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Bajguz, 2000; Jiang vd., 2012; Zhang vd., 2013). Fotosentetik aktivitedeki bu artış, senesensi geciktirmekte ve bitkinin vejetatif kısımlarında büyümeyi teşvik etmektedir (Shahbaz vd., 2008; Zhang vd., 2013).

Bitkiler strese maruz kaldıklarında, üretilen reaktif oksijen türleri, birçok hücrel molekülü ve metabolitleri etkilemekte, böylece hücrel yıkıma sebep olan birçok zararlı sürece yol açmaktadır (El-Khallal vd., 2009). Bu durumda bitkiler, antioksidan metabolitlerin (prolin, karotenoid, glutatyon vb.) ve enzimlerin (SOD, CAT, POX vb.) sentezlerini arttırarak, süperoksit radikali, hidroksil iyonları ve hidrojen peroksit gibi oluşan reaktif oksijen türlerine direnç sağlamaya çalışmakta ve böylece oluşan toksik etkiyi nötralize etmeye çalışmaktadır (Schutzendubel ve Polle, 2002). Çalışmamızda, borik asit uygulamasına bağlı olarak antioksidan sistemin aktivitesi artmış, hücrel ROS üretimi stres oluşturmuş ve borik asit uygulaması yapılan bitkilerde büyümede kayıplara yol açmıştır. Diğer taraftan tek başına ya da borik asitle birlikte yapılan EBL uygulamalarında antioksidan enzim aktivitelerinin arttırmıştır. Benzer çalışmalarda ekzogen brassinosteroid uygulamaları sonucu, tuz (Shahbaz vd., 2008), ağır metal (Sharma vd., 2008; Bajguz, 2010; Anuradha ve Ram Rao, 2011; Hasan vd., 2011), yüksek ısı (Ogweno vd., 2008) ve kuraklık (Fariduddin vd., 2009) streslerine karşı antioksidan enzim aktivitelerini teşvik ederek, toleransı arttırdıkları tespit edilmiştir. EBL uygulamalarıyla birlikte, antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen sentez ya da aktivasyonun, spesifik genlerin transkripsiyonu ve/veya translasyonu ile meydana geldiği (Bajguz, 2000; El-Khallal vd., 2009) ve bunun bitkiyi daha dayanıklı hale getirdiği böylece borun oluşturduğu toksik etkiyi engellediği öngörülmüştür. Ayrıca, Cao vd. (2005), antioksidan enzimlerin artmasının moleküler, fizyolojik ve genetik yaklaşımların temelinin Arabidospiste BR biyosentezinde önemli genlerden biri olan *DET2* geninin ekspresyonunun artmasına bağlı olduğunu, böylece oksidatif strese dayanıklılığın arttığını belirtmişlerdir. Brassinosteroidlerin çevresel streslere karşı toleransı artırma mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamakla birlikte detaylı moleküler yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bilindiği gibi, serbest radikaller membranlarda lipid peroksidasyonunu teşvik etmekte ve bu durum, hücrel seviyede strese bağlı yıkım olarak yansımaktadır (Jain vd., 2001). H_2O_2 artışına bağlı olarak Haber-Weiss reaksiyonu hızlanmakta, $OH^\cdot$ oluşmakta ve böylece lipid peroksidasyonu gerçekleşmektedir (Mittler, 2002; Yuan vd., 2010). Çalışmamızda, 50 ve 100 ppm borik asit uygulamalarının kontrole göre MDA miktarlarını belirgin düzeyde arttırdığını tespit ettik.

EBL uygulamaları sonucu MDA miktarlarında azalmalar meydana gelmekle birlikte, düşük konsantrasyonda EBL uygulaması bu azalmalarda daha etkili olmuştur. BR'ler stres koşulları altında membran yapısını/stabilitesini modifiye etmekte, stresli ya da stressiz koşullar altında EBL uygulaması sonucu, hücreler yüksek membran stabilite indeksine sahip olmakta ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu azaltmaktadır (Hamada, 1986). Buna ilaveten, EBL uygulamalarının MDA seviyesinde azalmaya neden olması brassinosteroidlerin antioksidan enzim aktivitesini artırarak reaktif oksijen türlerini etkili bir şekilde etkisiz hale getirmesi sonucunda desteklemektedir (Ahammed vd., 2013).

Bitki yapraklarında yüksek oranda bor birikiminin olması ozmotik dengesizliğe yol açmakta ve böylece bitki hücrelerinin fotooksidatif yıkımına karşı direnme kapasitesini düşürebileceği belirtilmektedir. Bu durumda membran sızıntısının, lipidlerin peroksidasyonunun ve prolin birikiminin artabileceği tespit edilmiştir (Reid, 2007). Prolin, karbon ve nitrojen kaynağı olarak stres altında hızlı bir dönüşüm sağlamakta ve plazma membranını, bazı makromolekülleri ve serbest radikalleri stabilize ederek bitkileri ekstrem stres koşullarında korumaktadır (Ali vd., 2008). Bu çalışmanın sonuçlarından biri de artan borik asit konsantrasyonları ile birlikte prolin miktarlarının artması ve EBL uygulamalarının bu miktarları daha da arttırmasıdır. Zeng vd. (2010), Arabidopsis'in *det2-1* ve *bin2-1* mutanlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, tuz stresi altında BR uygulamaları sonucumutantların kısmen kurtarıldığını ve prolin akümüülasyonunun arttığını ortaya koymuşlardır.

Toksisite mekanizması enzimler, polinükleotidler gibi önemli moleküllerin fonksiyonel grupları ile önemli besin elementleri ve iyonları taşıyıcı sistemlerin bloke edilmesini, gerekli iyonların hücrel yerlerinin değişmesi ve/veya yerlerine başka iyonların geçmesini, enzimlerin denatürasyonu ve inaktivasyonunu sağlayarak hücre ve organellerin membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır (Bajguz ve Hayat, 2009). Bu problemlere rağmen bitkiler, birçok mekanizma ile metal iyonlarının toksisitesini düşürmektedir. Bu mekanizmalar hücre duvarında ağır metallerin immobilize (hareketsiz) olmaları, metal alınıminin plazma membranında azalması, metallerin vakuollerde ayrı tutulması ile metal iyonlarının sitoplazmada bulunan fitoşelatinler ile kompleks yapması olarak sıralanabilir (Bajguz, 2010).

Bitkilerde borun alınımı, membran geçirgenliği, internal kompleks formasyon ve terleme oranına bağlı olarak genellikle pasif olmaktadır (Hu ve Brown, 1997).

Borun köklerden gövdeye doğru olan hareketi ksilemin cansız hücrelerinde tek yönlü terleme yolu ile gerçekleşmektedir. Bunun tersi olarak uzun mesafe taşımalar floemde canlı hücrelerde olmakta iki yönlü olarak gerçekleşmektedir. Floem taşıması terlemeden bağımsız olarak genç yapraklar, meyve, tohum gibi aktif büyüyen alanlara besin ihtiyacını desteklemek amacıyla gerçekleşmektedir (Brown ve Shelp, 1997).

Yüksek bor konsantrasyonu altında bitkilerde gözlenen morfolojik değişikliklerin fazla borun indikatörü olarak güvenilir sonuçlar vermeyeceği çünkü diğer elementlerin fazlalığının da benzer semptomlar verebileceği belirtilmiştir. Borun meydana getirdiği bu toksik etkileri doğrulamak için bitkinin dokularındaki bor konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir (Kastori vd., 2008). Bu nedenle Arabidopsis bitkilerinde dokulardaki bor birikimini tespit etmek amacıyla yaprak, çiçek salkımı ve kökte bor miktarları ölçülmüştür. Uygulanan bor konsantrasyonuna bağlı olarak bitkinin tüm kısımlarında bor tespit edilmiş ve bu miktar artan bor konsantrasyonu ile paralellik göstermiştir. Bununla birlikte yaprak dokusunda kök dokusuna nazaran daha fazla bor birikimi gözlenmiştir ve bu sonuç farklı bitkilerle yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir (Blevins ve Lukaszewski, 1998; Papadakis vd., 2003; Gunes vd., 2006). Borik asit uygulamalarını takiben yapılan yüksek konsantrasyonda EBL uygulaması (1 μ M) genel olarak analizi yapılan tüm dokularda bor miktarının düşmesine neden olmuştur. Yapılan farklı çalışmalarda, toksik metallerin varlığında membran geçirgenliği ve seçiciliğinin BR uygulamalarından etkilendiği belirtilmiştir. Hangi BR analogu ya da hangi konsantrasyonun hangi metalin etkilerinde iyileşme sağladığı seçilen birçok bitkide ve alg hücrelerinde ortaya koyulmuştur (Sasse, 2003). Bajguz (2000), *Chlorella vulgaris*'de yaptığı çalışmada, BR'lerin metal birikimini bloke edici etkilerinin yanı sıra klorofil, şeker ve protein kaybını önlediğini, fitoşelatin sentezini teşvik ettiğini belirtmiştir. Bununla birlikte, BR konsantrasyonu arttıkça, ağır metal konsantrasyonunda azalma gözlenmiştir.

Ağır metal (kadmiyum, kurşun, bakır, çinko, nikel) birikimi altında BR'in etkileri, *Brassica juncea*, arpa, domates, şeker kamışı ve turp gibi farklı tarımsal bitkilerde de çalışılmıştır (Sharma vd., 2008; Anuradha ve Ram Rao, 2011).

Sonuç olarak, EBL uygulamaları ile düşük konsantrasyonda borun yarattığı stresin etkileri nötralize edilirken, yüksek konsantrasyonda borun yarattığı inhibisyonun kısmen üstesinden gelinmesi sağlanmıştır. Stres koşulları altında bitkilere uygulanan BR'lerin etki dereceleri bitkinin çeşidine, uygulamanın yapıldığı gelişimsel sürece ve uygulama şekline bağlı olarak değişebilmektedir. Bu çalışmada, yapraklara spreyle yöntemi ile uygulama, stres koşulları altında, savunmanın ilk aşamasında BR'lerin noktasal olarak stresi regüle etmesinde kolaylık sağlamıştır.

Moleküler Araştırmalarile İlgili Tartışma ve Öneriler

Diğer organizmalar gibi bitkilerde esansiyel metal iyonlarının farklı hücresel kompartımanlarda doğru konsantrasyonlarda tutularak homeostatik mekanizmayı devam ettirmek ve yüksek konsantrasyonda metal iyonlarına maruz kalmanın oluşturduğu yıkımı minimize etmek zorundadır. Bitki hücresinde mevcut sistemde, metal hücreye alındıktan sonra, dağılımı gerçekleşmektedir. Bir kısmı şaperonlar ve fitoşelatinler tarafından sitosolda inaktif hale getirilmekte, bir kısmı plastid, mitokondri, golgi gibi organellerin zarında bulunan taşıyıcılardan geçiş yaparak organellere girmekte ya da sitosolik proteinlerle birleşmekte iken diğer kısmı tonoplastta bulunan taşıyıcılar yardımıyla vakuolde detoksifiye edilmektedir.

Esansiyel metallerin konsantrasyonunu fizyolojik sınırlarda devam ettirmek ve zararlı etkilerini azaltmak için, metal alınımı, akümüasyonu, dağılımı ve detoksifikasyonu gibi homeostatik mekanizmaların kontrol edilmesi gerekmektedir (Clemens, 2001). Geliştirilen mekanizmalardan bir çoğu, savunma ile ilgili genler olarak bilinen spesifik stres genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu gerektirmektedir (Li ve Yi, 2012). BR'lerin verim ve stres toleransı üzerine olumlu etkisi, tarla ve serada ekonomik olarak önemli birçok bitki için ticari olarak kullanılmaya başlanılmasına sebep olmuştur. Bu kullanımlardan olumlu yanıtlar alınmasına rağmen, bulgularda meydana gelen varyasyonlar, brassinosteroidlerin ticari

kullanımından önce anti-stres etkilerinin daha derin olarak araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Tez çalışmasında, borik asit ve/veya EBL uygulamalarının seçilen 14 genin mRNA seviyesi üzerine etkileriyaprak ve kök dokularında transkripsiyonel düzeyde araştırılmıştır. Ekspresyon seviyesi araştırılan genlerden bir kısmını BOR taşıyıcılarını kodlayan genler (*BOR1-BOR5*) oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bitkilerin topraktaki bor seviyesine göre bor alınımlarını regüle ettikleri ve homeostasiyi sağladıkları ortaya koyulmuştur (Takano vd., 2008). 2002 yılında *Arabidopsis thaliana*'da ilk tanımlanan bor taşıyıcısı BOR1'dir. Borun ortamda limitli olduğu koşullarda BOR1'in normal bitki gelişimi için gerekli olan boru ksileme yüklemeye görev yaptığı ve kökün iç kısmında (stele) periskl hücrelerinin membranında lokalize olduğu tespit edilmiştir (Miwa vd., 2006a; Tanaka ve Fujiwara, 2008). Çalışmamızda ekspresyon seviyesi araştırılan genlerden birisi de *BOR1* geni olmuştur. *BOR1* geninin ekspresyonu, yaprak ve kök dokularında benzer ekspresyon profilleri göstermiş ve her ikisinin de artan borik asit konsantrasyonları ile birlikte ekspresyon seviyelerinde azalmalar tespit edilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada ise BOR1'in borun ortamda yüksek konsantrasyonda bulunduğu durumlarda hızlı bir şekilde endositozis yoluyla vakuolde degradasyona uğradığı saptanmıştır (Kasai vd., 2010). Bu regülasyonun amacı, gövdede yüksek oranda bor akümüülasyonunu önleyerek, bor homeostasisini korumaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgu yani artan borik asit konsantrasyonunda *BOR1* geninin ekspresyonunda azalma görülmesi bor birikimini önlemek amacıyla gerçekleşmektedir ve bu bulgu bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Ayrıca, farklı bir çalışmada yüksek konsantrasyonda borik asit uygulamasının kök dokusunda aquaporinleri ve besin taşıyıcıları kodlayan genleri baskıladığı tespit edilmiştir. Bu durum bitkilerin stres ortamında besin alınımlarından kaçınma durumunu desteklemekte olduğunu göstermektedir ki baskılanan genlerden birisinin de bor taşıyıcısı olan *BOR1* olduğu tespit edilmiştir (Aquea vd., 2012). Yaprakta dokusunda *BOR1* ekspresyonunun görülmesinin nedeni ise tam olarak açıklanamamakla birlikte olası açıklama BOR1'in genç yapraklar arasında bor dağılımını regüle ediyor olabileceğidir (Miwa ve Fujiwara, 2010).

Borik asit uygulamaları ile birlikte yapılan 1 μ M EBL uygulamaları,yaprak ve kök dokusunda ekspresyon seviyesini önemli oranda azaltmıştır. Böylece EBL'in BOR1 ekspresyonunu transkripsiyonel seviyede etkilediği ve ekspresyonunu azaltarak yaprak ve kökte tanımlanan fonksiyonlarını gereği dokularda bor dengesini sağlamaya katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Daha önceden yapılan çalışmalar *BOR3* geninin kök korteksi, stigma, ovaryum ve gövdede eksprese olduğunu göstermiştir (Parker ve Boron, 2013). Yaptığımız tez çalışmasında *BOR3* geninin ekspresyonu hem yaprak hem kök dokusunda borik asit uygulamaları sonucu azalmıştır. Miwa vd. (2006) tarafından mutantlarla yapılan çalışma sonucunda *BOR3*'ün köklerde BOR1'in rolünü destekleyici olarak görev yapabileceğini öngörmüşlerdir ki bu bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Çünkü yüksek bor konsantrasyonunda *BOR3* geni *BOR1* geni ile aynı ekspresyon profilini göstermiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda EBL uygulamaları (tek başına ya da borik asit uygulamalarıyla) *BOR3* geninin ekspresyonunda *BOR1* gibi azalmalara neden olmuştur. Bunlarla birlikte, EBL ve BOR3 arasında olası ilişkiyi değerlendirmek için *BOR3*'ün fonksiyonu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2007 yılında Arabiopsis'te yüksek konsantrasyonda bora toleransı arttırmada etkili olduğu tespit edilen *BOR1* paraloğu olan *BOR4* geni tanımlanmıştır (Miwa vd., 2007). *BOR4*'ün kökte uzama bölgesinde bulunan epidermal hücre membranlarının distal yüzeylerinde lokalize oldukları tespit edilmiştir. Distal yüzeydeki lokalizasyon direk olarak borun kökten atılımını sağlayarak ksilem ve büyüyen hücrelerde birikimini engellemektedir. Ayrıca, BOR1'in aksine *BOR4*'ün yüksek bor konsantrasyonu altında degriden olmadığı tespit edilmiştir (Kasai vd., 2010). Yaptığımız çalışmada artan borik asit konsantrasyonlarına paralel olarak yaprakta daha belirgin olmak suretiyle hem yaprak hem kök dokusunda *BOR4*geninin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Artan borik asit konsantrasyonları ile birlikte *BOR4*'ün ekspresyonunun artması, kökten fazla boru uzaklaştırmak amacıyla olası bir mekanizma olarak önerilmektedir ki bizim bulgumuz bu mekanizmayı desteklemektedir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda EBL uygulaması *BOR4*'ün kökte olan ekspresyonunu önemli oranlarda azaltmıştır.

BOR4 direk olarak BR'ler tarafından regüle ediliyor yorumu doğru olmayabilir fakat bor sinyalizasyonunu etkileyerek kökteki ekspresyonu inhibe ediyor olabileceği

düşünülebilir. Yaprakta ise yapılan EBL uygulamaları *BOR4* geninin ekspresyonunu daha da arttırmıştır. Miwa ve Fujiwara (2011), *BOR4*'ün yüksek oranda ekspresyonunun yapraklarda bor dağılımını değiştirdiği ve boru sitoplazmadan apoplasta atarak yüksek bora toleransı arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durumda EBL'in yapraklarda *BOR4* geninin ekspresyonunu daha da arttırarak yüksek bor konsantrasyonu altında yaprak hücrelerinde bor homeostasisine katkı sağladığı şeklinde yorumlanabilir.

Diğer bir BOR1 paraloğu olan BOR2 ise, plazma membranında lokalize olmakta ve güçlü bir şekilde kökte eksprese olmaktadır. BOR2'in fonksiyonun büyük bir kısmının, borik asitin simplasttan apoplasta taşınımını sağlayarak hücre duvarında bulunan Rhamnogalacturonan II (RG II) yapısındaki çapraz bağlarda yer almasını sağlamaktır (Miwa et al. 2013). Yaptığımız çalışmada, BOR2 geninin ekspresyonunun borik asit uygulamaları sonucu hem yaprak hem kök dokusunda artış gösterdiği saptanmıştır. EBL uygulamaları sonucu ise *BOR2*'in mRNA seviyesinin araştırılan dokularda borik asit uygulamalarına nazaran daha da arttığı tespit edilmiştir. *BOR2*'in bor regülasyonunda olası görevinin henüz tam olarak tanımlanmasının yanında yüksek bor konsantrasyonu altında transkripsiyonel cevabıda henüz tespit edilmemiştir. Bu kapsamda elde edilen bulgular önem taşımaktadır. BOR2'in hem yaprak hem kök dokusunda ekspresyonun artması BOR4'e benzer ya da BOR4'ün olası rolünü destekleyici bir fonksiyonu olabileceği fikrini akla getirmiştir. Yaprak dokusunda BOR2'in ekspresyonunun artması ise arpada bulunan *HvBOR2*'de olduğu gibi Arabidopsiste de benzer şekilde fazla borun damla (guttation fluid) olarak atılmasında fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (Parker ve Boron, 2013).

Arabidopsis'te *BOR2*, *BOR3* ve *BOR5* genleri tanımlanmış fakat fonksiyonlarına ilişkin bir, iki ya da hiç çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte bor taşıyıcılarının EBL ile interaksiyonlarına ilişkin literatüre rastlanılmamıştır. Sonuçlar olası bir EBL-bor bağlantısını desteklemektedir fakat daha detaylı moleküler yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kasajima ve Fujiwara (2007)'nin yaptığı çalışmada, yüksek bor konsantrasyonu altındayaprak dokusunda yüksek oranda ekspresyon gösterdiği tespit edilen At2g04050 (MATE transporter) ve At5g51440 (*Hsp-like*) genlerinin ekspresyon

seviyeleri yapılan tez çalışmasında da borik asit ve/veya EBL uygulamalı bitkilerin yaprak ve kök dokularında belirlenmiştir.

Bu genlerden birisi At2g04050 geni olup birçok zararlı madde ve toksikleri (MATE; multidrug and toxic compound extrusion transporter) taşıyıcı görevi olan integral membran protein ailesine ait bir gen olduğu tespit edilmiştir. Toksinler, sekonder metabolitler, herbisitler ya da komşu bitki veya endemik mikroorganizma kaynaklı ksenobiyotikler gibi antibiyotikler olabilmektedirler. Toksinler vakuole alınarak detoksifiye edilmekte ve bitki hücrelerinin sitoplazmasından uzaklaştırılmaktadır. Bitkilerde ve mantarlarda yapılan çalışmalar, birçok zararlı ve toksik maddelerin vakuolde biriktirilmesinin ikincil transport sistemleri ile gerçekleşmekte ve bu sistemlerin tonoplast etrafında proton gradientinin sürdürülmesi için vakuolar H^+ -ATPaz ve vakuolar pirofosfataza gereksinim duyulduğunu ortaya koymuştur. Bitkilerde hem tonoplast hem de hücre membranına lokalize olan bu taşıyıcılar MATE familyası olarak isimlendirilmiştir (Diener vd., 2001; Omote vd., 2006). Tez çalışmasında borik asit uygulamaları yaprak dokusunda At2g04050 geninin ekspresyonunu arttırmıştır. Farklı bir çalışmada, Arabidopsis'te tanımlanan MATE familyasına ait diğer bir gen olan *ALF5*'in, kökleri inhibitör bileşiklerden korumada fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir. *alf5* mutantının da kullanıldığı bir çalışmada, genin fonksiyonunu yitirmesinin bitkiyi ticari besin ortamlarında bulunan PVP, bacto agar vb. birçok kimyasala daha duyarlı hale getirdiği ve lateral kök oluşumunu durdurduğu tespit edilmiştir (Diener vd., 2001). Rogers ve Guerinot (2002) tarafından yapılan çalışmada ise, Arabidopsis'e ait *FRD3* geninin klonlanması ve karakterize edilmesi sonucu, *FRD3* genine ait 3 allel olduğu ortaya konulmuştur. Durrett vd. (2007), bu allellerden birinde oluşturulan mutasyon sonucu elde edilen mutantın (*frd3-3*), gövdede iki kat daha fazla demir ve çinko, 4 kat daha fazla manganez biriktirdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında, *FRD3*'ün MATE familyasının üyesi olduğu ve demir homeostatisini sağlamadaki rolü belirlenmiştir. Debeaujon vd. (2001), MATE familyası üyesi olan *TT12* geninin mutant fenotipinde, vakuollerde proantosiyanın birikiminin azaldığı ve böylece tohum testasında pigmentasyon değişimi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum, TT12 proteininin ovul ve gelişen tohumların vakuollerinde lokalize olduğunu ve tohum testa endotelium vakuollerine antosiyanın taşınmasında fonksiyonu olduğunu ortaya koymuştur.

Demir, alüminyum gibi metallerin detoksifiye amaçlı vakuollere transferinde önemli rolleri bulunan MATE genlerinin yaptığımız çalışmada borik asit uygulaması sonucu kök dokusunda ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Kök ve yapraklar farklı birçok özelleşmiş hücre içermeleri nedeniyle strese yanıtta bu dokuda nelerin farklı olarak gerçekleştiği henüz bilinmemektedir. Sadece stres ile direk temasta olan doku daha çok etkilenmekte ve bununla birlikte farklı doku/hücre tiplerinde stres yanıtı değişebilmektedir (Kreps vd., 2002). Bununla birlikte borik asit uygulaması sonucu MATE familyasına ait farklı genlerinde ekspresyon seviyelerinin araştırılması ile borik asit-MATE familyası arasında olası bir ilişki daha iyi bir şekilde açıklanabilir. Literatürler MATE familyasının önemli fonksiyonlarını ortaya koyarken, tespit ettiğimiz diğer bir bulgu EBL uygulamaları sonucu At2g04050 geninin ekspresyonunun her iki dokuda yüksek oranda artmış olmasıdır. Bu sonuçlar BR'lerin stres toleransını artırma yeteneklerini moleküler açıdan destekleyen yeni bir bulgudur. İnternal taşıma ve internal detoksifikasyonda etkili olan MATE gen grubunun mühendislik yöntemleri ile yüksek oranda ekspresyonunun sağlanması sonucu kullanışlı fenotipler elde etme olasılığı oluşabileceği gibi EBL uygulamalarının belirgin etkisi de sisteme entegre edilebilir. Hemen hemen bütün stres koşulları altında ısı şoku proteinleri (heat shock proteins) adı verilen bir grup proteinin ekspresyonunun arttığı belirtilmektedir.

Bu sınıf proteinler moleküler ağırlıklarına göre 5 gruba ayrılmaktadır ki bu gruplardan bir tanesi At5g51440 (*Hsp-like*) geninde kodladığı proteinin dahil olduğu küçük ısı şoku proteinleri (sHsp; small heat-shock protein)'dir. Bu sınıf proteinlerin karakteristik fonksiyonları diğer ısı şoku proteinlerinden farklı olarak direk protein katlanmaları ile ilgili değil, stresle yapısı bozulan proteinlerin ATP bağımlı şaperonlar gibi çöktülerinin açılmasını ve yeniden katlanmalarını kolaylaştırmaktır. Özellikle stres koşulları altında membranın bütünlüğünün korunmasında önemli rolleri olduğu ortaya koyulmuştur (Al-Whaibi, 2011). Tez çalışmasında yapılan borik asit uygulamalarının *Hsp-like* geninin kök ve yaprak dokularında ekspresyonunu benzer oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda da sonuçlarımızı destekleyen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, *A. thaliana*'da stres koşulları altında mitokondriyal proteinleri kodlayan genler tanımlanmıştır. Tanımlanan bu genlerden biri 23.5 kDA ağırlığında proteini kodlayan *Hsp-like* geni olup, stres çeşitlerine göre ekspresyon seviyesinin değiştiği

belirtilmiştir. Örneğin, ozmotik stres boyunca ekspresyonu azalırken ısı ve tuz stresi ile ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir.

Bununla birlikte *Hsp-like* geninin, At4g25200 (sHsp 23.6) geni ile birlikte eksprese olduğu, mitokondriyal proteinlerinin ve belki de plastid proteinlerin stres koşulları boyunca stabilizasyonunda fonksiyonel bir çift olarak her ikisine de ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir (Van Aken vd., 2009). Diğer bir çalışmada, ısı stresine maruz bırakılan lahana bitkilerinde ekspresyonu artış gösteren genlerden birisi de *Hsp-like* geni olmuştur (Park vd., 2013). Li ve Yi (2012), sülfür dioksit stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde savunma ile ilgili genlerin transkripsiyonel profillerini araştırmışlardır. Transkripsiyonu artan genlerden bir grubu *Hsp-like* geninin de dahil olduğu küçük ısı şoku proteinleri kodlayan genler oluşturmuştur. Yukarıda verilen bilgilere göre stres koşulları altında ekspresyonunun arttığı tespit edilen *Hsp-like* geninin borik asit uygulamaları sonucunda da ekspresyonu artmıştır. Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında *Hsp-like* geni ve EBL ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yaprak ve kök dokularında, yüksek konsantrasyonda EBL uygulamasının hem tek başına hem de borik asit uygulamaları ile birlikte *Hsp-like* geninin ekspresyonunu net bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. EBL'in ısı şoku proteinlerini kodlayan bir genin ekspresyonunu arttırması stress toleransını arttırmada olası rolünü desteklemekle birlikte bu durum bor stresi altında ilk kez tespit edilmiştir.

Ökaryotik hücre döngüsü G1/S ve G2/M sınırları olmak üzere iki noktada regüle edilmektedir. Bu noktalardan geçiş farklı siklin bağımlı kinazlar (Cyclin dependent kinases:CDKs) tarafından kontrol edilmektedir ki siklin bağımlı kinazların aktiviteleri farklı tip siklinlerin bağlanması ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar ile bitkilerde, siklin A (*CycA*), siklin B (*CycB*) ve siklin D (*CycD*) olmak üzere üç tip siklin homoloğu tanımlanmıştır. Bitkilerde *CycA* ve *CycB* hücre döngüsüne bağlı olarak G2/M geçişi sırasında görev yapmaktadır. Bununla birlikte *CycD* genleri hücre döngüsünden bağımsız ekspresyon profili göstermekte, G1/S geçişini kontrol etmekte, transkripsiyonu mitojenlerle teşvik edilmekte ve aktif bölünen hücrelerde seviyesi sürekli korunmaktadır (Hu vd., 2000). Yaptığımız tez çalışmasında, borik asit ve/veya EBL uygulamaları sonucu ekspresyon profili araştırılan genlerden birisi de At4g34160 (*CycD3;1*) genidir. Çalışmamızda, borik asit uygulamaları sonucu kök

dokusunda At4g34160 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Aquea vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada borik asitin kökte hücre döngüsünü regüle ettiği ve anahtar hücre döngüsü genlerinin ekspresyonlarının değişmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla hücre döngüsünde G2'den mitotik bölünme kadar olan safhayı regüle eden *CycB1;1* geninin ekspresyonu araştırılmış ve borik asit uygulaması sonucu mitotik hücre sıklığınınve bölünme oranının önemli seviyede azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada, anahtar hücre döngüsü regülatörlerinin (siklin bağımlı kinazlar (*CDKA1*, *CDKB1;1* ve *CDKB2;1*) ve siklinlerin (*CycA1;1*, *CycA2*, *CycB1;1* ve *CycD3;1*)de ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve 12 saat sonra ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, borik asit uygulamasını takiben 12 saat sonra hücre döngüsünün baskılandığı sonucunu ortaya koymuş ve bizim bulgularımızı destekleyici nitelikte olmuştur. Tez çalışmasında, tek başına ya da borik asit konsantrasyonları ile birlikte yapılan düşük konsantrasyonda EBL uygulamasının kök dokusunda *CycD3;1* geninin ekspresyonunu kontrole ya da tek başına yapılan borik asit uygulamalarına göre arttırdığını tespit ettik. Hu vd. (2000), Arabidopsis *det2* mutantının süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda EBL uygulaması yapılmış ve doza bağlı olarak uygulamadan 4 saat sonra *CycD3;1* geninin transkript seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. *CycD3;1* geninin ekspresyonunun EBL ile artması, BR'lerin hücre bölünmesini teşvik edici rolünün *CycD3;1* geni aracılığı ile olabileceği sorusunu doğurmuştur. Araştırmacıların çalışmanın devamında elde ettiği bulgular BR'lerin hücre döngüsü üzerindeki indükleyici etkilerinin *CycD3;1* geninin ekspresyonunu arttırarak gerçekleştiği sonucuna götürmüştür.

BR-duyarsız *bri1-116* mutantı (BR sinyal yolağında mutasyon sonucu oluşturulan bir mutant) kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücre bölünme markörlerinin (*CYCB1;1*, *ICK2/KRP2* ve *KNOLLE*) ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada *CycD3;1* genine yüksek oranda ekspresyon (overexpression) özelliği kazandırılması ile *bri1-116* mutant meristemlerinin normale dönmesi sonucu *CycD3;1* geninin hücre bölünmesi ve uzamasındaki önemli etkisinin yanı sıra BR'ler ile olan ilişkisi de tanımlanmıştır (Gonzalez-Garcia vd., 2011).

At4g34160 geninin ekspresyonunun düşük konsantrasyonda EBL (0,01 μ M) uygulamaları ile arttığı fakat yüksek konsantrasyonda uygulandığı zaman giderek azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda benzer şekilde düşük BR konsantrasyonları kök gelişimini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonların inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır (Roddick vd., 1993; Dhaubhadel vd., 1999). BR seviyesinin araştırıldığı çalışmalarda, gövdeye nazaran kökte daha düşük miktarda BR tespit edilmiştir. Bu durum kökün gövdeye göre daha az BR gereksinimi olduğunu ortaya çıkarmakta ve BR'lerin kök gelişimi üzerine etkilerini desteklemektedir. Bununla birlikte, BR'lerin kök gelişimindeki rollerine ilişkin farklı bulguların elde edilmesi, kültür koşulları (ışık yada karanlık), uygulanan BR analogu, uygulama süresi ve konsantrasyonun değişmesinden kaynaklanıyor olabileceği de belirtilmektedir (Clouse, 2003). Mussig vd. (2003), yaptıkları çalışmada düşük konsantrasyon BR uygulamasının yabancı tip bitkilerde kök gelişimini teşvik ederken, mutantlarda kök uzunluğunu normalize ettiğini tespit etmiş ve bununla birlikte yüksek konsantrasyonun inhibisyon etkisini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, kök gelişimini teşvik ya da inhibe eden konsantrasyonun eşik değerinin, kullanılan BR'in biyolojik aktivitesine bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir.

Yüksek konsantrasyon EBL uygulaması sonucu kökte meydana gelen inhibisyonun etilene bağlı olabileceği öngörülmektedir. Çünkü BR'lere benzer bir hormon grubu olan oksinler kökte etilen biyosentezini teşvik ederek etilen seviyesini arttırmaktadır ve etilen kök uzamasını inhibe etmektedir (Yi vd., 1999; Woeste vd., 1999; Arteca ve Arteca, 2001). 2003 yılında yapılan çalışmada ise, BR'lerin kök ve gövdede etilen biyosentezi ve etilen yanıtı ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik ettikleri belirlenmiştir (Mussig vd., 2003). Yaptığımız çalışmada, yaprak dokusunda At4g34160 geninin ekspresyon seviyesi kontrole göre çok fazla değişmemiştir. Kökte ekspresyon seviyesinde değişim gözlenirken yaprakta belirgin değişim gözlenmemesi durumu her iki uyarıcıya da direkt maruz kalan dokunun kök olması ile ilgili bir neden olabilir.

Goda vd. (2002), DNA mikrodizin analiz tekniği kullanılarak BR'ler tarafından regüle edilen genler Arabidopsis'in yabancı tip ve BR-sentezlemeyen *det2* mutantında araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, BR tarafından regüle edilen genlerin bir kısmının hücre uzaması ve hücre duvarı organizasyonu ile ilgili genler olduğu

belirlenmiştir. Bu gruba dahil olan genlerden birisi de At5g57560 (*TCH4*) genidir. Bizim de çalışmamızda ekspresyonunu araştırdığımız bu gen *Arabidopsis thaliana*'da ksiloglukan endotransglikozilaz/hidrolaz proteinini kodlamaktadır. Yaptığımız çalışmada, borik asit uygulamaları sonucu kök ve özellikle de yaprak örneklerinde *TCH4* geninin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bitki birincil hücre duvarı olan hemiselüloz matriks, (heterojen ve genellikle polisakkarit dallar oluşturmuş) pektin ve proteinler içine gömülü selüloz mikrofibrillerden oluşmaktadır. Dikotillerde en önemli hemiselüloz ksiloglukanıdır. Ksiloglukanlar selüloz mikrofibriller ile güçlü hidrojen bağları oluşturmakta ve hücre etrafında sarmal halde mikrofibril zincirleri meydana getirmektedir. Ksiloglukanların oluşturduğu bu çapraz bağlarda modifikasyon, hücre duvarının dayanıklılığını ve esnekliğini kontrol edebilmektedir. Ksiloglukan endotransglikozilaz enzimleri ayrılımlar ve yeni oluşan uçlar ile diğer ksiloglukan polimer uçları arasında bağlantı oluşturarak ksiloglukan polimerlerini modifiye etmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerin, yeni sentezlenen ksiloglukanları hücre büyümesi boyunca yapıya dahil etmesi, polimer zincirlerini yeniden düzenlenmesi ile hücre duvarında çözülme (loosening) ve devamında hücre genişlemesine öncülük etmesi, gelişen ksilem ve floem hücreleri ve meyve olgunlaşması boyunca kısmen hücre duvarını lizis etmesi gibi rolleri de tespit edilmiştir (Xu vd., 1995). Yapılan farklı bir çalışmada Arabidopsiste bulunan *TCH4* geninin çevresel değişkenlere yanıt olarak ekspresyonunun hızlı bir şekilde regüle edildiği ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar bu genin ekspresyonunun dokunma, karanlık ve ısı stresleri altında arttığını belirlemişlerdir. Tez çalışmasında diğer uygulanan streslerden farklı olarak borik asit uygulanmış ve ekspresyonda artış tespit edilmesi yeni bir bulgudur. Bitkinin çevreye karşı morfojenetik yanıtının düzenlenmesinde hücre duvarı modifiye enzimlerini kodlayan genlerin regülasyonunun önemli olduğu öne sürülmüştür. Bitki çevresel koşullara adaptasyon boyunca morfogenez geçirmekte ve bu durumun hücre duvarı modifikasyonunu gerektirdiği belirtilmiştir. Bu enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının regülasyonu hücre duvarının özelliklerini değiştirerek bitkinin çevresel koşullara hızlı bir şekilde adapte olmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirdiği ifade edilmiştir.

Hücre duvarı modifikasyonlarının gelişimsel değişimlerin merkezini oluşturduğu ve bu durumun çevresel koşullara adaptasyon ile sonuçlandığı ortaya koyulmuştur.

TCH4 geninin regülasyonu direk olarak hücre duvarının özellikleri ve yapısında modifikasyona neden olmaktadır (Xu vd., 1995). Tek başına ya da borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları kök ve yaprak dokusunda *TCH4* geninin ekspresyonunu arttırmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda, BR uygulamalarının *TCH4* genine homolog olarak tanımlanan farklı genlerin transkript seviyelerini de arttırdığı tespit edilmiştir. Örneğin, *BRU1* geninin *Glycine max*'ta (Zurek ve Clouse, 1994), *LeBR1* geninin *Lycopersicon esculentum*'da (Koka vd., 2000), *OsXTR1* ve *OsXTR3* genlerinin *Oryza sativa*'da (Uozu vd., 2000) ekspresyon seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. Moleküler çalışmalar sonucu, BR'lerin bitkilerde tanımlanan en önemli rollerinin hücre uzamasını teşvik etmesi olduğu ortaya koyulmuştur. Goda vd. (2002), *Arabidopsis* mutantına yapılan brassinolid uygulamasının *TCH4* geninin ekspresyonunu teşvik ettiği belirlenmiştir. Brassinolidin teşvik ettiği ekspresyon profilinin, erken oksin teşvik genlerine (early auxin-inducible genes) benzemesi, BR'lerin oksin ile ilgili genleri indüklemesi ile hücre uzamasını teşvik ettiği sonucuna götürmüştür. Ayrıca, mikrodizin analiz sonuçları BR'lerin oksin ile etkileşiminin olası mekanizmasını desteklemiştir. Xu vd. (1995), çevresel uyarıcılar (stres vb.) ile birlikte oksin ve brassinosteroid hormonlarının da *TCH4* geninin ekspresyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu kadar farklı (iki) uyarıcının (stres ve EBL), nasıl genel bir moleküler cevap oluşturduğu sorusu ise *TCH4* geninin ekspresyonunun kontrolünde farklı sinyal yolları olabileceği şeklinde cevaplandırılmıştır.

Mussig ve Altmann (2003) tarafından yapılan çalışmada, BR'ler tarafından regüle edilen genlerden bir diğerinin At5g49720 (*KOR*) olduğu tespit edilmiştir. Endo-1,4- β -D glukanaaz (EG'ler), prokaryotlar ve ökaryotlarda hidrolitik enzimlerin büyük bir familyasını oluşturmaktadırlar ve EG'ler 1,4- β bağlarını hidrolize etmektedirler. Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan gen ekspresyon modelleri EG'lerin yaprak absisyonu, meyve olgunlaşması ve hücre genişlemesi gibi farklı gelişimsel süreçlerde rol aldığını ortaya koymuştur. Endo-1,4- β -D glukanaaz (EG'ler) familyasının bir üyesi olan ve membrana bağlı KORRIGAN (*KOR*) proteini hücre duvarının genişlemesinde merkezi rol oynamaktadır (Nicol vd., 1998; Robert vd., 2005).

Bununla birlikte *KOR*, mRNA'sı çalışılan bütün organlarda bulunmuş olup, mRNA seviyesinin hızlı hücre uzaması ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

KOR geninin promotor bölgesinde yapılan mutasyonlar sonucu elde edilen *kor1-1* mutantlarının ekstrem cücelik gösterdiği ve birincil hücre duvarının mimarisinde belirgin bir değişim meydana getirdiği saptanmıştır. *KOR* geninin farklı bir allelinde yapılan mutasyon sonucu oluşturulan *kor1-2* mutantında ise sitokinez safhasında kusur olduğu tespit edilmiştir (Robert vd., 2005). Bu tez çalışmasında, BR'ler tarafından regüle edildikleri ortaya konulan *KOR* geninin borik asit ve/veya EBL uygulamalarına cevapları yaprak ve kök dokularında araştırılmıştır. Yaprak dokusunda, borik asit ve/veya EBL uygulamaları *KOR* geninin ekspresyon seviyesinde kontrole göre düşük oranlarda değişimler meydana getirmiştir. Kök dokusunda ise borik asit uygulamaları kontrole göre ekspresyonu düşük oranlarda arttırırken, EBL uygulaması (1 µM) ekspresyon seviyesinin belirgin seviyede artmasına neden olmuştur.

KOR geninin BR tarafından regüle edildiği global gen ekspresyon çalışmaları ile belirlenmiş fakat, herhangi bir stres altında ekspresyonunun araştırıldığı bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu bakımdan ilk kez ortaya çıkarılan bir bulgudur. EBL uygulamaları ile ekspresyonun artması BR'lerin hücre uzaması ve genişlemesi üzerindeki pozitif rollerini destekleyici nitelikte olmuştur. Bununla birlikte uygulan borik asit sonucu ekspresyonda değişme görülmemesi uygulanan stres çeşidi, uygulama süresi ya da örnekleme zamanına bağlı olabileceği ihtimalini düşündürmüştür. Nicol vd. (1998), Arabidopsiste *KOR* geninin normal hücre duvarı gelişimi ve hücre uzaması için gerekli olduğu ortaya konmuş ve *KOR* geninin diğer hormonlarla interaksyonunu araştırmışlardır. Oksin, giberellin ve etilen hormonlarının mutantlarında *KOR* geninin mRNA seviyesinin değişmediğini tespit ederken, BR mutanı olan *det2*'de *KOR* mRNA seviyesinin yabanıl tipe nazaran 3 kat daha az olduğu da belirlenmiştir. Bununla birlikte ekzogen yapılan brassinolid uygulaması hipokotil büyümesini kısmen kurtarmış ve *KOR*-mRNA seviyesinin artmasına neden olmuştur. BR-sentezlemeyen *det2* mutantında *KOR* transkript seviyesinin azalması ve BR uygulamasını takiben artması *KOR*-BR arasındaki potansiyel mekanizmayı göstermektedir.

Geniş çaplı moleküler analizler sonucu BR-tarafından regüle edilen genlerin bir kısmının stres ile ilgili genlerin oluşturduğu tespit edilmiştir (Yuxin vd., 2001; Mussig vd., 2002; Mussig ve Altmann, 2003; Lisso vd., 2005). BR'lerin regüle ettiği

belirlenen stres genlerinden ikisi bizim de çalışmamızda araştırdığımız ısı şoku proteinlerini kodlayan At3g12580 (*Hsp70-4*) ve At5g52640 (*Hsp90-1*) genleridir. Hsp70'lerin genel şaperon görevinin yanı sıra stres ilgili genlerin de ekspresyonunu regüle ettiği, Hsp90'ların ise, steroid hormonlarının sinyal yolağında, hücre döngüsünün regülasyonunda, proteinin lokalizasyonu ve morfolojisinde önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda brassinosteroid aracılı sinyal iletim yolağına katıldıklarını ve direk BR'lere bağlı olarak BR uygulamalı bitkilerde ekspresyonu arttırdıkları öne sürülmüştür (Park vd., 2013). Yapılan borik asit uygulamaları, her iki geninde kök dokusunda ekspresyonunu kontrole göre yaklaşık iki kat oranında arttırmıştır. Bu durum stres koşulları altında genellikle tespit edilen bir durumdur. Şöyleki, genellikle hücrenin çevresinde bir değişim, hücreyi bu değişimin zararlı etkisinden koruyacak olan bir dizi genin ifadesini etkin hale getirmektedir. Tüm hücrelerde bulunan bu mekanizma yalnızca ısı şoku etkisi altında değil çeşitli hücresel tehditler altında da sentezlendikleri için aynı zamanda stres proteinleri (SP) olarak da isimlendirilmektedir. Stres proteinlerinin fizyolojik fonksiyonları, hücre strese maruz kaldığında daha önemli hale geçmektedir. Stres proteinlerinin görevi, farklı çevresel stresler altında oligomerik komplekslerin ayrılmasını, polipeptidlerin açılmasını önlemek ya da tersine çevirmektir. Tekrar katlanma imkansız hale gelmişse, Hsp'ler denature olmuş proteinlerin atılımını hızlandırırlar. Hücre içinde denatüre proteinlerin varlığı Hsp'lerin yapımını uyarır ve hızlandırır (Al-Whaibi, 2011; Park vd., 2013). Daha önceden farklı stres koşulları altında ısı şoku proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonları araştırılmış fakat bor stresi altında ekspresyon seviyeleri ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir.

Bununla birlikte bu genlere ait ekspresyon seviyeleri incelendiğinde öncelikle kontrol bitkilerinde her iki gene ait belirgin bir ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda Hsp90 ve Hsp70 proteinlerinin optimal büyüme sıcaklıklarında eksprese edildiği ve normal büyüme için de esansiyel rol oynadığı belirtilmiştir (Vierling, 1991; Parsell vd., 1993; Park vd., 2013).

Tek başına ya da borik asit uygulamaları ile birlikte yapılan EBL uygulamaları, özellikle de yüksek konsantrasyonda EBL uygulaması her iki genin de ekspresyon oranını kök dokusunda yüksek oranlarda arttırmıştır. Farklı çalışmalardada

sonuçlarımızı destekleyen bulgular elde edilmiştir. Park vd. (2013), ısı stresine maruz bırakılan dayanıklı ve duyarlı iki lahana çeşidiyle yaptıkları çalışmada, ekspresyonu artan ve azalan genleri araştırmışlardır. Tanımlanan genler içerisinde ısı stresi sonucu ekspresyonu artan genlerden ikisinin *Hsp70* ve *Hsp90* olduğu tespit edilmiştir. Yuxin vd. (2001), BR'ler tarafından regüle edilen ve bitkinin strese olan yanıtının oluşmasında etkili olan 4 gen tanımlanmışlardır. Bu genlerden ikisi *Hsp90* familyasına ait *Hsp81* ve *Hsp82* olarak belirlenmiştir. Dhaubhadel vd. (1999), letal sıcaklık stresine maruz bırakılan *Brassica napus* ve domates bitkilerine EBL uygulamalarının strese karşı toleransı artırarak bitkileri daha tolerant hale getirdiklerini tespit etmişlerdir. Yapılan araştırmada, HSP'lerin 4 önemli sınıfının (*Hsp100s*, *Hsp90s*, *Hsp70s* ve *sHsps*) akümüasyonunun EBL uygulamaları ile yüksek oranda artması BR'lerin stres toleransını arttırmadaki etkisini desteklemiştir. Aynı araştırmacılar diğer bir çalışmalarında (Dhaubhadel vd., 2002) ise EBL uygulamalarının nasıl daha yüksek seviyede Hsp proteinlerinin birikimine neden olduğunu *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda araştırmıştır. EBL'in translasyonel mekanizma üzerinde etkili olduğu, birçok translasyon başlama ve uzama faktörünü seviyesini önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir. Yaprak dokusunda ise yapılan borik asit ve/veya EBL uygulamaları *Hsp70-4* ve *Hsp90-1* genlerinin ekspresyonlarında düşük oranlarda değişimler meydana getirmiştir. Singla vd. (1997), Hsp sentezinin nitelik ve miktar bakımından hücre/doku tipi ve gelişim/farklılaşma derecesine bağlı olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte yaprak dokusunda görülen bu durumun borik asitin yarattığı stresten kök dokusuna göre daha az etkilenmesi şeklinde de yorumlanabilir.

Kreps vd. (2002) tarafından tuz, soğuk ve ozmotik streslere maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde global gen ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır. Üç farklı stres uygulaması altında yüksek oranda eksprese olduğu belirlenen genlerden ikisi At5g52310 (*LTI/COR78*) ve At5g06760 (*LEA4-5*) olmuştur. Araştırılan her iki gen de absisik asite (ABA) duyarlı genler olup, ekzogen ABA uygulaması sonucu ekspresyonlarının arttığı farklı çalışmalarda tespit edilmiştir (Okamoto vd., 2012). Yaptığımız çalışmada bu iki genin borik asit ve/veya EBL uygulamalarına olan cevapları transkripsiyonel seviyede cevapları araştırılmıştır. Borik asit uygulamaları, *LTI/COR78* geninin ekspresyonunu kök dokusunda kontrole nazaran değiştirmez iken yaprak dokusunda borik asit uygulamaları ile birlikte ekspresyon seviyelerinde

artışlar meydana gelmiştir. *LTI/COR78* geni soğuk stresi ile ilgili sorumlu anahtar stres markör genlerden biri olup ekspresyon artışı sadece düşük sıcaklık stresine karşı toleransı değil ozmotik, kuruma, kuraklık ve tuzluluk streslerine de karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir (Yamaguchishinozaki ve Shinozaki, 1994; Rayirath vd., 2009). Kreps vd. (2002), farklı stres koşulları altında *LTI/COR78* geninin 3. saatte hem kök hem yaprakta yüksek ekspresyon gösterirken, 27. saatte yapılan analizde yaprakta ekspresyon seviyesini koruduğu fakat kökte transkript seviyesinin kontrol seviyelerine indiğini tespit etmişlerdir. Bu durumda borik asit uygulamaları ile *LTI/COR78* geninin ekspresyonunun artmış olabileceği fakat biz örneklememizi 60. saatte yapmamızdan dolayı kökte ekspresyon artışını görememiş olmamız olası bir durumdur. EBL uygulamaları özellikle 1 μ M EBL uygulaması hem yaprak hem kökte *LTI/COR78* geninin ekspresyonunun belirgin oranda artmasına neden olmuştur. Literatür taramaları sonucu *LTI/COR78* geni ile brassinosteroidlerin birlikte uygulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat EBL uygulamaları sonucu ABA tarafından indüklenen bir genin ekspresyonunun artması, olası ABA-BR interaksiyonunu işaret etmiştir.

Ekspresyonu araştırılan diğer bir gen ise *LEA4-5* genidir. Geniş genom analizleri sonucu Arabidopsis'te vejetatif dokularda ABA tarafından teşvik edilen en güçlü genlerden birinin 4. grup LEA geni olan *LEA4-5* olduğu ortaya çıkarılmıştır. LEA proteinleri, embriyogenesinin son safhası boyunca akümüasyonu sonucu ilk kez tohumda karakterize edilmiştir (Reyes vd., 2008).

LEA4-5 geninin Arabidopsiste transgenik olarak ekspresyonunun arttırılması sonucu osmotik, tuzluluk ve kuraklık streslerine karşı toleransı arttığı belirtilmiştir. Çalışmalar sonucu elde edilen bulgular ABA ve biyotik streslerin (kuraklık, tuzluluk ve ekstrem sıcaklık stresi) *LEA4-5* geninin ekspresyonunu indüklemekte ve böylece sadece tohumda değil fide ve vejetatif büyüme aşamalarında da abiyotik streslere karşı toleransı arttırmada önemli biyolojik fonksiyonları olduğu ortaya koyulmuştur (Dalal vd., 2009).

Yaptığımız çalışmada, borik asit uygulamalarının hem yaprak hem kök dokularında *LEA4-5* geninin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bu bulgu tuz, ozmotik ve soğuk streslerine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde artan *LEA4-5* geninin ekspresyonu ile benzer sonuçlar göstermekte olup (Kreps vd., 2002) borik asit için

ilk kez ortaya konulan bir bulgudur. LEA proteinleri hidrofilik olup, özel spesifik protein bölgeleri bulunmaktadır. Hücreleri don stresi boyunca suyun az olduğu durumlarda meydana gelebilecek olumsuz etkilerden korumada, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarında meydana gelen yanlış katlanmaları ve farklı stresler boyunca enzimin inaktivasyonuna neden olabilecek protein değişikliklerini önleyerek şaperonlar gibi davrandıkları tespit edilmiştir (Reyes vd., 2008; Bies-Etheve vd., 2008). Yüksek konsantrasyonda borik asit uygulaması sonucu *LEA4-5* geninin ekspresyonunu arttırmış bununla birlikte yüksek konsantrasyonda uygulanan EBL ile genin ekspresyonu daha da artmıştır. Bu durum *LTI/COR78* genine benzer şekilde ABA ile interaksyonu işaret etmektedir. Arabidopsis'te brassinosteroidler aracılığı ile strese karşı toleransın absisik asit, etilen ve salisilik asit yollarındaki interaksyonla sağlandığı, hormonlara ait mutantlar ile yapılan çalışmalar sonucu ortaya koyulmuştur (Krishna, 2003; Divi vd., 2010b). Yapılan çalışmalarda BR'lerin ve ABA'nın 100'lerce geni birlikte regüle ettiği ve bunun sonucunda hormolar arası interaksyon oluşarak birçok gelişimsel sürecin ve strese toleransı kontrol edebildikleribelirtilmiştir (Nemhauser vd., 2006; Vriet vd., 2012). Bajguz (2009) yaptığı çalışmada ısı stresine maruz bırakılan *Chlorella vulgaris*'de EBL uygulamaları sonucu ABA içeriğinin arttığını tespit etmiştir. Zhang vd. (2009) ise EBL ve ABA hormon mutanlarını kullanarak yaptıkları çalışmada BR-ABA ilişkisini araştırmış ve her iki hormonunda sinyal yolağının daha fazla anlaşılması sonucu bu ilişkinin daha net ortaya koyulacağını belirtmişlerdir.

Yüksek bor konsantrasyonuna maruz bırakılan Arabidopsis bitkilerinin yaprak ve kök dokularında EBL'in etkisi semi-quantitative RT-PCR tekniği ile transkripsiyonel seviyede araştırılmıştır. EBL kök dokusunda BOR taşıyıcılarını kodlayan genlerin ekspresyonunu negative etkilerken, stress ile ilgili genlerin ekspresyonunu pozitif etkilemiştir. Bunu direk ya da indirek olarak yaptığı henüz bilinmemektedir. Fakat özellikle stres ile ilgili genlerin üzerine olan etkisi BR'lerin anti-stres özelliklerini destekleyici nitelikte olmuştur. Araştırılan genlerin bazılarında ekspresyon seviyesinin dokuya spesifik olarak değiştiği tespit edilmiştir. Kök ve yapraklar farklı birçok özelleşmiş hücre içermelerine rağmen strese yanıtta bu dokuda nelerin farklı olarak gerçekleştiği bilinmemektedir.

Sadece stres ile direk temasta olan doku daha çok etkilenmekte ve bununla birlikte farklı doku/hücre tiplerinde stres yanıtını değiştirebileceği belirtilmektedir (Kreps vd., 2002). Yapılan çalışma BR'lerin bor stresi üzerine etkilerini anlamaya yönelik ilk moleküler yaklaşım olma özelliğine sahiptir. Sonuç olarak, gen ekspresyonlarındaki değişimler bitkilerde var olan mekanizmalara ilişkin ayrıntılı analizler için kullanışlı başlangıç noktaları oluşturur. Ekspresyon profili araştırılacak aday gen listesi içinde öncelik sırasına karar vermede ve genin fonksiyonunun belirlenmesinde yani genden fenotipe gidilmesinde (reverse genetic) yardımcı olmaktadır.

Moleküler seviyede, ekstraselüler uyarıcının algılanması ve devamında uygun yanıtların aktivasyonu sinyal yollarında kompleks ilişkiler sonucu meydana gelmektedir. Yapılan geniş çaplı çalışmalar, yüksek seviyede ROS'un hücre ölümüne sebep olurken, düşük seviyede bitkinin strese yanıtında regülatör rol oynadığını ortaya koymuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, BR'lerin hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyesini arttırdığı böylece streslere karşı toleransın artmasına öncülük ettiği ortaya konulmuştur. Hidrojen peroksitin bitki ve hayvan hücrelerinde birçok uyarıcıya yanıtta sinyalizasyon molekülü olarak fonksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte savunma genlerinin ekspresyonunu indüklediğinde diğer saptanan bulgular arasındadır (Desikan vd., 2001; Xia vd., 2009).

Biyokimyasal araştırmalar kapsamında, EBL uygulamalarının tek başına ya da borik asit ile birlikte uygulandığında büyüme parametreleri ve antioksidatif sistem üzerinde teşvik edici etkileri gözlenmiştir. Moleküler araştırmalar kapsamında ise gözlenen bu olumlu fizyolojik etkinin moleküler detayları gen ekspresyonu seviyesinde araştırılmıştır. EBL uygulamaları özellikle stres ile ilgili genlerin ekspresyonlarını önemli seviyede arttırmıştır. Bu sonuçlar biyokimyasal bulguları desteklemekte ve EBL uygulamalarının stres ile ilgili genleri transkripsiyonel düzeyde etkilediğini ortaya koymuştur. Proteomik gibi gelişmiş moleküler teknikler, mutantlar ve transgenikler kullanılarak yapılacak olan çalışmalar ile BR'lerin bor stresine karşı toleransı artırma mekanizması daha iyi anlaşılabacaktır.

Bu spesifik konuya ilk biyokimyasal ve moleküler yaklaşım olma özelliğine sahip olan tez çalışması, bor-brassinosteroid ilişkisinin göreceli olarak detaylı araştırılmasının yanında, tarımda pratik uygulamalar için bilgi sağlayacak temel bir araştırma niteliğini taşımaktadır. Bütün bu bilgilerin bir araya getirilmesi strese tolerans mekanizmasına ışık tutacak ve BR'lerin ekilebilir alanlarda ticari önemi olan bitkilerde gelecekte potansiyel iyileştirici olarak kullanımlarını arttıracaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, *Balıkesir ili maden potansiyeline bir bakış*, Güney Marmara Kalkınma Ajansı, 2011, 47s.
- Ahammed, G.J., Ruan, Y.P., Zhou, J., Xia, X.J., Shi, K., Zhou, Y.H. ve Yu, J.Q. (2013) Brassinosteroid alleviates polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress by enhancing antioxidant enzymes activity in tomato, *Chemosphere*, 90: 2645-2653.
- Akçam-Oluk, E. ve Demiray, H. (2004) Bor elementinin Sambro No.3 ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşidinin büyümesi üzerine etkileri, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 41: 181-190.
- Al-Whaibi, M.H. (2011) Plant-heat-shock proteins: A mini review, *Saudi J Biol Sci*, 23: 139-150.
- Ali, B., Hasan, S.A., Hayat, S., Hayat, Q., Yadav, S., Fariduddin, Q. ve Ahmad, A. (2008) A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek), *Environ Exp Bot*, 62: 153-159.
- Altmann, T. (1999) Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants, *Planta*, 208: 1-11.
- Amzallag, G.N. ve Vaisman, J. (2006) Influence of brassinosteroids on initiation of the root gravitropic response in *Pisum sativum* seedlings, *Biol Plantarum*, 50: 283-286.
- Anuradha, R. ve Ram Rao, S.E. (2011) Amelioration of Lead Toxicity in Radish (*Raphanus sativus* L.) Plants by Brassinolide, *Journal of Applied Biological Sciences*, 5, 43-48.
- Aquea, F., Federici, F., Moscoso, C., Vega, A., Jullian, P., Haseloff, J. ve Arce-Johnson, P. (2012) A molecular framework for the inhibition of Arabidopsis root growth in response to boron toxicity, *Plant Cell Environ*, 35: 719-734.
- Arnon, D. I. (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol*, 24: 1-15.

- Arteca, J.M. ve Arteca, R.N. (2001) Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plants, *Physiol Plantarum*, 112: 104-112.
- Arteca, R.N. ve Arteca, J.M. (2008) Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants, *J Exp Bot*, 59: 3019-3026.
- Ashraf, M., Akram, N.A., Arteca, R.N. ve Foolad, M.R. (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance, *Crit Rev Plant Sci*, 29: 162-190.
- Azpiroz, R., Wu, Y.W., Locascio, J.C. ve Feldmann, K.A. (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation, *Plant Cell*, 10: 219-230.
- Bajguz, A. (2000) Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide, *Plant Physiol Bioch*, 38: 797-801.
- Bajguz, A. (2007) Metabolism of brassinosteroids in plants, *Plant Physiol Bioch*, 45: 95-107.
- Bajguz, A. (2009) Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in *Chlorella vulgaris* subjected to short-term heat stress. *J Plant Physiol*, 166:882-886.
- Bajguz, A. (2010) An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress, *Environ Exp Bot*, 68: 175-179.
- Bajguz, A. ve Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiol Bioch*, 47: 1-8.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T. ve Yang, Z. (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 135: 1864-1864.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39: 205-207.

- Beauchamp, C. ve Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal Biochem*, 44: 276-287.
- Behnamnia, M., Kalantari, K. M. ve Ziaie, J. (2009) The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress, *Turk J Bot*, 33: 417-428.
- Belkhadir, Y. ve Chory, J. (2006) Brassinosteroid signaling: A paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface, *Science*, 314: 1410-1411.
- Bergmeyer, M. (1970) Methoden der Enzymatischen Analyse, *Akademie Verlag*, 1: 636-647.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., ve Delseny, M. (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol*, 67: 107-124.
- Blevins, D.G. ve Lukaszewski, K.M. (1998) Boron in plant structure and function, *Annu Rev Plant Phys*, 49: 481-500.
- Bolanos, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I. ve Blevins, D. (2004) Why boron?, *Plant Physiol Bioch*, 42: 907-912.
- Bollag, D.M. ve Edelstein, S.J. (1991) Protein Methods, 50-55, Bollag, DM., Edelstein SJ. (editörler), *Protein concentration determination*, Wiley-Liss, New York, 152s.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brown, P.H. ve Shelp, B. J. (1997) Boron mobility in plants, *Plant Soil*, 193: 85-101.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Hu, H.N. ve Dandekar, A. (1999) Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency, *Plant Physiol*, 119: 17-20.

- Camacho-Cristobal, J.J., Rexach, J. ve Gonzalez-Fontes, A. (2008) Boron in plants: Deficiency and toxicity, *J Integr Plant Biol*, 50: 1247-1255.
- Cao, S.Q., Xu, Q.T., Cao, Y.J., Qian, K., An, K., Zhu, Y. ve Kuai, B.K. (2005) Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in Arabidopsis, *Physiol Plantarum*, 123: 57-66.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, *Planta*, 212: 475-486.
- Clouse, S.D. (2003) Recent advances in brassinosteroid research: From molecular mechanisms to practical applications, *J Plant Growth Regul*, 22: 273-275.
- Clouse, S.D. (2008) The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in Arabidopsis, *PNAS*, 105: 7345-7346.
- Clouse, S.D., Langford, M. ve Mcmorris, T.C. (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development, *Plant Physiol*, 111: 671-678.
- Clouse, S.D. ve Sasse, J.M. (1998) Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development, *Annu Rev Plant Physiol*, 49: 427-451.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V. ve Bansal, K.C. (2009) Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance, *J Biotechnol*, 139: 137-145.
- Davis, P.H. (1965) *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburg., 489-490s.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Leon-Kloosterziel, K.M. ve Koornneef, M. (2001) The *TRANSPARENT TESTA12* gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium, *Plant Cell*, 13: 853-871.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I. ve Srebnik, M. (2002) Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms, *Plant Sci*, 163: 931-942.

- Deng, Z.P., Zhang, X., Tang, W.Q., Osés-Prieto, J.A., Suzuki, N., Gendron, J.M. ve Wang, Z.Y. (2007) A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*, *Mol. Cell. Proteomics*, 6: 2058-2071.
- Desikan, R., Mackerness, S.A. H., Hancock, J.T. ve Neill, S.J. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress, *Plant Physiol*, 127: 159-172.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. ve Krishna, P. (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings, *Plant Mol Biol*, 40, 333-342.
- Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R. ve Krishna, P. (2002) Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress, *Plant J*, 29: 681-691.
- Diener, A.C., Gaxiola, R.A. ve Fink, G.R. (2001) *Arabidopsis* *ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins, *Plant Cell*, 13: 1625-38.
- Divi, U.K. ve Krishna, P. (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance, *New Biotechnol*, 26: 131-136.
- Divi, U.K., Rahman, T. ve Krishna, P. (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways, *Bmc Plant Biol*, 10: 151-165.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. ve Rogers, E.E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation, *Plant Physiol*, 144: 197-205.
- Edwards, K., Johnstone, C. ve Thompson, C. (1991) A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis, *Nucleic Acids Res*, 19: 1349-1349.
- El-Khallal, S.M., Hathout, T.A., Ahsour, A.R.A. ve Kerit, A.A.A. (2009) Brassinolide and salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress, *Res J Agric Biol Sci*, 5: 5-10.

- Emebiri, L., Michael, P. ve Moody, D. (2009) Enhanced tolerance to boron toxicity in two-rowed barley by marker-assisted introgression of favourable alleles derived from Sahara 3771, *Plant Soil*, 314: 77-85.
- Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D. ve Barbier-Brygoo, H. (1999) The sax1 dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid, *Plant J*, 18: 303-314.
- Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S. ve Ahmad, A. (2009) Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L., *Acta Physiol Plant*, 31: 889-897.
- Fu, F.Q., Mao, W.H., Shi, K., Zhou, Y.H., Asami, T. ve Yu, J.Q. (2008) A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber, *J Exp Bot*, 59: 2299-2308.
- Fujiwara, T., Hirai, M.Y., Chino, M., Komeda, Y. ve Naito, S. (1992) Effects of Sulfur Nutrition on Expression of the Soybean Seed Storage Protein Genes in Transgenic Petunia, *Plant Physiol*, 99: 263-268.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S. ve Yoshida, S. (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 130: 1319-34.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. ve Yoshida, S. (2004) Comprehensive comparison brassinosteroid-regulated of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in arabidopsis, *Plant Physiol*, 134: 1555-1573.
- Gonzalez-Garcia, M.P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E. ve Cano-Delgado, A.I. (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots, *Development*, 138: 849-859.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S. ve Sahin, O. (2006) Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity, *Sci Hortic-Amsterdam*, 110, 279-284.

- Günes, A., Alpaslan, M., Özcan, H. ve Çıkılı, Y. (2000) Türkiye’de Yaygın Olarak Yetiştirilen Mısır (*Zea mays* L.) Çeşitlerinin Bor Toksisitesine Duyarlılıkları, *Turk J Agric For*, 24: 277–282.
- Hamada, K. (1986) Brassinolide: some effects of crop cultivations, *Plant Growth Regul*, 15: 65-69.
- Hasan, S. A., Hayat, S. ve Ahmad, A. (2011) Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars, *Chemosphere*, 84: 1446-1451.
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A. ve Ahmad, A. (2007) Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*, *Environ Exp Bot*, 60: 33-41.
- Hayat, S., Alyemeni, M.N. ve Hasan, S.A. (2012) Foliar spray of brassinosteroid enhances yield and quality of *Solanum lycopersicum* under cadmium stress, *Saudi J Biol Sci*, 19 (3): 325-335.
- Herrera-Rodriguez, M.B., Gonzales-Fontes, A., Rexach, J., Camacho-Cristobal, J.J., Maldonado, J.M. ve Navarro-Gochicoa, M.T. (2010) Role of Boron in Vascular Plants and Response Mechanism to Boron Stress, *Plant Stress*, 4: 115-122.
- Hu, H.N. ve Brown, P.H. (1997) Absorption of boron by plant roots, *Plant Soil*, 193: 49-58.
- Hu, Y.X., Bao, F. ve Li, J.Y. (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis, *Plant J*, 24: 693-701.
- Ikekawa, N. ve Zhao, Y. (1991) Application of 24-epibrassinolide in agriculture. 280-291, Cutler, H.G., Yokota, T. ve Adam, G. (editörler) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, 474s.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S. ve Sarin, N.B. (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Cell Rep*, 20: 463-468.

- Jefferies, S.P., Barr, A.R., Karakousis, A., Kretschmer, J.M., Manning, S., Chalmers, K. J. ve Langridge, P. (1999) Mapping of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theo Appl Genet*, 98: 1293-1303.
- Jiang, Y.P., Cheng, F., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K. ve Yu, J.Q. (2012) Brassinosteroid-induced CO₂ assimilation is associated with increased stability of redox-sensitive photosynthetic enzymes in the chloroplasts in cucumber plants, *Biochem Bioph Res Co*, 426: 390-394.
- Kagale, S., Divi, U.K., Krochko, J.E., Keller, W.A. ve Krishna, P. (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses, *Planta*, 225: 353-364.
- Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Toyoda, A. ve Fujiwara, T. (2010) High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*, *J Biol Chem*, 286: 6175-83.
- Kasajima, I. ve Fujiwara, T. (2007) Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron, *Plant Biotech*, 24: 344-360.
- Kastori, R.R., Maksimovic, I.V., Kraljevic-Balalic, M.M. ve Kobiljski, B.D. (2008) Physiological and genetic basis of plant tolerance to excess boron, *Proc Nat Sci Matica Srpska Novi Sad*, 114: 41-51.
- Khripach, V., Zhabinskii, V. ve Karnachuk, R. (2003) Brassinosteroids: A new role of steroids as bio-signaling molecules, 153-165, Schneider M.P. (editör) *Chemical Probes in Biology: Science at the Interface of Chemistry, Biology and Medicine*, NATO Science Series, Amsterdam, 409s.
- Kocabek, T., Svoboda, Z., Al-Zwi, A.M., Rolfe, S.A. ve Fellner, M. (2009) Boron-regulated hypocotyl elongation is affected in *Arabidopsis* mutants with defects in light signalling pathways, *EnvironExp Bot*, 67: 101-111.
- Koka, C.V., Cerny, R.E., Gardner, R.G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S. and Clouse, S.D. (2000) A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response, *Plant Physiol*, 122: 85-98.

- Kreps, J.A., Wu, Y.J., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X. ve Harper, J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress, *Plant Physiol*, 130: 2129-2141.
- Krishna, P. (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses, *J Plant Growth Regul*, 22: 289-297.
- Landi, M., Remorini, D., Pardossi, A. ve Guidi, L. (2013) Boron excess affects photosynthesis and antioxidant apparatus of greenhouse *Cucurbita pepo* and *Cucumis sativus*, *J. Plant Res.* 126: 775-786.
- Li, L. ve Yi, H. (2012) Differential expression of *Arabidopsis* defense-related genes in response to sulfur dioxide, *Chemosphere*, 87: 718-24.
- Lisso, J., Steinhauser, D., Altmann, T., Kopka, J. ve Mussig, C. (2005) Identification of brassinosteroid-related genes by means of transcript co-response analyses, *Nucleic Acids Res*, 33: 2685-2696.
- Liu, T., Zhang, J., Wang, M., Wang, Z., Li, G., Qu, L. ve Wang, G. (2007) Expression and functional analysis of ZmDWF4, an ortholog of *Arabidopsis* DWF4 from maize (*Zea mays* L.), *Plant Cell Rep*, 26: 2091-2099.
- Madhava Rao, K.V. ve Sresty, T.V.S. (2000) Antioxidative parameters in the seedling of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stres, *Plant Sci*, 157: 133-128.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci*, 7: 405-410.
- Miwa, K., Takano, J. ve Fujiwara, T. (2006a) Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J*, 46: 1084-1091.
- Miwa, K., Takano, J., Seki, M., Shinozaki, K. ve Fujiwara, T. (2006b) Roles of BOR3-5 in boron transport in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol*, 47:154.
- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki M., Shinozaki K. ve Fujiwara, T. (2007) Plants Tolerant of High Boron Levels,*Science*,318: 141.

- Miwa, K. ve Fujiwara, T. (2010) Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters, *Ann Bot-London*, 105: 1103-1108.
- Miwa, K. ve Fujiwara, T. (2011) Role of overexpressed *BOR4*, a boron exporter, in tolerance to high level of boron in shoots, *Soil Sci Plant Nutr*, 57:558-565.
- Miwa, K., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T. ve Fujiwara, T. (2013) Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 163:1699-1709.
- Mussig, C., Fischer, S. ve Altmann, T. (2002) Brassinosteroid-regulated gene expression, *Plant Physiol*, 129: 1241-51.
- Mussig, C. ve Altmann, T. (2003) Genomic Brassinosteroid Effects, *J Plant Growth Regul*, 22: 313-324.
- Mussig, C., Shin, G.H. ve Altmann, T. (2003) Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 133: 1261-71.
- Nable, R.O., Banuelos, G.S. ve Paull, J.G. (1997) Boron toxicity, *Plant Soil*, 193: 181-198.
- Nakano, Y. ve Asada, K. (1981) Hydrogen-Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach-Chloroplasts, *Plant Cell Physiol*, 22: 867-880.
- Nemhauser, J. L. ve Chory, J. (2004) BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action, *J Exp Bot*, 55: 265-270.
- Nemhauser, J. L., Hong, F. ve Chory, J. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses, *Cell*, 126(3):467-475.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. ve Hofte, H. (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis, *Embo J*, 17: 5563-5576.

- Ogwenio, J.O., Song, X.S., Shi, K., Hu, W.H., Mao, W.H., Zhou, Y.H. ve Nogues, S. (2008) Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*, *J Plant Growth Regul*, 27: 49-57.
- Okamoto, M., Tsuboi, Y., Goda, H., Yoshizumi, T., Shimada, Y. ve Hirayama, T. (2012) Multiple hormone treatment revealed novel cooperative relationships between abscisic acid and biotic stress hormones in cultured cells, *Plant Biotech*, 29: 19-34.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M. ve Moriyama, Y. (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations, *Trends Pharmacol Sci*, 27: 587-593.
- Oz, M.T., Yilmaz, R., Eyidogan, F., De Graaff, L., Yucel, M. ve Oktem, H.A. (2009) Microarray Analysis of Late Response to Boron Toxicity in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves, *Turk J Agric For*, 33: 191-202.
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N. ve Therios, I. N. (2003) Response of two citrus genotypes to six boron concentrations: concentration and distribution of nutrients, total absorption, and nutrient use efficiency, *Aust J Agr Res*, 54: 571-580.
- Park, H.J., Jung, W.Y., Lee, S.S., Song, J.H., Kwon, S.Y., Kim, H. ve Cho, H.S. (2013) Use of Heat Stress Responsive Gene Expression Levels for Early Selection of Heat Tolerant Cabbage (*Brassica oleracea* L.), *IntJ MolSci*, 14: 11871-11894.
- Parker, M.D. ve Boron, W.F. (2013) The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters, *Physiol Rev*, 93:803-959.
- Parsell, D.A., Taulien, J. ve Lindquist, S. (1993) The Role of Heat-Shock Proteins in Thermotolerance, *Philos TRoy SocB*, 339: 279-286.
- Radojevic, M. ve Bashkin, V. N. (1999)*Practical environmental analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cornwall, UK, 466s.
- Rady, M.M. (2011) Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress, *Sci Hortic-Amsterdam*, 129: 232-237.

- Rao, S.S.R., Vardhini, B.V., Sujatha, E. ve Anuradha, S. (2002) Brassinosteroids - A new class of phytohormones, *Curr Sci India*, 82: 1239-1245.
- Rayirath, P., Benkel, B., Hodges, D.M., Allan-Wojtas, P., Mackinnon, S., Critchley, A.T. ve Prithiviraj, B. (2009) Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 230, 135-147.
- Reid, R. (2007) Update on boron toxicity and tolerance in plants, 83-90, Xu, F., Goldbach, H., Brown P.H., Bell, R.W., Fujiwara, T., Hunt, C.D., Goldberg S., Shi, L. (editörler), *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, Springer, 401s.
- Reid, R. (2010) Can we really increase yields by making crop plants tolerant to boron toxicity?, *Plant Sci*, 178: 9-11.
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R. ve Graham, R.D. (2004) A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant Cell Environ*, 27: 1405-1414.
- Reyes, J.L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y.I., Karlson, D.T. ve Covarrubias, A.A. (2008) Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection, *Plant Cell Environ*, 31: 1781-1790.
- Robert, S., Bichet, A., Grandjean, O., Kierzkowski, D., Satiat-Jeunemaitre, B., Pelletier, S. ve Vernhettes, S. (2005) An Arabidopsis endo-1,4-beta-D-glucanase involved in cellulose synthesis undergoes regulated intracellular cycling, *Plant Cell*, 17: 3378-3389.
- Roddick, J.G., Rijkenberg, A.L. ve Ikekawa, N. (1993) Developmental Effects of 24-Epi brassinolide in Excised Roots of Tomato Grown-Invitro, *Physiol Plantarum*, 87: 453-458.
- Roessner, U., Patterson, J.H., Forbes, M.G., Fincher, G.B., Langridge, P. ve Bacic, A. (2006) An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics, *Plant Physiol*, 142: 1087-1101.
- Rogers, E.E. ve Gueriot, M.L. (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis, *Plant Cell*, 14: 1787-1799.

- Rymen, B., Coppens, F., Dhondt, S., Fiorani, F. ve Beemster, G.T. (2010) Kinematic analysis of cell division and expansion, *Methods Mol Biol*, 655: 203-27.
- Sakurai, A. (1999) Brassinosteroid biosynthesis, *Plant PhysiolBioch*, 37: 351-361.
- Sasse, J. M. (2003) Physiological actions of brassinosteroids: An update, *J Plant Growth Regul*, 22: 276-288.
- Savaldi-Goldstein, S. ve Chory, J. 2006. Brassinosteroids. 617-634, Taiz L., and Zeiger, E. (editörler) *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Massachusetts, 644s.
- Scebba, F., Sebastiani, L. ve Vitagliano, C. (2001) Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves, *Biol Plantarum*, 44: 41-46.
- Schutzendubel, A. ve Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J Exp Bot*, 53: 1351-1365.
- Shahbaz, M., Ashraf, M. ve Athar, H.U.R. (2008) Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)?, *Plant Growth Regul*, 55: 51-64.
- Sharma, P., Bhardwaj, R., Arora, N., Arora, H.K. ve Kumar, A. (2008) Effects of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*, *Biol Plantarum*, 52: 767-770.
- Singla, S. L., Pareek, A. ve Grover, A. (1997) Yeast HSP104 homologue rice HSP110 is developmentally and stress-regulated, *Plant Sci*, 125: 211-219.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Van Belleghem, F., Semane, B., Lin, D., Vangronsveld, J. ve Cuypers, A. (2008) Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol Biochem*, 46: 212-218.
- Steber, C. M. ve Mccourt, P. (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 125: 763-769.

- Stiles, A. R., Bautista, D., Atalay, E., Babaoglu, M. ve Terry, N. (2010) Mechanisms of Boron Tolerance and Accumulation in Plants: A Physiological Comparison of the Extremely Boron-Tolerant Plant Species, *Puccinellia distans*, with the Moderately Boron-Tolerant *Gypsophila arrostil*, *Environ Sci Technol*, 44: 7089-7095.
- Symons, G.M., Ross, J.J., Jager, C.E. ve Reid, J.B. (2008) Brassinosteroid transport, *J Exp Bot*, 59: 17-24.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. ve Fujiwara T. (2002) Arabidopsis boron transporter for xylem loading, *Nature*, 420:337-340.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., Von Wiren, N. ve Fujiwara, T. (2006) The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation, *Plant Cell*, 18: 1498-1509.
- Takano, J., Miwa, K. ve Fujiwara, T. (2008) Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters, *Trends Plant Sci*, 13: 451-457.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K. ve Fujiwara, T. (2010) Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 5220-5225.
- Tanaka, M. ve Fujiwara, T. (2008) Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants, *Pflug Arch Eur J Phy*, 456: 671-677.
- Tanaka, M., Wallace, I. S., Takano, J., Roberts, D. M. ve Fujiwara, T. (2008) NIP6;1 Is a Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron to Growing Shoot Tissues in Arabidopsis, *Plant Cell*, 20: 2860-2875.
- Taner, S., Sade, B., Kaya, Y., Çeri, S. ve Gezgin, S. (2003) Bor miktarı yüksek topraklarda yetiştirilen makarnalık buğday (*Triticum durum* L.) çeşitlerine uygulanan borun verim ve bazı verim öğelerine etkisi, *Tarla Bit Merkez Araş Ens Derg*, 4: 11-16.
- Unver, T., Bozkurt, O. ve Akkaya, M. S. (2008) Identification of differentially expressed transcripts from leaves of the boron tolerant plant *Gypsophila perfoliata* L., *Plant Cell Rep*, 27: 1411-1422.

- Uozu, S., Tanaka-Ueguchi, M., Kitano, H., Hattori, K. ve Matsuoka, M. (2000) Characterization of XET-related genes of rice, *Plant Physiol*, 122: 853-859.
- Van Aken, O., Zhang, B.T., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E. ve Whelan, J. (2009) Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Plant*, 2: 1310-1324.
- Vierling, E. (1991) The Roles of Heat-Shock Proteins in Plants, *Annu Rev Plant Phys*, 42: 579-620.
- Vriet, C., Russinova, E. ve Reuzeau, C. (2012) Boosting crop yields with plant steroids, *Plant Cell*, 24:842-857.
- Waters, M.T., Nelson, D.C., Scaffidi, A., Flematti, G.R., Sun, Y.K.M., Dixon, K.W. ve Smith, S.M. (2012) Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*, *Development*, 139: 1285-1295.
- Woeste, K.E., Vogel, J.P. ve Kieber, J.J. (1999) Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Physiol Plantarum*, 105: 478-484.
- Xia, X.J., Wang, Y.J., Zhou, Y.H., Tao, Y., Mao, W.H., Shi, K. ve Yu, J.Q. (2009) Reactive Oxygen Species Are Involved in Brassinosteroid- Induced Stress Tolerance in Cucumber, *Plant Physiol*, 150: 801-814.
- Xie, L.Q., Yang, C.J. ve Wang, X.L. (2011) Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis*, *JExpBot*, 62: 4495-4506.
- Xu, W., Purugganan, M.M., Polisensky, D.H., Antosiewicz, D.M., Fry, S.C. ve Braam, J. (1995) *Arabidopsis* Tch4, Regulated by Hormones and the Environment, Encodes a Xyloglucan Endotransglycosylase, *Plant Cell*, 7: 1555-1567.
- Yamaguchishinozaki, K. ve Shinozaki, K. (1994) A Novel Cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature or High-Salt Stress, *Plant Cell*, 6: 251-264.

- Yi, H.C., Joo, S., Nam, K.H., Lee, J.S., Kang, B.G. ve Kim, W.T. (1999) Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.), *Plant Mol Biol*, 41: 443-454.
- Yokota, T. (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends Plant Sci*, 2: 137-143.
- Yuan, G.F., Jia, C.G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L.P., Liu, N. ve Wang, Q.M. (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress, *Sci Hortic-Amsterdam*, 126, 103-108.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q. ve Ahmad, A. (2011) 28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants, *Chemosphere*, 85: 1574-1584.
- Yuxin, H., Zhengke, W., Yonghong, W., Fang, B., Ning, L., Zhenhua, P. ve Jiayang, L. (2001) Identification of brassinosteroid responsive genes in Arabidopsis by cDNA array, *Sci China Ser C*, 44: 637-643.
- Zeng, C.Y., Han, Y., Shi, L., Peng, L., Wang, Y.H., Xu, F.S. ve Meng, J.L. (2008) Genetic analysis of the physiological responses to low boron stress in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell Environ*, 31: 112-122.
- Zeng, H.T., Tang, Q. ve Hua, X.J. (2010) Arabidopsis Brassinosteroid Mutants det2-1 and bin2-1 Display Altered Salt Tolerance, *J Plant Growth Regul*, 29: 44-52.
- Zhang, Y.P., Zhu, X.H., Ding, H.D., Yang, S.J. ve Chen, Y.Y. (2013) Foliar application of 24-epibrassinolide alleviates high-temperature induced inhibition of photosynthesis in seedlings of two melon cultivars, *Photosynthetica*, 51: 341-349.
- Zhang, S., Cai, Z. ve Wang, X. (2009) The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling, *PNAS*, 106(11):4543-4548.
- Zurek, D.M. ve 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.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Yonca SURGUN

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi:07/07/1983

Yabancı Dil Puanı :71,25 (İngilizce)

Telefon : 05546106580

E-posta : yoncasurgun@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	İzmir Kız Lisesi	2001
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2005
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2008
Doktora	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2015

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2005-2015	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	

Görev Yapılan Laboratuvar Dersleri

Güz Dönemi	Bahar Dönemi
Genel Sitoloji Laboratuvarı	Genetik Laboratuvarı
Biyokimya Laboratuvarı	Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
Laboratuvar Teknikleri	Botanik Laboratuvarı

Araştırma Projeleri

Proje Adı:Mikroçoğaltılan Pamuk Bitkilerinde Somaklona Varyasyonun Belirlenmesi (Sonuçlandı)

Proje Destekleyen Kurum: M.S.K.Ü.BAP

Proje Yöneticisi:Prof. Dr. BetülBürün

Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Yonca Surgun

Proje Adı:Pamuk Genotipleri Arasındaki Farklılığın RAPD Tekniğı ile Belirlenmesi (Sonuçlandı)

Proje Destekleyen Kurum: M.S.K.Ü.BAP

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. BetülBürün

Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Yonca Surgun

Proje Adı:Farklı Bor Konsantrasyonlarında Yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* L. Bitkilerinde 24-Epibrassinolid'in Etkilerinin Araştırılması (Sonuçlandı)

Proje Destekleyen Kurum: M.S.K.Ü.BAP

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. BetülBürün

Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Yonca Surgun

Proje Adı:Bor-Brassinosteroid Uygulamasının *Arabidopsis thaliana*'da Bazı Aday Genlerin mRNA Seviyeleri Üzerine Etkisinin RT-PCR ile Analizi (Devam ediyor)

Proje Destekleyen Kurum: M.S.K.Ü.BAP

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. BetülBürün

Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Yonca Surgun

ESERLER

A. SCI veya SCI Expanded, SSCI, AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale

A1. Surgun Y., Çöl B., Bürün B. 2012. Genetic diversity and identification of some Turkish cotton genotypes (*Gossypium hirsutum* L.) by RAPD-PCR analysis, Turkish Journal of Biology, 36 : 143-150.

B. SCI veya SCI-Expanded, SSCI, AHCI dışındaki uluslararası indexler tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale

B1. Surgun Y., Yılmaz E., Çöl B., Bürün B. 2014. Callus Induction, In vitro Shoot Development and Somaclonal Variations in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Journal of Applied Biological Sciences 8(2): 62-68.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanmış tam makale

C1. Surgun Y., Yılmaz E., Çöl B., Bürün B. 2012. Altıncı Grup Bitki Hormonu: Brassinosteroidler, C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 8(1) : 27-46.

D. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özet Metin Basılan Bildiriler

D1. Surgun Y., Yılmaz E., Çöl B., Bürün B. 2014. Callus Induction, In vitro Shoot Development and Somaclonal Variations in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), 3 rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, 2-6 Haziran, Sarajevo-Bosnia-Herzegovina (İngilizce Sözlü sunu).

D2. Surgun Y., Bürün B. 2014. The Effects of Various Concentrations of Boric Acid and 24-Epibrassinolide on Germination, Growth and Pigment Contents in *Arabidopsis thaliana* (L.), 3 rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, 2-6 Haziran, Sarajevo-Bosnia-Herzegovina.

E. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Tam Metin Basılan Bildiriler

- E1.** Yılmaz E., Aldemir G., **Surgun Y.**, Bürün B., 2013. Bitki Genetik Kaynaklarının Önemi, Korunması ve Yararlanılması, Biyolojik Çeşitlilik Sempozyumu, s: 267-271, 22-23 Mayıs, Marmaris-Muğla.
- E2.**Güneri M., **Surgun Y.**, Bürün B., 2011. Meyvecilikte Biyoteknolojik Uygulamalar, Uluslararası I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-30 Nisan, Vol:3 s: 2723-2728, Eskişehir.
- E3.** Yılmaz E., **Surgun Y.**, Bürün B., 2009. Pamuk Sürgün Ucu Kültürlerinde Epibrassinolid ve Homobrassinolid Uygulmasının Etkisi, 16. Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık, s:102-105, Antalya (Sözlü sunu).
- E4.****Surgun Y.**, Aksakal Ş., Bürün B., 2007. Pamuk Çeşitlerinin Sürgün Ucu Kültüründe Brassinosteroidlerin Kullanımı, XV. Biyoteknoloji Kongresi, 28–31 Ekim, s:161-164, Antalya (Sözlü sunu).
- E5.****Surgun Y.**, Bürün B., 2006. Pamukta biyoteknolojik gelişmeler, Biyoteknoloji Yüzyılı ve Türkiye Kongresi, 03-04 Haziran s:53-60, İstanbul (Sözlü sunu).

F. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özet Metin Basılan Bildiriler

- F1.** Aldemir G., **Surgun Y.**, Bürün B., 2012. Bitki Sitogenetiğinde Moleküler Çalışmalar, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım, Antalya.
- F2.****Surgun Y.**, Bürün B., 2012. *Arabidopsis thaliana* L.(Brassicaceae)için laboratuvar çalışmalarına elverişli, kolay ve ekonomik bir hidroponik kültür sistemi, Uluslararası katılımlı 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, İzmir (Sözlü sunu).
- F3.** Yılmaz E., **Surgun Y.**, Bürün B., 2010. Pamuk Kallus Kültürlerinde Brassinosteroidlerin Etkisi, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, Denizli.
- F4.****Surgun Y.**, Yılmaz E., Bürün B., 2009. Genetik mühendisliği ve çevresel riskler, 9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 7-10 Ekim, Nevşehir.
- F5.** Köşkeroğlu S., **Surgun Y.**, Tuna A.L., Bürün B., Yokaş İ., 2008. Pamuk Kalluslarında Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'ün Etkisi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23 27 Haziran, Trabzon (Sözlü sunu).

- F6. Surgun Y.,** Altan F., Çöl B., Tanyolaç B.,Bürün B., 2008. Pamuk sürgün ucu kültürlerinde genetik farklılığın PZR’a dayalı moleküler teknikler ile belirlenmesi, Uluslar arası katılımlı IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim, İzmir (Sözlü sunu).
- F7.Surgun Y.,** Bürün B., 2007. Tarımsal biyoteknoloji çalışmaları ve çevreye etkileri, XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, Malatya (Sözlü sunu).
- F8. Surgun Y.,** 2006. Su Ürünlerinde Biyoteknolojik Uygulamalar, 3. Ulusal Su Ürünleri Öğrenci Sempozyumu, 22-24 Mayıs, Muğla (Sözlü sunu).
- F9. Bürün B, Surgun Y.,** Altan F., 2006. Bitki biyoteknolojisinde son gelişmeler, Uluslararası katılımlı 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26–30 Haziran, Kuşadası-Aydın.

G.Atıflar

Surgun Y., Çöl B., Bürün B. 2012. Genetic diversity and identification of some Turkish cotton genotypes (*Gossypium hirsutum* L.) by RAPD-PCR analysis, Turkish Journal of Biology, 36 : 143-150.—Atıf sayısı:7 (2015)

H.Diğer Akademik Faaliyetler

H1. Katılım yapılan kurslar

1. DNA Markörleri ve Bitki Islahında Kullanımı Kursu, 19-20 Ocak 2006, Adana.
2. Tübitak tarafından düzenlenen “Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen ve Sağlık Bilimcileri için Proje Hazırlama ve Yürütme Becerilerinin Geliştirilmesi” Kursu, 27-28 Kasım-09Aralık 2013, Muğla.
3. 1. Florasan İn Situ Hibridizasyon Tekniği ve Bitkilerde Kullanım Alanları Kursu, 04-08 Ağustos 2014, Tekirdağ.

H2. Katılım yapılan kongre ve sempozyumlar

1. Uluslararası katılımlı 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26–30 Haziran, Kuşadası-Aydın.
2. 3. Ulusal Su Ürünleri Öğrenci Sempozyumu, 22-24 Mayıs, Muğla.
3. Biyoteknoloji Yüzyılı ve Türkiye Kongresi, 03-04 Haziran, İstanbul.
4. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, Malatya.
5. XV. Biyoteknoloji Kongresi, 28–31 Ekim, Antalya.
6. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23 27 Haziran, Trabzon.
7. Uluslararası katılımlı IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim, İzmir.
8. 9. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 7-10 Ekim, Nevşehir.
9. Uluslararası katılımlı 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, İzmir.
10. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım, Antalya.
11. 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 2-6 June, Sarajevo-Bosnia-Herzegovina.

H3. Yurtdışı Deneyimi

Lisans öğreniminin son yarısında Erasmus Öğrenci Değişim Programı ile 6 ay süreyle Belçika Ghent Üniversitesinde ders alındı ve üniversiteye bağlı V.I.B. araştırma merkezinde “Cell cycle in Arabidopsis” projesinde yardımcı araştırmacı olarak çalışıldı (2005).

Doktora ders döneminin sonunda 3 ay süreyle Erasmus Staj Hareketliliği Programı ile Belçika Antwerpen Üniversitesi Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyoteknoloji Laboratuvarında “Auxin response in drought stress” projesinde yardımcı araştırmacı olarak çalışıldı (2010).

H4. Ödüller

2005 yılında Lisans Bölüm Birinciliği ödülü alınmıştır.