T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKIR STRESİ VE BRASSİNOSTEROİDLERİN AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) ÜZERİNE ETKİLERİ

Kevser Betül CEYLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Aralık, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 15/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

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

Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Yıldız AYDIN
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 43403 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI' ya;

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine ve yardımcılarına, tezimin her aşamasında büyük destek ve yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Sevgi MARAKLI'ya,

Tüm hayatım boyunca bana güvenen, gerek maddi gerekse manevi destekte bulunan AİLEME ve eşim Yusuf CEYLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Aralık, 2014 Kevser Betül CEYLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **iv**
TABLO LİSTESİ ..... **v**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **vi**
SUMMARY ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) 3
2.2. BAKIR STRESİ 4
2.2.1. Stresin Proteinler Üzerine Etkisi 6
2.2.2. Stresin İyonlar Üzerine Etkisi 6
2.2.3. Stresin Oksidatif Etkisi 6
2.3. STRESE KARŞI TOLERANS 7
2.4. ANTİOKSİDAN SİSTEM 8
2.4.1. Katalaz (CAT) 8
2.5. BRASSİNOSTEROİDLER (BR) 9
2.5.1. Brassinosteroid Hormonunun Yapısı 10
2.5.2. Brassinosteroid Metabolizması 10
2.5.3. Brassinosteroid Hormonunun Etkileri 12
3. MALZEME VE YÖNTEM **13**
3.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI 13
3.1.1. Uygulanacak Bakır ve Brassinosteroid Konsantrasyonunun Belirlenmesi 13
3.2. FİZYOLOJİK ÇALIŞMALAR 14
3.2.1. Ayçiçeği Tohumlarından Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini 14
3.2.2. SDS-PAGE 15
3.2.3. Katalaz Aktivite Tayini 17
3.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR 17
3.3.1. Total RNA İzolasyonu 17

3.3.2. RNA JEL ELEKTROFOREZİ 18
3.3.3. DNaz I Uygulaması ve cDNA SENTEZİ 19
3.3.4. Revers Transkritaz PCR (RT-PCR) 20
4. BULGULAR 22
4.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI 22
4.1.1. Uygulanacak Bakır ve Brassinosteroid Konstrasyonlarının Belirlenmesi 22
4.2. MORFOLOJİK ÇALIŞMALAR 24
4.2.1. Bakır ve Brassinosteroid Uygulamasının Primer Kök Uzunluğuna Etkilerinin Belirlenmesi 24
4.3. FİZYOLOJİK ÇALIŞMALAR 26
4.3.1. Bakır ve Brassinosteroid Uygulamasının Total Protein Miktarına Etkilerinin Belirlenmesi 26
4.3.2. SDS-PAGE Analizi 28
4.3.3. CAT Aktivitesinin Belirlenmesi 28
4.4. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR 30
4.4.1. CAT RT-PCR Analizi 30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 31
KAYNAKLAR 35
ÖZGEÇMİŞ 46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Brassinolidin biyosentezi (Bishop ve Koncz, 2002). 11

Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan ayçiçeği tohumları. 13

Şekil 4.1: TR003 varyetesine ait 48 saatlik primer kök görüntüsü. 23

Şekil 4.2: TR003 varyetesine ait 72 saatlik primer kök görüntüsü.....23

Şekil 4.3: 48 saat boyunca çimlendirilen ayçiçeği primer kök uzunlukları. 25

Şekil 4.4: 72 saat boyunca çimlendirilen ayçiçeği primer kök uzunlukları. 26

Şekil 4.5: 72 saatlik örneklerin protein miktarları. 27

Şekil 4.6: 72 saatlik örneklerin SDS-PAGE analizi. 28

Şekil 4.7: 72 saatlik örneklerin CAT aktivite analizi. 29

Şekil 4.8: CAT RT-PCR sonuçları. 30

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Parçalama tamponu içeriği. 15

Tablo 3.2: 5X Bradford belirteci içeriği.....15

Tablo 3.3: SDS-PAGE'de kullanılan maddelerin içeriği 16

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kulllanılan bileşenler.....19

Tablo 3.5: DNaz I reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.....19

Tablo 3.6: cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler.....20

Tablo 3.7: cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler.....20

Tablo 3.8: RT-PCR bileşenleri ve miktarları... 20

Tablo 3.9: RT-PCR döngüleri.... 21

Tablo 3.10: RT-PCR'da kullanılan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve hedef büyüklükleri.... 21

Tablo 4.1 : Karanlıkta filtre kağıdı arasında 48 ve 72 saat boyunca çimlendirilen ayçiçeği kök uzunlukları.... 24

Tablo 4.2: 72 saat sonrasında ölçülen protein miktarları... 27

Tablo 4.3: 72 saat sonrasında ölçülen CAT enzim aktivitesi... 29

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µ	**:** Mikro
Δ	**:** Delta
Δ_{240}	: 240 nm dalga boylu ışıkla ölçülen absorbansın zamanla değişimi

Kısaltmalar	Açıklama
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
APS	: Amonyum persülfat
A_{560}	: 560 nm dalga boylu ışıkta ölçülen absorbans
BR	: Brassinosteroid
BSA	: Bovin serum albümin
bç	: Baz çifti
BL	: Brassinolid
C	: Sitozin
CAT	: Katalaz
^{o}C	: Santigrad derece
cDNA	: Tamamlayıcı DNA - “complementary DNA”
CK	: Sitokinin
cm	: Santimetre
CN	: Kampestanol
CS	: Kastasteron- “Castasterone”
$CuSO_4$	: Bakır sülfat
cv	: Kültür varyetesi – “cultivar”
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH_2O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Dezoksiribonükleotit trifosfat - “deoxyribonucleotide triphosphate”
DTT	: Dithiothreitol
EBL	: 24-epibrassinolid
EC 1.11.1.6	: Katalaz enziminin Enzim Komisyon (Enzyme Commission) numarası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
G	: Guanin
g	: Gram
HBR	: Homobrassinosteroid
HCl	: Hidroklorik asit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit

kb : Kilobaz
KCl : Potasyum klorür
kg : Kilogram
M : Molar
MB : Megabaz
mg : Miligram
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
mRNA : Mesajcı RNA
ml : Mililitre
mM : Milimolar
mm : Milimetre
N : Normal
n : Haploid kromozom sayısı
NaCl : Sodyum klorür
NADP : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT : p-nitrobluetetrazolium
ng : Nanogram
$^{*}O$: Singlet oksijen
OD : Optik dansite
O_2^- : Süperoksit radikali
OH^- : Hidroksil radikali
PAGE : Poliakrilamit jel elektroforezi – "Polyacrylamide Gel Electrophoresis"
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu - "Polymerase Chain Reaction"
RT-PCR : Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
POD : Peroksidaz
pg : Pikogram
pmol : Pikomol
RNA : Ribonükleik asit
RT : Ters Traskriptaz - "Reverse Transcriptase"
rpm : Dakikadaki devir sayısı - "revolutions per minute"
rRNA : Ribozomal RNA
ROS : Reaktif Oksijen türleri –"Reactive Oxygen species"
sp. : Tür "species"
ssp. : Alt tür "subspecies"
SOD : Süperoksit dismutaz
SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
T : Timin
TAE : Tris-asetat-edta
TBE : Tris-borik asit-edta
T.C. GBT : Türkiye Cumhuriyeti Gümrük ve Ticaret Bakanlığı
TEMED : Tetrametiletilendiamin
T_m : Erime sıcaklığı- "Temperature of melting"
tRNA : Transfer RNA
TTAE : Trakya Tarım Araştırma Enstitüsü
UV : "Ultra-violet" Ultraviyole
V : Volt
v/v : Hacim/hacim "Volume to volume"
w/v : Ağırlık/hacim "Weight to volume"

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKIR STRESİ VE BRASSİNOSTEROİDLERİN AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) ÜZERİNE ETKİLERİ

Kevser Betül CEYLAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik

Danışman : Prof. Dr. Nermin GÖZKIRMIZI

Bu tez çalışmasında ayçiçeğine (*Helianthus annuus* L.) ait tohumlar, 48 saat ve 72 saat boyunca bakır, Homobrassinostreoid (HBR) hormonu ve bakır + HBR hormonu uygulamaları altında çimlendirilerek elde edilen köklerin morfolojik, fizyolojik ve moleküler analizleri gerçekleştirildi. Çalışma, hem 48 saatlik hem de 72 saatlik analiz için kontrol (sadece dH_2O), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + HBR (30 µM bakır + 2 µM HBR, 40 µM bakır + 2 µM HBR) olmak üzere farklı deney grupları üzerinden yürütüldü. 48 saat ve 72 saat sonunda ayrı ayrı olmak üzere çimlenen ayçiçeği tohumlarının primer kök uzunlukları ölçüldü.

Bakır uygulamasının primer kök gelişimini, hem 48 saat hem de 72 saat sonunda kontrole göre belirgin şekilde olumsuz etkilediği gözlendi. Buna karşın HBR uygulamasının hem 48 saatte hem de 72 saat sonunda bakır stresinin olumsuz etkilerini düzelttiği görüldü.

72 saat boyunca çimlendirilen örneklerden protein izolasyonu yapılarak, örneklerin total protein miktarları belirlendi. Kontrol (4.28 ± 3.85) ile karşılaştırıldığında 30 µM bakır uygulanmış köklerde protein miktarının azaldığı (3.94 ± 3.44); 40 µM bakır stresinde çimlendirilen köklerde ise arttığı belirlendi (4.86 ± 5.3). Bakır + HBR uygulanan örneklerde ise, sadece bakır uygulanan ile karşılaştırıldığında, HBR uygulamasının protein miktarını arttırdığı tespit edildi.

Bakır ve hormon uygulamasının antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemek amacı ile katalaz enzimi (CAT) aktivitesi tayin edildi.

CAT enzim aktivitesinin sonuçları değerlendirildiğinde, kontrolle karşılaştırıldığında (0.16 ± 0.23), HBR uygulamasının enzim aktivitesini arttırdığı (30 µM bakır + 2 µM HBR için 0.39 ± 0.65; 40 µM bakır + 2 µM HBR için 0.22 ± 0.33 ve yalnızca 2 µM HBR için 0.21 ± 0.64) bununla birlikte yalnızca bakır uygulamalarının ise belirgin şekilde enzim aktivitesini azalttığı görüldü (30 µM bakır için 0.03 ± 0.02; 40 µM bakır için 0.08 ± 0.12).

Bakır ve HBR'nin ayçiçeği tohumu üzerine fizyolojik açıdan ortaya konulan etkileri, CAT enzim genlerinin anlatım profillerinin revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapılarak incelenmesi ile moleküler açıdan desteklendi. 72 saatlik örneklerden öncelikle RNA izolasyonu yapıldı ve bu izolatlardan RT-PCR'a kalıp olacak cDNA'lar oluşturuldu. CAT geni anlatımında ise örnekler arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Günümüzde ekilebilir arazilerin ağır metal kontaminasyonu nedeni ile giderek verimliliği azalmış ve gıda sağlığı tehdit altına girmiştir. Tez çalışması sonuçları doğrultusunda, HBR'nin ağır metallerin bitkiler üzerindeki olumsuz etkisini gidererek zirai uygulamalara pozitif bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Aralık, 2014, 47 sayfa.

Anahtar kelimeler: Ayçiçeği, *Helianthus annuus* L., bakır stresi, brassinosteroid, katalaz.

SUMMARY

MASTER THESIS

EFFECTS OF COPPER STRESS AND BRASSINOSTEROIDS ON SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Kevser Betül CEYLAN

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

In this thesis study; morphological, physiological and molecular analyzes were performed on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds which were germinated under copper, homobrassinosteroid (HBR) and copper + HBR for 48 and 72 hours. Study was carried out on different experimental groups including control (just dH_2O), copper (30 µM and 40 µM), HBR (2 µM) and copper + HBR (30 µM copper + 2 µM HBR, 40 µM copper + 2 µM HBR) for both 48 and 72 hours. At the end of 48 and 72 hour germination period, primary root lenghts of sunflowers were measured individually. It was found that copper application adversely affected root growth for both 48 and 72 hour treatments. In contrast, it was found that HBR application corrected the effects of copper stress at 48h and 72h, both (2 ± 0.38 for 30 µM + 2 µM HBR).

For physiological studies protein isolation was performed and protein amount of samples were determined. When the results were compared with the control group, it was determined that protein content of 30 µM copper stress-applied root lenghts decreased while it was increased at 40 µM copper stress. For the copper + HBR treatment, it was found that HBR application increased the protein content when it was compared with copper treated samples.

Catalase (CAT) enzyme activity was determined to examine the effects of copper and hormone application on antioxidant enzyme activities.

When CAT enzyme activity results were evaluated, compared with the control (0.16 ± 0.23), it was seen that HBR application increased the enzyme activity (0.39 ± 0.65 for 30 μM copper + 2 μM HBR; 0.22 ± 0.33 for 40 μM copper + 2 μM HBR and 0.21 ± 0.64 for just 2 μM HBR); however, sole copper applications found todecrease the enzyme activity significantly (0.03 ± 0.02 for 30 μM copper; 0.08 ± 0.12 for 40 μM copper application).

Physiologically disclosed effects of copper and HBRs on sunflower seeds have been supported with molecular studies in terms of examining CAT gene expression profile by RT-PCR. Firstly, RNA isolation from 72 hours-germinated samples was performed and these isolates were used as template cDNAs for RT-PCR. It was observed that CAT gene expression was the same for all examples.

Nowadays fertility of arable lands have been decreased due to heavy metal contamination and food safety has become under threat. These results indicate a positive role for HBR in reducing copper pollutant residues for agricultural applications.

December, 2014, 47 pages.

Keywords: Sunflower, *Helianthus annuus* L., copper stress, brassinosteroid, catalase.

1. GİRİŞ

Bakır (Cu), çeşitli kaya ve minerallerde bol bulunan ve bitkilerde büyüme ve gelişmede rol oynayan temel elementlerden biridir (Tanyolaç ve diğ., 2007). Bakır, bitkiler tarafından düşük miktarda ihtiyaç duyulan bir elementtir (Bowen, 1985). Redoks reaksiyonlarında kullanılan bir geçiş metali olan (Ouzounidou ve diğ., 1994; Monni ve diğ., 2000) bakır, hücresel seviyede oksidatif fosforilasyon, demir taşınımı ve transkripsiyonda önemli bir sinyal molekül olarak görev yaparken (Yruela, 2005), yüksek konsantrasyonda bitki büyümesine ket vurabilir (Monni ve diğ., 2000). Yüksek konsantrasyondaki bakır, proteinlerin işlevlerini ve enzim aktivitesini değiştirerek önemli derecede toksik etkilere yol açabilir. Bu toksisite, proteinlerde metallerin sülfidril gruplarına bağlanıp, aktivitelerin azalması ya da protein yapılarının bozulmasıyla sonuçlanabilir (Meharg, 1994). Bakır ayrıca bitki büyümesini de olumsuz etkiler. Bu büyüme gerilemesi; kök uzamasının gerilemesi, kök epidermal hücrelerinin ve kök hücre membranlarına zarar vermesi şeklinde olur. Bu element, fotosentezde önemli rol oynayan ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz ve fosfoenol piruvat karboksilaz gibi enzimleri de inhibe eder (Jiang ve Liu, 2001).

Bitkinin bakıra toleransı, bakırı köklerinde tutması, organellerde biriktirme ve hücre içi metal bağlayıcı kelatörlerin (metallotionin ve fitokelatin) bağlanması şeklinde olmaktadır (Wojcik ve Tukiendorf, 2003). Strese karşı toleransta antioksidan enzimleri de görev alır. Stres, reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species – ROS) artışına sebep olur. ROS, serbest radikalleri (süperoksit radikali - $O_2^{\cdot-}$, hidroperoksil radikali – $HO_2^{\cdot}$) ve radikal olmayan formları (hidrojen peroksit - H_2O_2 ve singlet oksijen - $^1O_2$) kapsar. Bitki hücreleri normal koşullar altında ROS'ların miktarını antioksidanlar (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz gibi) ve çeşitli korunma sistemleri ile düşük düzeyde tutmaktadır. Ancak, çevresel stres faktörlerin (ağır metaller, tuzluluk, kuraklık, yüksek veya düşük sıcaklık, UV, ozon gibi) etkisi altında antioksidan sistemlerin aktiviteleri azalır ve bu koşullar ROS'ların sentezlenmesini tetikleyerek birikimine neden olur.

Stres koşulları altında artan ROS'lar; bitki gelişiminde önemli rol oynayan hormonal sinyal üretiminde, hücre duvarı polimer yapısının değişiminde, bitkinin çevreyi algılamasıyla ilişkili mekanizmalarda, gen anlatımlarında, metabolik ve fizyolojik düzenlemelerde önemli işlevlere sahip olması nedeniyle "oksidatif sinyal molekülü" olarak da görev alırlar (Swanson ve Gilroy, 2010).

Bitki büyüme düzenleyicileri olarak adlandırılan fitohormonlar da abiyotik strese uyumda temel rol oynar (Santner ve Estelle, 2009; Wang ve diğ., 2009; Messing ve diğ., 2010). Salisilik asit (SA), jasmonat (JA), etilen (ET) ve oksin (Aux), biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı bitki savunma yanıtının düzenlemesinde görev alırlar (Glazebrook, 2005; Lorenzo ve Solano, 2005; Broekaert ve diğ., 2006; Loake ve Grant, 2007; Balbi ve Devoto, 2008; Fassler ve diğ., 2010). Sitokinin (CK); kök hücrelerinin farklılaşmasında, tohum gelişiminde, köklerin büyümesi ve dallanmasında ve bunun yanında stres toleransı olarak sayılabilecek önemli hücresel süreçlerde rol alan bir bitki hormonudur (Muller ve Sheen, 2007). Bu hormonların yanı sıra brassinosteroid (BR); bitkilerde, büyümenin düzenlenmesi, gelişim, çeşitli fizyolojik süreçlere yanıtta rol alan ve yapısal olarak hayvan steroid hormonuna benzeyen bir bitki hormonudur (Bajguz, 2007). BR'nin tohum çimlenmesi, hücre bölünmesi, hücre uzaması, fotomorfogenez, çiçeklenme, üreme, biyotik ve abiyotik strese yanıtta rol oynadığı bildirilmiştir (Taiz ve Zeiger, 2006; Bari ve Jones, 2009).

Bu tez çalışmasında; abiyotik stres etmenlerinden biri olan ağır metal streslerinden bakır stresinin, ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisi üzerine etkileri ve bu etkilerin brassinosteroid hormonu kullanımıyla nasıl değiştiği morfolojik, fizyolojik ve moleküler açıdan araştırılmıştır. Bu amaçla, ayçiçeği tohumları; sadece bakır (Cu), sadece HBR hormonu ve bakır + HBR içeren çözeltilerde 48 saat ve 72 saat süresince çimlendirildi. Morfolojik çalışmalarda bakır ve hormonun kök uzunlukları üzerine etkisi araştırıldı. Fizyolojik çalışmalarda protein miktarı belirlenerek, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE) ile desteklendi. Ayrıca, bakır ve hormonun katalaz aktivitesi üzerine etkileri değerlendirildi. Moleküler açıdan ise bu antioksidan enzimin gen anlatımı revers transkriptaz PCR (RT-PCR) ile incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)

Ayçiçeği *(Hellianthus annuus* L.); soya, kanola, ve yerfıstığı ile birlikte dünyada üretilen en önemli tek yıllık yağ bitkilerinden biridir (Putt, 1997). 2013 yılı üretim verilerine göre Türkiye, dünya ayçiçeği üretiminde ilk on ülke arasında yer almaktadır. Son on yıl ortalamasına göre 930 bin tonluk ayçiçeği üretimi ile son on yıllık ortalaması 32 milyon ton olan dünya ayçiçeği üretiminin yaklaşık %3'ünü gerçekleştirebilmektedir. (T.C. GTB, 2014)

Üretim miktarı ve tüketimden aldığı pay bakımından ayçiçeği, Türkiye'nin önemli yağ bitkilerinden biridir (Semerci ve Özer, 2011). Yüksek tarımsal üretim potansiyeline sahip olan ayçiçeği, Türkiye'nin bitkisel yağ üretimininde yaklaşık olarak %47'sini oluşturmaktadır (T.C. GTB, 2014). Yağı, çekirdeği ve küspesi ekonomik olarak değerli olan ayçiçeğinin kullanım alanlarından bazıları şunlardır:

- Ayçiçeği yağı, içerdiği doymamış yağ asitleri oranının yüksek (%69) olması nedeniyle, beslenme değeri en yüksek olan bitkisel yağlardan birisidir.
- Potasyum ve vitamin E bakımından da zengin olan ayçiçeği çekirdeği önemli bir linoleik asit kaynağıdır.
- Hasat sonrası artakalan sapları ile tohum kabukları yakacak olarak değerlendirilmektedir.
- Sapların yakılmasından elde edilen külde yüksek oranda (%36-40) potasyum bulunmaktadır. Bu küller tarlaya serpilmek suretiyle, gübre olarak değerlendirilmektedir
- Ayçiçeğinin sap ve tablaları; furfurol ekstraksiyonunda ve kağıt yapımında da kullanılmaktadır.
- Yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspede, yüksek oranda protein bulunmaktadır (kabuklu %32.3, kabuksuz % 46.8). Bu nedenle, karma yem üretiminde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Arıoğlu, 2007).

Tek yıllık bir bitki olan ayçiçeği, yetişeceği toprak tipi yönünden çok seçici olmamasına karşın organik maddece zengin, derin ve su tutma kapasitesi iyi topraklarda yüksek verim potansiyeline sahiptir. Derin ve kazık kök sistemine sahip olması nedeniyle, kuraklığa toleransı fazla; tuzluluğa karşı ise toleransı azdır. Tuzlu topraklarda yetiştirilen ayçiçeğinin tohumlarının yağ oranında azalmalar görülmüştür. Ayrıca ayçiçeği yetişecek toprakta %1-2 düzeyinde tuz konsantrasyonunun çimlenmeyi önemli oranlarda düşürdüğü belirlenmiştir. Ayçiçeği, pH'ı 6,20 ile 7,20 arasında olan topraklarda en iyi yetişir. Ayçiçeği, yüksek ve düşük sıcaklıklara gelişme dönemine bağlı olarak oldukça toleranslıdır. Tohumlarının en iyi çimlenebilmesi için 8 -10°C'lik toprak sıcaklığı gerekir. Ayçiçeği bitkisi fideleri kotiledon devresinde -4 ^{o}C sıcaklığa dayanabilir. Ayçiçeği için en iyi yetişme sıcaklıkları 21°C ile 24°C arasıdır (Arıoğlu, 2007).

2.2. BAKIR STRESİ

Bakır, çeşitli kaya ve minerallerde bol bulunan esansiyel mikro elementlerden biridir. Hem prokaryot hem de ökaryotlardaki metabolik süreçlerin geniş bir yelpazesi için gereklidir (Bowen, 1985). Oksijen taşıyıcıları (hemosiyanin) ya da redoks katalizörleri (sitokrom oksidaz, nitrat redüktaz) gibi fonksiyonları olan, bilenen en az 30 tane bakır içeren enzim vardır (Weser, 1979). Bakır; Cu^{o}, Cu^{+1} ve Cu^{+2} değerlikli üç oksidasyon durumu ile bir geçiş metalidir. Ayrıca 5g/cm^{3}'den daha ağır bir yoğunluğa sahip olması nedeniyle ağır metal olarak sınıflandırılmıştır (Forstner ve Wittmann, 1979).

Toksik miktardaki bakırın, dikotil fidelerde kısa radikulaya, koyu kahverengi-siyah renklenmeye (nekroz), küt uçlara ve mantar saldırılarına karşı bir eğilime sebep olduğu görülmüştür (Patterson ve Olson, 1983). Kök kalınlaşmasını arttırıcı etkisi çam (*Pinus* sp.) fidelerinde görülmüştür (Arduini ve diğ., 1995). *Betula papyrifera* (Kağıt huşu) ve *Lonicera tatarica* fidelerinde ise aşırı bakır konsantrasyonunda saçak köklerin gelişiminin durduğu bildirilmiştir (Patterson ve Olson, 1983). Diğer taraftan, aşırı bakır varlığında demir alınımının azaldığı da belirlenmiştir (Lexmond ve Van der Vorm, 1981). Bakır toksisitesinin yaşandığı bitkinin genç yaprakları üzerindeki klorotik semptomların demir eksikliğiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Luo ve Rimmer, 1995).

Ayrıca, aşırı bakır bulunan ortamda büyütülen *Banksia ericifolia, Casuarina distyla* ve *Eucalyptus eximia* (Okaliptüs)'da klorozis görülmüştür (Mitchell ve diğ., 1988). Kök büyümesini, kuru ağırlığı ve çözünebilir protein mikarını azalttığını da belirten çalışmalar vardır (Lequeux ve diğ., 2010; Körpe ve Aras, 2011; Thounaojam ve diğ., 2012). Ağır metal stresinin reaktif oksijen türlerinin oluşumuna, iyonik taşınımın dengesinin bozulmasına ve protein yıkımına sebep olduğu yapılan farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Aravind ve diğ., 2009; Ann ve diğ., 2011; Gangwar ve diğ., 2011).

Bakır, biyolojik organizmalar için temel olan bir elementtir. Fotosentez, elektron transport zinciri, solunum ve hormon sinyalizasyonu gibi birçok süreçte görev alan proteinlerde kofaktör olarak işlev görür (Bhakuni ve diğ., 2009; Andre ve diğ., 2010). Bakır, düşük konsantrasyonda farklı biyolojik süreçlerde rol alırken ortamda fazla bakır konsantrasyonu bulunması reaktif oksijen türlerinin ('Reactive Oxygen Species'- ROS) oluşmasına sebep olur (Andre ve diğ., 2010).

Hücrede bakır dengesinin sağlanması, bakır toksisitesinin engellenmesi için hayati önem taşır. Genel olarak, bitkilerde sitozol içine bakır alınması COPT olarak adlandırılan plazma membran taşıyıcılarında oluşan bir aile tarafından gerçekleştirilir. Bakır transport ailesi üyelerinden en az altı tanesi (AtCOPT1- AtCOPT6), *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* (pirinç) bitkilerinde yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır (Yuan ve diğ., 2011). Hücre içinde sitozolik bakırın, özel bölgelere dağılımı, bakır şaperonları ve çeşitli bakır-bağlayan proteinlerin de yer aldığı birçok faktörle sağlanır (Beauclair ve diğ., 2010). Bakırın hücre içine alınımını düzenleyen taşıyıcı sistemlerin aktivitesine ek olarak hücresel antioksidan sistemleri ve glisinbetain, prolin, poliamin gibi farklı hücresel elemanlarla da bakır sitotoksisitesi azaltılır (Andre ve diğ., 2010).

2.2.1. Stresin Proteinler Üzerine Etkisi

Bitkiler üzerindeki ağır metallerin en önemli etkilerinden biri, protein sentezine ket vurarak protein miktarını azaltmalarıdır. Kurşun, çinko ve kadmiyumun arpada (Stiborova ve diğ., 1986a), kobalt, krom ve bakırın karnabahar fidelerinde (Chatterjee ve Chatterjee, 2000), bakır ve kurşunun mısırda (Stiborova ve diğ., 1986b); kurşun ve kadmiyumun mercimekte (Mohan ve Hosetti, 1997) protein miktarını azalttığı bildirilmiştir.

2.2.2. Stresin İyonlar Üzerine Etkisi

Bakır uygulaması yapılmış mısır bitkisinin kök ve gövdesinde önemli derecede azot, fosfor ve potasyum miktarının azaldığı bulunmuştur (Ait-Ali ve diğ., 2002). Kadmiyum uygulaması altında buğday yapraklarının (*Triticum aestivum* L.) toprak üstü kısımlarında demir, magnezyum, kalsiyum ve potasyum miktarlarında azalma görülmüştür (Ouzounidou ve diğ., 1997). İyonların diğer stres koşullarından da etkilendikleri birçok çalışmada bildirilmiştir. Örneğin, tuz stresi altındayken bitkilerin, sitozolünde düşük konsantrasyonda Na^+ ve yüksek miktarda da K^+ bulunduğu bilinmektedir (Zhu, 2003). Tuz stresi uygulanan şeker pancarının bazı kültür varyetelerinde yapraklarda K^+ konsantrasyonunda azalış, Na^+ ve Cl^- konsantrasyonlarında ise yüksek derecede artış gözlenmiştir (Ghoulam ve diğ., 2002). Kuraklık stresi altında yetiştirilmiş olan kuraklığa dayanıklı bakla (*Vicia faba* L.) kültür varyetelerinin yapraklarının apoplastik kısımlarında, kontrol bitkilerine göre daha düşük konsantrasyonlarda Na^+, K^+ ve Ca^{+2} olduğu gösterilmiştir (El-Tayeb ve Ahmed, 2007). Su stresine bırakılmış *Sesuvium portulacastrum* (deniz semizotu)'da Na^+, K^+ ve Cl^- konsantrasyonlarında artış olduğu belirlenmiştir (Slama ve diğ., 2006). Benzer şekilde, kuraklığa maruz bırakılan asma bitkisinde Cl^-, Na^+, Mg^{+2} ve K^+ miktarlarında önemli ölçüde artış olduğu kaydedilmiştir (Patakas ve diğ., 2002).

2.2.3. Stresin Oksidatif Etkisi

Bitkilerde oksidatif etki, serbest radikallerin özellikle de reaktif oksijen türlerinin oluşumunu içerir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup oldukça reaktiftirler. Her türden kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir.

Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron varlığı serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Bununla birlikte, toprakta ağır metal varlığı ve çevredeki diğer mevcut stres koşulları sonucu doğrudan veya dolaylı olarak bitkide fotosentez elektron alıcısı $NADP^+$ kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP yerine oksijeni indirger ve PSI elektronlarının oksijene transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$) üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi ve diğ., 2000). Süperoksit molekülleri tek başına fazla reaktif olmayıp H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ radikallerini oluşturmak suretiyle etkili olur. Süperoksit ve hidrojen peroksitin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırarak oksitatif hasarı daha da arttırabilir (Fenton reaksiyonu) (Smirnoff, 1993).

2.3. STRESE KARŞI TOLERANS

Tüm bitkiler belirli derecelerde stres hasarlarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğindedir. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye adapte olabilme veya tam olarak uyabilme özelliğine sahiptirler.

Bitkiler ağır metal stresini bazı enzimleri sentezleyerek, vakuol içerisinde biriktirerek ya da şelatlanma oluşturarak ortadan kaldırma yoluna giderler. Toksik etkili ağır metallere dayanıklı olan bir bitki, ya hücreye giren ağır metalleri derhal detoksifiye etmeli ya da hücreye alınımını sınırlamalıdır. Ağır metaller hücre içinde alındıklarında detoksifiye edilmeleri gerekir. Bu da metale bağlı olan şelatlanma, alınımın sınırlanması ve çöktürme şeklinde olur. Örneğin, çinkonun organik asitlerle şelatlanıp vakuolde biriktirildiği tespit edilmiştir (Brooks ve diğ., 1981). Kurşun detoksifikasyonu için ise *Brassica juncea* (Hint hardalı)'nın köklerinde olduğu gibi fitoşelatinlerin üretildiği belirlenmiştir (Salt ve diğ., 1995).

2.4. ANTİOKSİDAN SİSTEM

Antioksidan terimi, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldıran bileşikler için kullanılmaktadır. Bitki dokuları, stres koşullarında hücreleri korumak için, bazı enzimleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, redüktaz, peroksidazlar) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanları (glutatyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller vb.) kullanırlar.

2.4.1. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), doğada çok yaygın dağılım göstermektedir. Bu enzim, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır. Katalaz, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlığa sahip enzimdir. Aynı zamanda katalaz, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterilebilir. Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend ve diğ., 1992; Streb ve diğ., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fridovich, 1986). Ayrıca H_2O_2'ye olan zayıf ilgisi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer ve diğ., 1997). Katalazın büyük bir kısmı, peroksizomlarda çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Katalazın bitki dokusunda H_2O_2'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Bouazizi ve diğ., 2007a/b; Kumar ve diğ., 2007; Pourakbar ve diğ., 2007; Tanyolaç ve diğ., 2007).

Antioksidan enzimlerin yanı sıra bitki hormonlarının da stres toleransında önemli roller oynadıkları yapılan birçok çalışmada belirlenmiştir (Peleg ve Blunwald, 2010; Umezawa ve diğ., 2010; Hadiarto ve Tran, 2011; Nishiyama ve diğ., 2011). Bitki hormonları arasında brassinosteroidler, steroidal laktonlardan oluşan bir gruptur. Hücre uzaması, morfogenez, doku farklılaşması ve üreme gibi gelişim ve fizyolojik süreçlerde rol oynar (Clouse, 2011; Gudesblat ve Russinova, 2011).

Brassinosterodler aynı zamanda, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere karşı tolerans kazanmasını sağlar (Choudhary ve diğ., 2010, 2011; Clouse, 2011; Gudesblat ve Russinova, 2011). Moleküler ve sinyal iletimi ile ilgili yapılan çalışmalarda, BR hormonu ile oksin, jasmonat, absisik asit ve etilen etkileşiminin stres toleransında önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Divi ve diğ., 2010). Epibrassinolide (aktif BR), ağır metal kirliliğinin de dahil olduğu birçok abiyotik streste, streslere karşı tolerans kazanmasında yaygın olarak kullanılan bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Bajguz, 2010; 2011; Poonam ve diğ., 2014).

2.5. BRASSİNOSTEROİDLER (BR)

Grove ve arkadaşları (1979) tarafından yapılan çalışmada, kolza bitkisi (*Brassica napus* L.) polenlerinden elde edilen organik çözeltinin, gelişimi teşvik edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş ve kolza polenindeki tanımlanmamış aktif bileşikler brassinolid (BL) olarak isimlendirilmiştir. Brassinolidin, özellikle gelişimi uyarıcı etkisi fasulyedeki ikinci internodyum deneyi dahil olmak üzere bazı fizyolojik testlerle gösterilmiştir. Grove ve arkadaşları (1979) brassinolidin gelişim ve farklılaşmadaki gözle görülen etkilerinin düşük konsantrasyonlarda olmasından yola çıkarak, yeni bir bitki hormonu grubu olduğunu öne sürmüşlerdir. Pek çok bitkide bulunan BL analogları, Brassinosteroid (BR) olarak isimlendirilmiştir. BR'nin endojen büyüme düzenleyicisi olup olmadığını belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Model bir bitki olan *A. thaliana*'da yapılan çalışmalarda, BR-mutant bitkilerde cücelik gözlenmiş ve bu durum eksojen olarak BR uygulaması ile düzeltilebilmiştir (Altmann, 1999).

Tohumlu bitkilerde, BR'nin bulunma oranı birbirinden farklıdır. Kastasteron ("Castasterone" - CS) en yaygın bulunan Brassinosteroid çeşididir (53 türde), daha sonar Brassinolid (BL) (37 tür) gelir (Kutschera ve Wang, 2012). Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) fidelerinde kuru ağırlıkta 10 ng/g konsantrasyonda CS bulunurken, BL seviyesi sıfıra yakındır. Aynı bitkinin polenlerinde ise 4 farklı BR (BL, CS, dolikosteron – "dolichosterone" ve norkastasteron – "norcastasteron") tanımlanmıştır (Kurepin ve diğ., 2012). CS ve BL, C3 tip fotosentez yapan *Chlorella vulgaris* organizması ve kuraklığa toleranslı C4 bitkisi olan mısır (*Zea mays* L.) organizmalarında da bulunmuştur (Bajguz, 2011; Hayat ve Ahmad, 2011).

2.5.1. Brassinosteroid Hormonunun Yapısı

BR, 5 α-kolestan iskeletine sahip çeşitli bitki türlerinden izole edilmiş bir polihidroksi lakton grubudur. X-ray kristalografisi analizleri BR'nin steroidal bir lakton olduğunu ortaya koymuştur. Bu bileşiğe brassinolid adı verilmiştir (Taiz ve Zeiger, 2006).

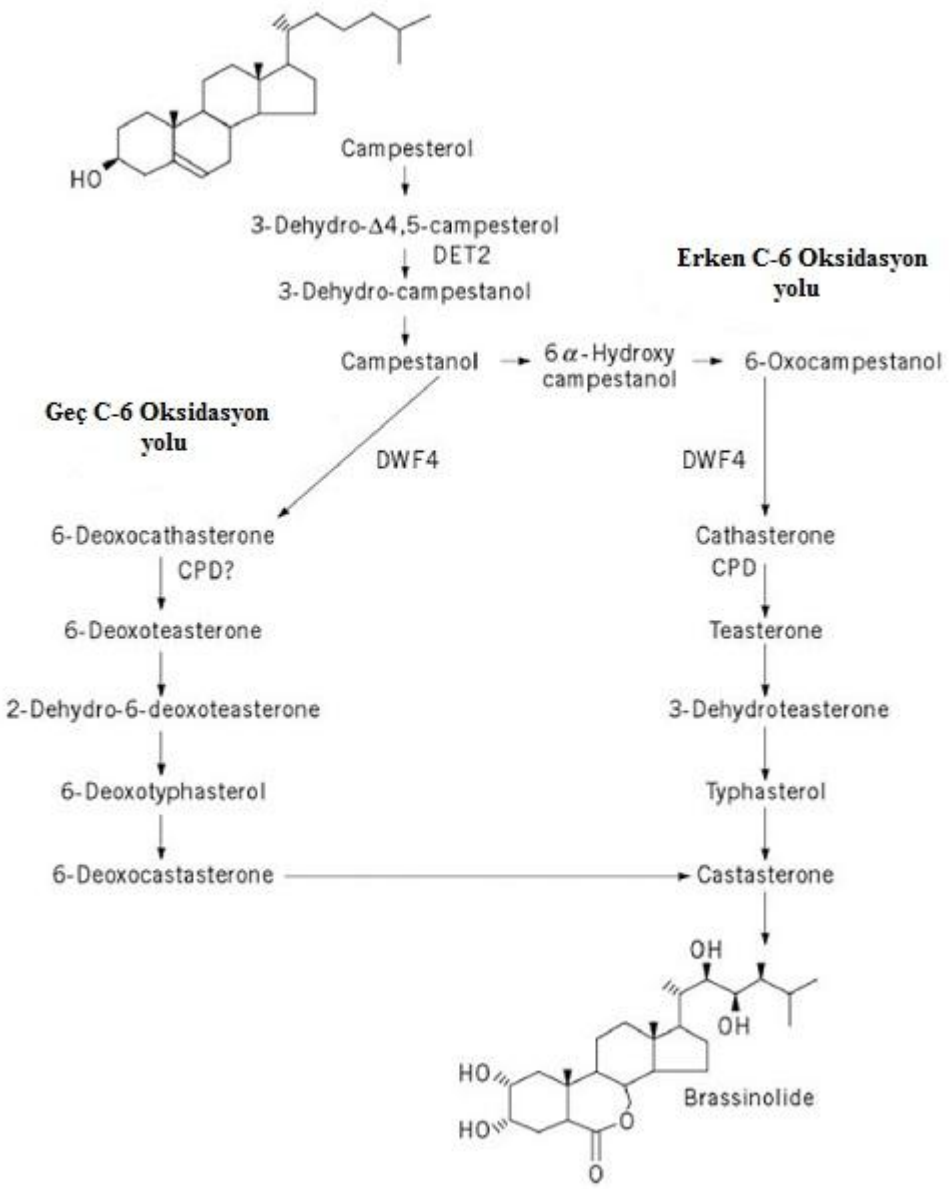
BL ve diğer tüm brassinosteroidler kolestandan türevlenirler. BL, (22R, 23R, 24S) - 2α, 3α, 22, 23–tetrahidroksi–24–metal–B–homo–7–oksa-5α–kolestan–6-on olarak isimlendirilen polihidroksile olmuş bir 5α-kolestan türevidir. Bu nedenle, bitkiler androjenler, östrojenler, vertebrataların kortikosteroidleri ve böcekler ile krustaselerin ekdisteroidleri gibi kolesterolden türevlenen hayvan steroid hormonlarıyla yapısal benzerlik gösteren, büyümeyi uyarıcı bir steroide sahiptirler (Clouse, 2002; Ashraf ve diğ., 2010; Hayat ve Ahmad, 2011). Brassinosteroidler, A'dan D'ye kadar giden 4 halka ve 17. karbonda bir karbon yan zinciri taşıyan steroid yapıya sahiptirler (Müssig ve Altmann, 1999).

2.5.2. Brassinosteroid Metabolizması

Brassinolid, doğal olarak bulunan BR'ler arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğu için biyosentez yolunu aydınlatmak için çalışmalar yapılmıştır (Suzuki ve diğ., 1995; Srivastava, 2002). BL, biyosentezinin başlangıç noktası kampesteroldür (Şekil 2.1). İlk önemli basamak, kampesterolün 5,6 çift bağının redüksiyonuyla kampestanolün (CN) oluşmasıdır. Daha sonra kampestanolden, BL'nin bir adım önceki öncülü olan kastasterona (CS) giden 2 paralel biyosentez yolu vardır.

Bu biyosentez yolları erken ve geç C6-oksidasyon yolu olarak adlandırılmaktadır (Choi ve diğ., 1997; Bishop ve Yokota, 2001; Srivastava, 2002). Bu iki değişimli yol yan zincirdeki hidroksilasyondan önce ya da sonra C6 oksidasyonunun meydana gelip gelmemesine bağlı olarak farklılık göstemektedir (Noguchi ve diğ., 2000). Erken C-6 oksidasyon yolunda kampestanol, 6-oksokampestanole okside olur ve daha sonra bu yol yan zincirdeki 22. ve 23. karbonların hidroksilasyonu ile devam eder. Bunu, CS'yi vermek üzere 3. karbondaki hidroksilin epimarizasyonu ve 2. karbona bir hidroksilin ilave olması takip eder. Diğer bir yol olan geç C-6 oksidasyon yolunda da kampestanol, CS'yi vermek üzere benzer hidroksilasyon ve epimerizasyonlar geçirerek 6-deoksokastasteronu verir.

Son basamakta ise kastasteron Baeyer-Villiger tipi oksidasyon aracılığıyla BL'e dönüştürülür (Yokota, 1997; Sakurai ve diğ., 1999; Srivastava, 2002).



Şekil 2.1: Brassinolidin biyosentezi (Bishop ve Koncz, 2002). BL'nin erken ve geç C-6 oksidasyon adımlarını kapsayan BR biyosentezinin basitleştirilmiş şeması.

2.5.3. Brassinosteroid Hormonunun Etkileri

Bitki büyüme ve gelişimindeki çeşitli metabolik yollarda rol oynayan BR'nin bitki üzerindeki etkileri genel olarak fizyolojik etkiler, sitolojik etkiler ve biyokimyasal etkiler olarak gruplandırılabilir. Tüm bu etkilerin bir araya gelmesi, özellikle abiyotik strese karşı bitki dayanıklılığını arttırır. BR uygulamasının, tohum çimlenmesini arttırdığı (Ashraf ve diğ., 2010; Yang ve diğ., 2011), hücre duvarının esnekliğini arttırarak hücre uzamasına yol açtığı (Sun ve diğ., 2010) ve kök uzamasını uyardığı (Kartal ve diğ., 2009; Yang ve diğ., 2011) anlaşılmıştır. Sitogenetik olarak mitotik indeks ve kromozom anomalisi üzerinde yapılan çalışmalarda BR uygulamasının her iki parametreyi de arttırdığı rapor edilmiştir (Kartal ve diğ. 2009). BR uygulamasının ayrıca nükleik asit ve protein miktarını da arttırdığı belirlenmiştir (Anuradha ve Rao, 2001; Arora ve diğ., 2010).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

3.1.1. Uygulanacak Bakır ve Brassinosteroid Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, kullanılan ayçiçeği tohumları (Palancı-9, Tarsan 1018, TTAE-12-2 ve TTAE-12-3) Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi'nden sayın Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT'in laboratuvarından; TR003 ise Trakya Tarım Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlandı (Şekil 3.1).

Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan ayçiçeği tohumları. Soldan sağa sırasıyla Palancı-9, TTAE-12-3, TTAE-12-2, Tarsan 1018, TR003.

Ayçiçeği tohumlarından hangisi ile deney yapılacağına, hangi konsantrasyonlarda bakır kullanılacağına ve hangi süreler arasında çalışılacağına karar vermek için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, her varyeteye ait 3 adet tohum, steril petri kaplarına steril kurutma kağıtları arasına yerleştirildi. Kontrol grubunda çimlendirme için 6 ml distile su; deney gruplarında ise 6 ml $CuSO_4$ çözeltisi kullanıldı. Uygun bakır konsantrasyonunu belirlemek amacı ile 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 350 µM, 400 µM değişen konsantrasyona sahip $CuSO_4$ çözeltisi denendi. Alüminyum folyoya sarılı petriler bitki büyüme kabinine kaldırıldı. 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki primer kök uzunlukları ölçüldü.

Uygulanacak brassinosteroid konsantrasyonunu tespit etmek içinse 2 µM, 2,5 µM, 3 µM, 3,5 µM ve 4 µM HBR; belirlenen optimum konsantrasyondaki $CuSO_4$ çözeltisi ile birlikte petrilere eklendi. Petrilerdeki tohumların 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki primer kök uzunlukları ölçüldü ve fotoğrafları çekildi. Elde edilen veriler karşılaştırılarak tez çalışmasına devam edilecek olan uygun bakır ve hormon konsantrasyonu ile çalışılacak saatler belirlendi.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda tez çalışması için kullanılacak bakır konsantrasyonlarının 30 µM ve 40 µM, HBR konsantrasyonunun ise 2 µM olmasına karar verildi.

3.2. FİZYOLOJİK ÇALIŞMALAR

3.2.1. Ayçiçeği Tohumlarından Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Fizyolojik çalışmalar, belirgin farklılık gösterdiği için 72 saat süresince çimlendirilen tohumlar üzerinden yürütüldü. Bitki büyütme kabininde 72 saat, karanlıkta çimlendirilen TR003 varyetesinden; total protein miktarı ve CAT aktivite tayininde kullanılmak üzere ekstre hazırlandı. Örneklerin çözünebilir protein içeriğinin belirlenmesinde Bradford (1976) yöntemi değiştirilerek kullanıldı. Ekstrenin hazırlanmasında aşağıdaki metot izlendi.

1. Kontrol grubu ve 5 deney grubuna ait tohumların primer kökleri kesilerek tartıldı.
2. Her bir deney grubu, steril edilmiş ve -20°C'de bekletilmiş porselen havanlarda sıvı azot içinde ezildi.
3. Tartılan tohum ağırlığının 5 katı kadar protein parçalama tamponu (Tablo 3.1) eklenerek havan içindeki materyal sıvı hale gelene kadar ezildi.
4. Sıvı hale gelen örnekler ependorflara alınarak 14000 rpm +4 ^{o}C'de 20 dakika santrifüjlendi.
5. Santrifüj sonrasında yeni tüplere alınan üst sıvı, protein miktar ve enzim aktivite tayini deneylerinde kullanıldı.

Tablo 3.1: Parçalama tamponu içeriği.

Bileşenin adı	Konsantrasyon
0.2 M Fosfat tamponu	50 mM
0.5 M EDTA	0.1 mM
%1 Polivinilpirolidon	4%

Standart olarak 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarında 4 adet BSA (bovin serum albumin) çözeltisi kullanıldı. Her bir örnek ve BSA standartlarından 10 µl alınarak, 500 µl 1X Bradford çözeltisi ile karıştırıldı (Tablo 3.2). Elde edilen karışımdan 200 µl alınarak mikroplate kuyucuklarına yüklendi ve 14 dakika karanlıkta bekletildi. Örneklerin 595 nm'deki absorbansları ölçüldü.

Tablo 3.2: 5X Bradford belirteci içeriği.

Bileşenin adı	Miktarı
Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
Metanol (100%)	47 ml
Fosforik asit	100 ml
dH_2O	200 ml'ye tamamlanır

3.2.2. SDS-PAGE

SDS-PAGE analizi için ayırma ve yükleme jeli olmak üzere iki farklı jel kullanıldı. 10 ml %15'lik ayırma jeli ve 5 ml %5'lik yükleme jeli Tablo 3.3'de verilen çözeltiler kullanılarak elde edildi.

Tablo 3.3: SDS-PAGE'de kullanılan çözeltilerin içeriği.

Bileşenin adı	İçeriği
%15 Ayırma jeli	2,3 ml dH_2O, 5 ml Akrilamid/ Bis akrilamid (%30), 2,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 Amonyum Persülfat (APS),4µl TEMED
% 5 Yükleme jeli	3.4 ml dH_2O, 830 µl Akrilamid/Bis akrilamid (%30), 630 µl 1 M Tris (pH 6.8), 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 Amonyum Persülfat (APS), 5 µl TEMED
5X tank tamponu	15 g Tris, 72 g Glisin ve 5 g SDS, 1 lt suda çözdürüldü
Yıkama çözeltisi	125 ml metanol, 175 ml asetik asit (glasiyel), 2200 ml distile su
4X yükleme tampanu	1 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 1,6 ml %10 SDS, 0,80 ml gliserol, 0,4 ml betamerkapto etanol, 0,2 ml bromofenol mavisi, 4 ml dH_2O

SDS-PAGE analizinde şu basamaklar takip edildi;

1. Ayırma jeli hazırlandı ve kasete döküldü.
2. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için yaklaşık 0.3 ml su ile doyurulmuş n-butanol çözeltisi jel kasetinin iki kenarından döküldü.
3. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst düzeydeki butanol döküldü ve jel yüzeyi saf su ile birkaç kez yıkandı.
4. Yükleme jeli hazırlandı ve kasete döküldükten sonra tarak yerleştirildi.
5. Jelin donması için biraz beklendi. Donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Cepler önce saf su ile sonra 1X tank tamponu (Tablo 3.3) ile yıkandı.
6. Protein ekstratlarından 5 µl alınarak, 1 µl 4X yükleme tamponu ile iyice karıştırıldı ve 2 dakika 95 °C'de kaynatıldı. Tank tamponu (1X) içinde bekleyen jele protein markırı (AppliChem, A8889) ve örnekler yüklendi
7. Örnekler 200 V'de 45 dakika yürütüldü.
8. Yürüme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel, cam plaklar arasından çıkartılarak kapaklı plastik bir kaba alındı ve boyama işlemine geçildi.
9. Boyama yöntemi olarak Coomassie Boyama yöntemi uygulandı. Boyama çözeltisi; 1 g Coomassie Brillant Blue, 500 ml Metanol, 100 ml Glasiyel asetik asit distile su ile 1 litreye tamamlandı. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilerek karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

10. Jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde boyama çözeltisi dökülerek jel, bu şekilde bir gece boyunca 20 devir/dakika hızında çalkalanarak boyandı.
11. Gece boyunca boyanan jeldeki boyama çözeltisi dökülerek jel 1 saat boyunca yıkama çözeltisinde çalkalandı. 1 saat sonra yıkama çözeltisi (Tablo 3.3) dökülerek tekrar yıkama çözeltisi ilave edildi ve jel 1 saat daha yıkandı. Bu işlem jelin zeminindeki boya tamamen çıkana kadar bu şekilde devam ettirildi.

3.2.3. Katalaz Aktivite Tayini

Antioksidan savunma enzimlerinden biri olan katalazın aktivitesi, hidrojen peroksidin yıkımının, 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesi ile tayin edildi. 20 µl fosfat tamponu (20 mM) ve 6 mM H_2O_2 (Eklenecek H_2O_2 miktarı her seferinde, 25 mM H_2O_2, 240 nm'de 1,9 absorbansa sahiptir." esasına göre hesaplandı.) distile su ile son hacim 195 µl olacak şekilde tamamlanarak 30 °C'de 3 dakika inkübe edildi.

Deney gruplarına ait protein ekstratlarından 5 µl alınarak UV-mikroplatelere konuldu ve üzerine hazırlanan karışımdan 195 µl eklenerek hızla kinetik ölçüm alındı. Katalaz aktivitesi 240 nm'de gerçekleşen absorbanstaki düşüşün gözlemlenmesiyle tayin edildiği için 10 saniye aralıklarla 12 kez ölçüm alındı.

3.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

3.3.1. Total RNA İzolasyonu

72 saat boyunca çimlendirilen, 6 deney grubuna ait ayçiçeği köklerinden RNA izolasyonu, TRI Reagent® (Sigma, T9424) kullanılarak gerçekleştirildi.

İzolasyon esnasında kullanılacak havanlar, %0.1'lik (v/v) DEPC solüsyonu içinde 37°C'de bir gece bekletildikten sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı ve 250°C'deki pastör fırınında 5 saat bekletildi. Deneyde kullanılacak plastik malzemelerin nükleaz içermemesine dikkat edildi. RNA izolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir:

1. 72 saat boyunca çimlendirilen tohum kökleri steril porselen havanda sıvı azot içerisinde parçalandı.

   Toz haline getirilen dokuların üzerine her bir örnek için TRI Reagent® (50 mg doku için 1000 µl) eklendi. Havandaki örnekler tüpe alındı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
2. Örneklerin üzerine, kullanılan her 1 mL TRI Reagent® için 0.2 mL kloroform eklendi ve örnekler karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
3. 12.000 x g'de 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüjlenen (AllegraTM X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) örnekler, tüpün içinde 3 ayrı faza ayrıldı. Renksiz üst faz total RNA izolasyonu için kullanıldı.
4. RNA içeren üst faz, steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
5. Tüpler 12.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Pellet 1 ml %75'lik etanolde yıkandı ve tüpler 7.500 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant döküldü ve pellet oda sıcaklığında 10 dakika kurutuldu.
8. Pellet, 50 µl RNaz içermeyen suda çözdürüldü ve 60 ^{o}C'de 10 dakika inkübe edildi.
9. İzole edilen RNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.
10. RNA örneklerinin nanodropta absorbans ölçülmü yapıldı ve konsantrasyon "RNA konsantrasyonu (µg/ml)= [OD (Optik yoğunluk)$_{260}$ x sulandırım oranı x 40 (µg/ml)]" formülünden yararlanılarak hesaplandı.

3.3.2. RNA JEL ELEKTROFOREZİ

İzole edilen RNA'ların kalitesi, %1'lik agaroz jelde kontrol edildi (Tablo 3.4). %1'lik (w/v) agaroz jel hazırlamak için; 40 ml 1X TAE tamponuna (10X TAE'nin sulandırmasıyla hazırlandı), 0.4 gram agaroz (Biobasic Agarose A) eklenip mikrodalga fırında eritildi. Ilık hale gelen agaroz jele 4 µl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklendi ve yatay elektroforez kasetine dökülüp, uygun tarak yerleştirildikten sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşmaya bırakıldı. Her RNA örneğinden 5 µl alınıp ve 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi.

Elektroforezde markır olarak GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311) kullanıldı. Jel 70 voltta (10 V/cm) 1 saat yürütüldü ve UV tablasında görüntülendi.

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kulllanılan bileşenler.

Adı	İçeriği
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	400 mM Tris, %1.2 glasiyel asetik asit (v/v), 10 mM EDTA (pH 8.0)
1X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	100 ml 10X TAE, 900 ml dH_2O
6X yükleme tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), %0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilen siyanol , %60 gliserol, 60 mM EDTA
Etidyum bromür solüsyonu	%1 (w/v)

3.3.3. DNaz I Uygulaması ve cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi yapılmadan önce, izole edilen total RNA'nın genomik DNA'dan tamamen arındırılması amacı ile DNaz I (RNase-free, AM2224, Ambion) uygulaması yapıldı. Total RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü ve 200 µg/ml'den büyük olan konsantrasyonlar 10 µg/50 ml'ye dilüe edilerek kullanıldı.

Reaksiyon bileşenleri 0.5 µl'lik PCR tüplerinde, Tablo 3.5'te verilen oranlarda bir araya getirilip 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için tüplere 5.5 µl EDTA (50 mM) ilave edildi ve 75°C'de 5 dakika inkübe edilerek DNaz I enzimi inaktive edildi.

Tablo 3.5: DNaz I reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin adı	Miktarı (µl)
RNA örneği	43.9
10X reaksiyon tamponu	5
Dnaz I (2U)	1.1
Toplam	50

DNaz uygulanan RNA örneklerinin konsantrasyonları nanodropta ölçülerek her örnek için son konsantrasyon 200 ng olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentezi, "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" (05091284001, Roche) kullanılarak 200 µl'lik PCR tüplerinde gerçekleştirildi. Kit bileşenleri verilen miktarlarda (Tablo 3.6) PCR tüplerinde bir araya getirilerek 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Süre bitiminde örnekler buz üzerine alındı ve Tablo 3.7'de verilen bileşenler tüplere ilave edilerek 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tüplerin 85°C'de 5 dakika bekletilmesi ile reaksiyon sonlandırıldı.

Tablo 3.6: cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler.

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
RNA örneği	Değişken	20 ng/µl
Anchored-oligo$(dT)_{18}$ Primer (50 pmol/µl)	1	2.5 µM
dH_2O	Değişken	
Toplam	11.4	

Tablo 3.7: cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler.

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (5X)	4	1X
"Protector RNase" Inhibitörü (40 U/µl)	0.5	1U/µl
Deoksinükleotit karışımı (10 mM)	2	1 mM
DTT	1	5 mM
"Transcriptor High Fidelity" Revers Transkriptaz	1.1	10 U/µl
İlk aşama ve ikinci aşama toplam	20	

3.3.4. Revers Transkritaz PCR (RT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar, *CAT* genlerinin anlatım düzeylerindeki değişimi gözlemlemek amacı ile RT-PCR ile çoğaltıldı. Reaksiyon High Fidelity PCR Enzyme Mix ile gerçekleştirildi. 0.2 ml'lik PCR tüplerinde bir araya getirilen bileşenlerle reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 3.8). Reaksiyon koşulları Tablo 3.9'da verilmiştir. *CAT* genleri için kullanılan forward ve reverse primerler ise Tablo 3.10 verilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde ayrılarak değerlendirildi.

Tablo 3.8: RT-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (10X)	2	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	2	2.5 mM
10 mM dNTP	0.4	0.2 mM
Forward primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
Kalıp (25 ng/µl)	2	2 ng/µl
Enzim (5 U/µl)	0.2	0.05 U/µl
dH_2O (nükleaz içermeyen)	11.4	-
Toplam	20	

Tablo 3.9: RT-PCR döngüleri.

Basamak	Sıcaklık (^oC)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	
Bağlanma	61	30 sn.	30
Uzama	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

Bağlanma Sıcaklığı, CAT için 61^oC olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.10: RT-PCR'da kullanılan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve hedef büyüklükleri (Pena ve diğ., 2011; Fernandez-Ocana ve diğ., 2011).

No	PrimerAdı	Dizisi (5'→3')	Ta (^oC)	Hedef büyüklük (bç)
1	*CAT-F*	CTTCCCGCTTGAATGTGAAG	61	248
2	*CAT-R*	CCGATTACATAAACCCATCATC	61	248

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında ayçiçeğine (*Helianthus annuus* L.) ait tohumlar, 48 saat ve 72 saat boyunca dH_2O, bakır, HBR hormonu ve bakır + HBR hormonu uygulamaları altında çimlendirilerek elde edilen köklerin morfolojik, fizyolojik ve moleküler analizleri gerçekleştirildi. Çalışma, hem 48 saatlik hem de 72 saatlik analiz için kontrol (sadece dH_2O), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + HBR (30 µM bakır + 2 µM HBR, 40 µM bakır + 2 µM HBR) olmak üzere farklı deney grupları üzerinden yürütüldü. 48 saat ve 72 saat sonunda ayrı ayrı olmak üzere çimlenen ayçiçeği tohumlarının primer köklerin uzunlukları ölçüldü. Moleküler çalışmalarda da CAT enzimlerinin gen anlatım profilleri RT-PCR yapılarak analiz edildi.

4.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

4.1.1. Uygulanacak Bakır ve Brassinosteroid Konstrasyonlarının Belirlenmesi

Ayçiçeği tohumlarına uygulanacak bakır ve HBR konsantrasyonları ile çalışma süreleri optimizasyon çalışmaları sonunda belirlendi. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonlarını belirlemek için ayçiçeği tohumları; 96 saat boyunca 10-400 µM arasında değişen konsantrasyonlarda $CuSO_4$ varlığında petri kaplarında çimlendirildi. Bu süre boyunca, 24 saatlik aralıklarla her tohumun primer kök uzunlukları ölçülerek bakır stresinin ayçiçeği tohumları üzerine etkisi gözlendi. 200 µM üzerindeki konsantrasyonlarda kullanılan $CuSO_4$'ün, tohum gelişimini ya inhibe ettiği ya da geciktirdiği görüldü. Uygulanacak brassinosteroid konsantrasyonunu tespit etmek içinse 2 µM, 2,5 µM, 3 µM, 3,5 µM ve 4 µM HBR; belirlenen optimum konsantrasyondaki $CuSO_4$ çözeltisi ile birlikte petrilere eklendi. Optimizasyon çalışmaları sonunda TR003 varyetesinin 30 ve 40 µM bakır konsantrasyonunda ve 2 µM HBR ile 48 ve 72. saatlerde daha belirgin fark yarattığı gözlendi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Şekil 4.1: TR003 varyetesine ait 48 saatlik primer kök görüntüsü. Soldan sağa sırasıyla 1, kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

Şekil 4.2: TR003 varyetesine ait 72 saatlik primer kök görüntüsü. Soldan sağa sırasıyla 1, kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

4.2. MORFOLOJİK ÇALIŞMALAR

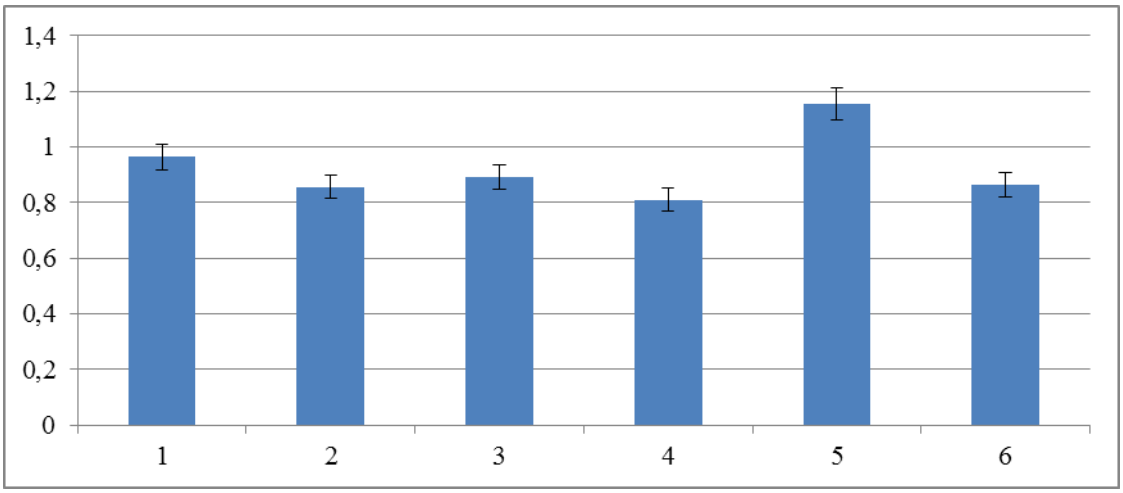
4.2.1. Bakır ve Brassinosteroid Uygulamasının Primer Kök Uzunluğuna Etkilerinin Belirlenmesi

Kontrol (sadece su), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + hormon (30 µM bakır + 2 µM HBR; 40 µM bakır + 2 µM HBR) uygulanması altında çimlendirilen ayçiçeği tohumlarının 48 saat ve 72 saat süre sonunda primer kök uzunlukları ölçüldü (Tablo 4.1). 6 deney grubuna ait her petri kabına 3 adet tohum yerleştirildi. 3 tekrarla toplamda 54 tohumun primer kökleri ölçüldü. Standart sapma değerleri Microsoft Excel'de hesaplandı. Deney üç kere tekrar edildi.

Tablo 4.1: Karanlıkta filtre kağıdı arasında 48 ve 72 saat boyunca çimlendirilen ayçiçeği primer kök uzunlukları. ± değeri standart sapmayı göstermektedir. $P < 0.05$.

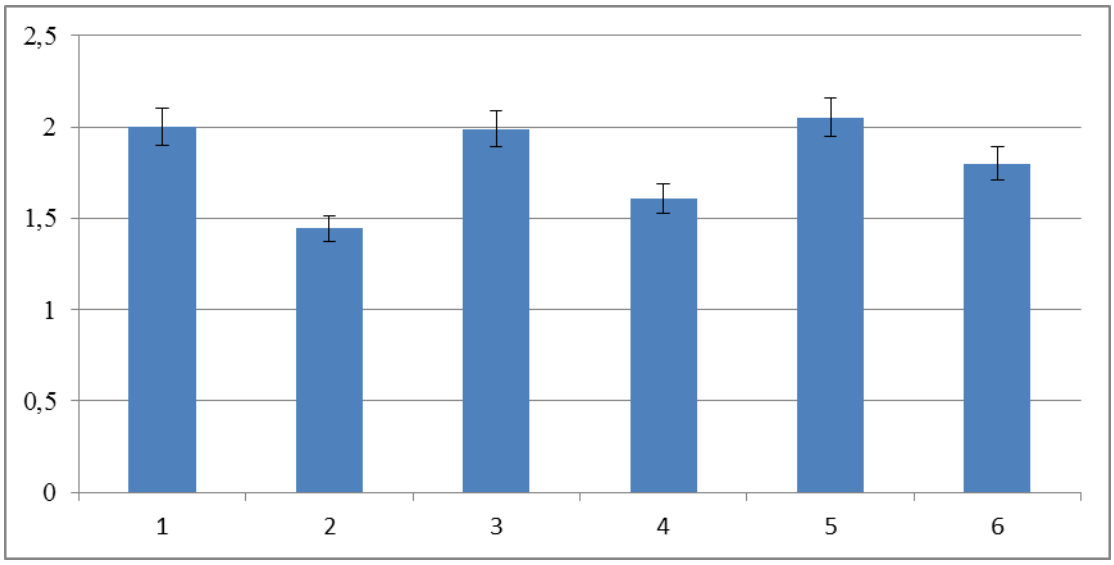
	Kontrol	**30 µM bakır**	**30 µM bakır + 2 µM HBR**	**40 µM bakır**	**40 µM bakır + 2 µM HBR**	**2 µM HBR**
Primer köklerin ortalama uzunlukları (cm) 48 saat	0.96± 0.14	0.85 ± 0.29	0.89 ± 0.03	0.81 ± 0.3	1.15 ± 0.33	0.86 ± 0.23
Primer köklerin ortalama uzunlukları (cm) 72 saat	2 ± 0.38	1.44± 0.28	2± 0.38	1.61± 0.47	2.1± 0.76	1.8± 0.41

48 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında, artan bakır uygulaması ile doğru orantılı olarak primer kök uzunluklarının (30 µM bakır için 0.85 ± 0.29 ve 40 µM bakır için 0.81 ± 0.3) azaldığı belirlendi. Buna karşın bakır stresindeki tohumlara HBR uygulaması ile kök uzunluklarının arttığı görüldü (30 µM bakır + 2 µM HBR için 0.89 ± 0.03 ve 40 µM bakır + 2 µM HBR için 1.15 ± 0.33). Sadece HBR uygulamasının (2 µM HBR) ise primer kök uzunluğunu kontrole göre azalttığı belirlendi (0.86 ± 0.23), (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: 48 saat boyunca çimlendirilen ayçiçeği primer kök uzunlukları.1, Kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

72 saat sonunda elde edilen veriler analiz edildiğinde, 48 saatten farklı olarak düşük bakır konsatrasyonunun köklerdeki olumsuz etkisini daha belirgin şekilde gösterdiği belirlendi (30 µM bakır için 1.44 ± 0.28; 40 µM bakır için 1.61 ± 0.47). Buna karşın HBR uygulamasnının 48 saatte olduğu gibi 72 saat sonunda da bakır stresinin etkilerini düzelttiği görüldü (30 µM bakır + 2 µM HBR için 2 ± 0.38 ve 40 µM bakır + 2 µM HBR için 2.1 ± 0.76). Sadece HBR uygulamasının (2 µM HBR) da kontrole yakın şekilde kök uzunluklarını etkilediği not edildi (1.8 ± 0.41), (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: 72 boyunca çimlendirilen ayçiçeği primer kök uzunlukları. 1, Kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

4.3. FİZYOLOJİK ÇALIŞMALAR

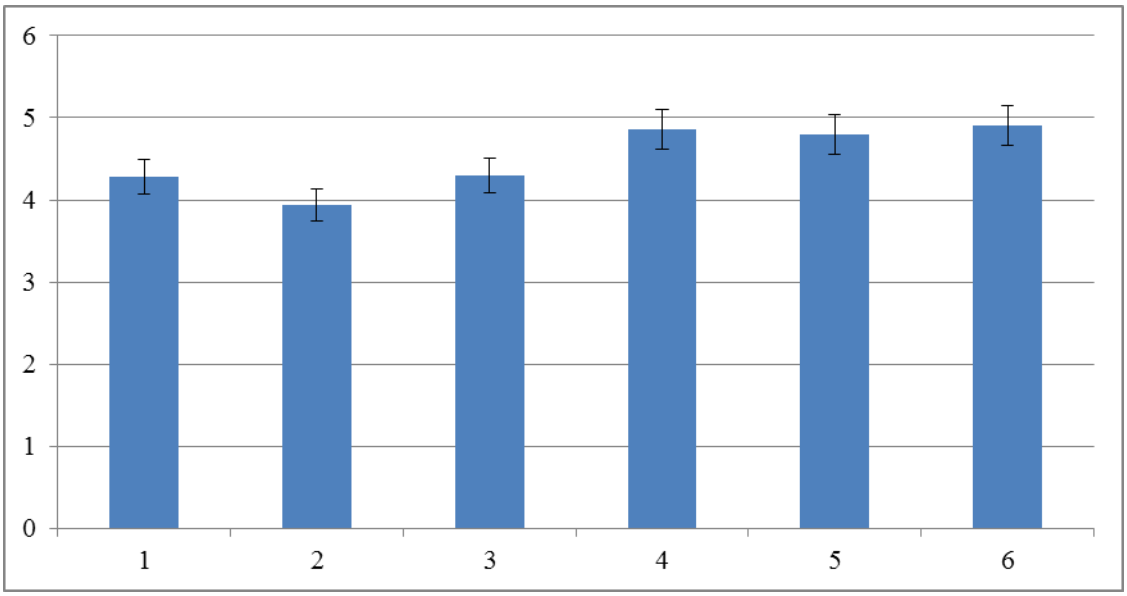
4.3.1. Bakır ve Brassinosteroid Uygulamasının Total Protein Miktarına Etkilerinin Belirlenmesi

Fizyolojik çalışmalar kapsamında, kontrol (sadece su), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + hormon (30 µM bakır + 2 µM HBR; 40 µM bakır + 2 µM HBR) uygulanması altında 72 saat süresince çimlendirilen ayçiçeği tohumlarından ayrı ayrı olmak üzere protein izolasyonu yapıldı ve protein miktarı belirlendi (Tablo 4.2). Protein izolasyonundan sonra örneklerin bant profilleri SDS-PAGE'de karşılaştırıldı. Ayrıca, katalaz enziminin aktivite tayini gerçekleştirildi. Morfolojik çalışmalarda 72 saat sonunda elde edilen kök uzunlukları çalışmaya daha uygun olduğu ve bu sürede elde edilen veriler analiz edildiğinde kök uzunlukları arasındaki fark daha belirgin olduğu için, fizyolojik çalışmalara 72 saat üzerinden devam edildi. Örneklerin protein miktarı belirlendi. Deney üç kez tekrar edildi.

Tablo 4.2: 72 saat sonrasında ölçülen protein miktarları.

	Kontrol	30 µM bakır	30 µM bakır + 2 µM HBR	40 µM bakır	40 µM bakır + 2 µM HBR	2 µM HBR
Protein miktarı (mg/ml) 72 saat	4.28± 3.85	3.94±3.44	4.3± 3.62	4.86± 5.3	4.79± 4.03	4.90± 4.29

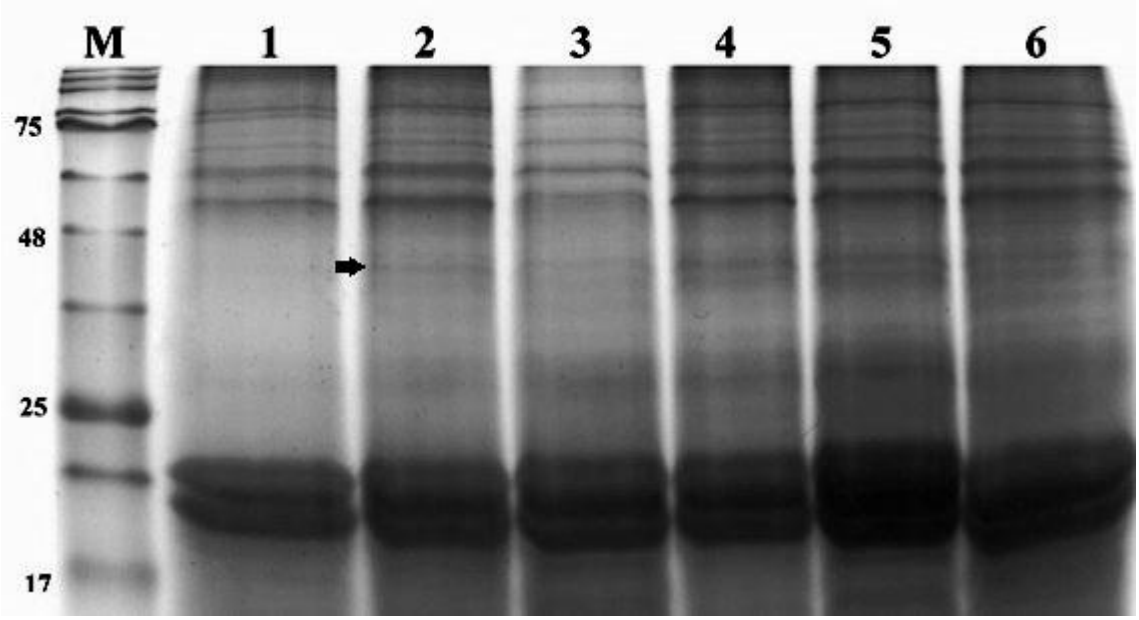
Kontrol ile karşılaştırıldığında (4.28 ± 3.85), 30 µM bakır uygulanmış köklerde protein miktarının azaldığı görüldü (3.94 ± 3.44). Buna karşın 40 µM bakır stresinde çimlendirilen köklerde ise arttığı belirlendi (4.86 ± 5.3). Morfolojik analizlerde 72 saat sonunda 40 µM bakır ugulanan örneklerde (1.61 ± 0.47) 30 µM bakır uygulananlara (1.44 ± 0.28) kıyasla kök uzunluklarının daha az azaldığı saptanmıştı. Bakır + HBR uygulanan örnekler, sadece bakır uygulanan ile karşılaştırıldığında; 30 µM bakır + 2 µM HBR uygulamasının 30 µM bakır uygulamasına kıyasla protein miktarını arttırdığı görülürken (30 µM bakır + 2 µM HBR için 4.3 ± 3.62; 30 µM bakır için 3.94 ± 3.44); 40 µM bakır + 2 µM HBR uygulamasının (4.79 ± 4.03) 40 µM bakır uygulamasına (4.86 ± 5.3) göre protein miktarını azalttığı gözlendi. Sadece HBR (2 µM HBR) uygulanan örneklerde de protein miktarının kontrole göre arttığı belirlendi (4.9 ± 4.29).



Şekil 4.5: 72 saatlik örneklerin protein miktarları. 1, Kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

4.3.2. SDS-PAGE Analizi

72 saat boyunca çimlendirilen köklerden protein izolasyonu yapıldıktan sonra örneklerdeki protein bant profillerini karşılaştırmak için örnekler SDS-PAGE'de incelendi. SDS-PAGE için hazırlanan %15'lik ayırma ve %5 yükleme jeline yüklenen örnekler, protein markırı ile yürütüldükten sonra görüntülenerek fotoğrafı çekildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6:72 saatlik örneklerin SDS-PAGE analizi. Soldan sağa sırasıyla M, markır; 1, kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR. Ok, polimorfik bandı göstermektedir.

72 saat sonunda elde edilen örneklerin SDS-PAGE analizinde; örneklerin protein bant yoğunluğunun (özellikle kontrolde) 25-48 kDa arasında azaldığı görüldü. Bant profilleri karşılaştırıldığında, tüm gruplarda bant profillerinin aynı olduğu belirlendi.

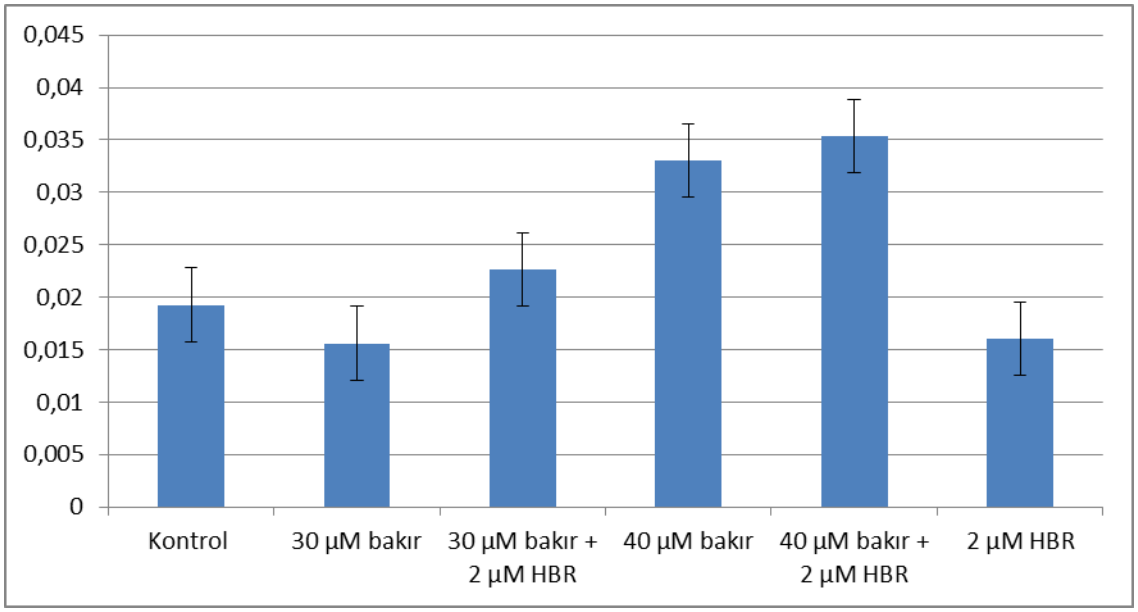
4.3.3. CAT Aktivitesinin Belirlenmesi

Deney gruplarının protein miktarı değerlerinden yararlanarak örneklerin CAT enzim aktivitesi hesaplandı.CAT aktivitesinin belirlenmesi için yapılan deney 3 kere tekrar edildi (Tablo 4.3). Değerler, ortalama ± standat sapma olarak belirtildi. Absorbanstaki artış CAT enzimi aktivitesindeki artışı işaret etmektedir.

Tablo 4.3: 72 saat sonrasında ölçülen CAT enzim aktivitesi.

	Kontrol	**30 µM bakır**	**30 µM bakır + 2 µM HBR**	**40 µM bakır**	**40 µM bakır + 2 µM HBR**	**2 µM HBR**
Katalaz aktivitesi ΔA_{240}/dak/mg protein (72 saat)	0.019± 0.012	0.015± 0.016	0.023± 0.008	0.033± 0.034	0.035± 0.035	0.016± 0.005

CAT enzim aktivitesinin sonuçları değerlendirildiğinde, kontrolle karşılaştırıldığında (0.019± 0.012), düşük konsantrasyondaki bakır uygulamasının ve yalnızca HBR uygulamasının ise belirgin şekilde aktiviteyi azalttığı görüldü (30 µM bakır için 0.015 ± 0.016; yalnızca 2 µM HBR için 0.016 ± 0.005) Buna karşılık yüksek konsantrasyondaki bakır ve bakır + HBR uygulamalarının enzim aktivitesini arttırdığı gözlendi.(30 µM bakır + 2 µM HBR için 0.023± 0.008; 40 µM bakır için 0.033± 0.034; 40 µM bakır + 2 µM HBR için 0.035± 0.035) (Şekil 4.7).



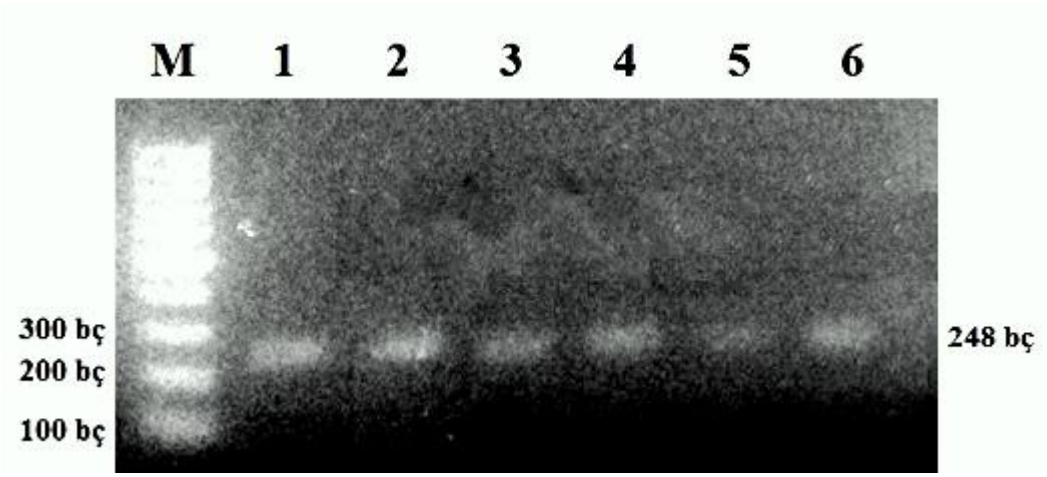
Şekil 4.7: 72 saatlik örneklerin CAT aktivite analizi.

4.4. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Moleküler çalışmalar da belirgin fark gösterdikleri için; 72 saat süresince çimlendirilen örnekler üzerinden yürütüldü.

4.4.1. CAT RT-PCR Analizi

Kontrol (sadece su), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + hormon (30 µM bakır + 2 µM HBR; 40 µM bakır + 2 µM HBR) uygulanması altında 72 saat süresince çimlendirilen arpa köklerinden RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentez edildi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak CAT enzimine uygun primerler ile RT-PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 V'da 30 dakika süresince yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: CAT RT-PCR sonuçları. Soldan sağa sırasıyla M, markır; 1, kontrol; 2, 30 µM bakır; 3, 30 µM bakır + 2 µM HBR; 4, 40 µM bakır; 5, 40 µM bakır + 2 µM HBR; 6, 2 µM HBR.

Elde edilen sonuçlara göre, çalışmada kullanılan örneklerde PCR beklenen büyüklükteki bant (248 bç) elde edildi. Tüm örneklerdeki anlatımın hemen hemen aynı olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 48 ve 72 saat süresince kontrol (sadece su), bakır (30 µM ve 40 µM), HBR (2 µM) ve bakır + hormon (30 µM bakır + 2 µM HBR; 40 µM bakır + 2 µM HBR) uygulanması yapılan ayçiçeği tohumlarının primer kök uzunlukları analiz edildi. Deneye 72 saat sürescince çimlendirilen ayçiçeği tohumlarının protein miktarlarının belirlenmesi ile devam edildi. Bu örneklerin protein bant profilleri, SDS-PAGE'de karşılaştırıldı. Aynı örneklerin katalaz enzim aktivitesi tayin edildi. Ayrıca CAT enzimlerine özgü primerler kullanılarak RT-PCR yapıldı.

Morfolojik çalışmalar sonucunda, bakır stresinin pimer kök uzunluğunu azalttığı belirlendi. Bu sonuç farklı çalışmalar ile desteklenmiştir. Janas ve diğ. (2010)'de, 2 mercimek kültüründe yaptıkları çalışmada (cv. Krak ve cv. Tina), bakır uygulamasının her iki kültürde de kök uzunluğunu azalttığını rapor etmişlerdir. Lequeux ve diğ., (2010) yaptıkları çalışmada benzer sonuç elde etmişleridir. *Arabisopsis thaliana* bitkisinde yaptıkları deneyler sonucunda bakır konsantrasyonun artması ile (50 µM'a kadar) primer kök uzunluğunun azaldığını belirlemişlerdir. Çeltikte yapılan başka bir çalışmada ise 10, 50 ve 100 µM olmak üzere üç farklı konsantrasyondaki bakır beş gün süresince uygulanmıştır. Bu çalışmadaki sonuçlar analiz edildiğinde bakırın kök büyümesini azalttığı ve bu azalmanın en fazla 100 µM uygulanan beş günlük bitkilerde gözlendiği rapor edilmiştir (Thounaojam ve diğ., 2012).

Bakır + HBR uygulamasının, hem 48 saat sonunda hem de 72 saat sonunda elde edilen verilerin analizi sonucunda, bakırın kök uzunluğu üzerindeki olumsuz etkisini azalttığı belirlendi. Fariduddin ve diğ. (2009) *Brassica juncea* (Hint hardalı) bitkisini; 50, 100 ve 150 mg kg/l bakır konsantrasyonlarında yetiştirmiş ve bu bitkilere 10^{-10},10^{-8} and 10^{-6} M konsantrasyonda HBL uygulamışlardır. Bakır uygulamasının kök uzunluğunu azalttığını buna karşın HBL uygulamasının bakırın sebep olduğu olumsuz etkiyi (özellikle 50 mg kg/l bakır + 10^{-10} M HBL uygulanan bitkilerde) düzelttiğini rapor etmişlerdir.

Choudhary ve diğ. (2012) yaptıkları çalışma bu sonucu desteklemektedir. Bakır stresi altında yetiştirilen turp (*Raphanus sativus* L.) bitkisinde EBR hormonu etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, bakırın kök büyümesini 2 kat, sürgün büyümesini ise 3 kat azalttığını görmüşlerdir. Bakır stresindeki bitkiler ile bakır + EBR uygulamasının altındaki bitkiler kıyaslandığında ise EBR uygulamasının kök uzunluğunu yaklaşık 2 kat arttırdığını rapor etmişlerdir. BR'nin hücre uzamasını arttırması ve hücre döngüsü olaylarındaki olumlu etkisi, BR'nin, bakır stresi altında yetişen bitkilerin büyüme oranları üzerindeki etkisini açıklayabilir (Guo ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2009; Gonzales-Garcia ve diğ., 2011).

Düşük konsantrasyonda (30 µM) bakır uygulamasının kontrole göre protein miktarını azalttığı gözlendi. Yüksek konsantrasyon uygulanan örneklerin protein içeriğinde ise artma belirlendi. Körpe ve Aras (2011); 30, 60, 120 ve 240 mg/l olmak üzere dört farklı konsantrasyondaki bakır stresi altında patlıcan (*Solanum melongena* L.) bitkisini yetiştirmişler ve 21 gün sonra en yüksek konsantrasyonda bakır uygulanan örneklerde çözünebilir protein miktarının azaldığını rapor etmişlerdir. Yüksek konsantrasyondaki bakırın (40 µM) etkisini göstermesi için 72 saat çimlendirme süresi yeterli olmadığından, protein miktarının azalmadığı söylenebilir.

Poonam ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada ise, bakır stresi (0.25 mM, 0.50 mM, ve 0.75 mM) altında yetiştirdileri *Brassica juncea* bitkilerinde, 24-epibrassinolidin total protein miktarına etkisini incelemişlerdir. Bakır stresi uygulamasının protein içeriğini azalttığını ama hormon uygulamasının arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde sadece bakır (30 µM) uygulanan örneklerde protein içeriğinin azaldığı belirlendi. Bakır uygulamasının sebep olduğu azalmanın amino asit metabolizmasındaki olumsuz etki sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (El-Shintinawy ve El-Ansari, 2000). Bakır + HBR uygulamasının ise protein miktarını kontrole göre arttırdığı belirlendi. Bu durum, HBR'nin transkripsiyon ve translasyondaki etkileri ile açıklanabilir (Bajguz, 2002; Fariduddin ve diğ., 2004). Çeşitli metal stresi altında, EBL uygulamasının, protein içeriğini arttırdığını rapor eden çalışmalar vardır. Alam ve diğ. (2007), nikel uygulanan *Brassica juncea* bitkisinde; Ahammed ve diğ. (2013) ise kadmiyum uygulanan domateste EBL uygulaması ile protein içeriğinin arttığını belirtmişlerdir.

Bakır uygulamasının katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında; düşük konsantrasyonda (30 µM) enzim aktivitesinin azalırken, 40 µM bakır uygulamasında enzim aktivitesinin arttığı gözlendi. Çalışılan türe ve uygulanan bakır konsantrasyonuna göre CAT aktivitesinde değişim olduğu söylenebilir. Bakır stresi altında CAT aktivitesinde bir değişim olmadığını rapor eden çalışmaların yanında (Pastori ve diğ., 2002; Thounaojam ve diğ., 2012); enzim aktivitesinde azalma olduğunu tespit eden çalışmalar da mevcuttur (Wang ve diğ., 2004). Choudhary ve diğ. (2012) turp (*Raphanus sativus* L.) fideleri üzerinde yaptıkları çalışmada, bakır stresinde CAT enzim aktivitesinin kontrole göre 3.2 kat arttığını belirtilmiştir. Bakır uygulamasının CAT enzim aktivitesini arttırdığı; Jouili ve El Feriani (2003)'te ayçiçeğinde yaptıkları çalışmada da rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde CAT enzim aktivitesinin, yüksek konsantrasyonda (40 µM) bakır stresi uygulanan örneklerde arttığı gözlendi.

Bitkilerde, oksidatif stres ile mücadelede hormon konsantrasyonunun arttırılması ile orantılı olarak antioksidanların artmasının daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Andre ve diğ., 2010; Thao ve Tran, 2011). Bakır + HBR uygulamasının CAT enzim aktivitesini arttığı belirlendi. Fariduddin ve diğ. (2009) *Brassica juncea* bitkisini; 50, 100 ve 150 mg kg/l bakır konsantrasyonlarında yetiştirmişler ve bu bitkilere 10^{-10},10^{-8} ve 10^{-6} M konsantrasyonda HBL uygulamışlardır. CAT enzim aktivitesinin, sadece bakır, sadece HBL ve bakır + HBL uygulanan örneklerde arttığını hatta bu artışın bakır + HBL uygulanan örneklerde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da bakır + HBR uygulanan örneklerdeki CAT enzim aktivitesinin sadece bakır uygulananlara göre daha fazla arttığı belirlendi.

Poonam ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada da, CAT enzimini analiz etmişler ve hormon uygulaması ile bakır stresinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığını rapor etmişlerdir. Birçok çalışma sonucunda BR'nin bazı antioksidan genlerin anlatımlarını arttırdığı ve sonuçta süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi antioksidanların aktivitelerinin arttığı görülmüştür (Mazorra ve diğ., 2002; Cao ve diğ., 2005).

Moleküler çalışmalar kapsamında CAT enzimlerine özgü primerler kullanılarak RT-PCR yapıldı. CAT primerleri ile yapılan RT-PCR sonucunda beklenen büyüklükteki bant (248 bç) tüm örneklerde elde edildi. Örnekler incelendiğinde, tüm örneklerdeki anlatımın hemen hemen aynı olduğu görüldü. Pena ve diğ. (2011) 5 ve 10 µM bakır stresi altında yetiştirdikleri ayçiçeğinde yaptıkları çalışmada kontrol bitkilerinde kotiledonda, CAT anlatımının olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise mısır bitkisinde CAT anlatımının reaktif oksijen türleri ile indüklendiği belirtilmiştir (Mylona ve diğ., 2007).

Değişen iklim koşulları, ağır metal kirliliği gibi insan kaynaklı etmenler nedeniyle dünyada ve ülkemizde verimli zirai alanlar giderek azalmaktadır. Bunun sonucunda azalan tarım ürünleri artan nüfusun ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bu tez çalışmasında ekonomik açıdan önemli bir yağ bitkisi olan ayçiçeği kullanılarak, ağır metal stresinin bitki üzerinde yarattığı olumsuz etkilerin brassinosteroid hormonu ile iyileştirilebildiği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

Ait-Ali, N., M. Bernal, M.P. ve Ater, M., 2002, Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays, Plant and Soil,* 239, 103–111.

Ahammed, G.J., Choudhary, S.P., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J., 2013, Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene–cadmium co-contamination induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato, *Journal of Experimental Botany,* 64, 199-213.

Alam, M.M., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A., 2007, Effect of 28-homobrassinolide on nickel induced changes in *Brassica juncea, Photosynthetica,* 45, 139-142.

Altmann, T., 1999, Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants, *Planta,* 208, 1-11.

Andre, C.M., Larondelle, Y., Evers, D, 2010, Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review, *Current Nutrition and Food Science,* 6, 2-12.

Ann, C., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Nele, H., Nathalie, V., Suzy, V.S., Frank, V.B., Yves, G., Jan, C., and Jaco, V., 2011, The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Journal of Plant Physiology,* 168, 309–316.

Anuradha, S., Rao, S.S.R., 2001, Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Growth Regulation,* 33(2), 151-153.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Strzałka, K., 2009, Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium, *Journal of Trace Elements in Medicine Biology,* 23, 50-60.

Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A., 1995, Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings, *Tree Physiology,* 15, 411-415.

Arıoğlu, H.H., 2007, Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 220, Ders Kitapları, Yayın No: A-70, 160-290.

Arora, P., Bhardwaj, R., Kanwar, M.K., 2010, 24-epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. under Zn metal stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants,* 16, 285-293.

Ashraf, M., Akram, N.A., Arteca, R.N., Foolad, M.R., 2010, The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 162-190.

Bajguz, A., 2002, Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatins synthesis in *Chlorella vulgaris, Journal of Plant Physiology*, 159, 321-324.

Bajguz, A., 2007, Metabolism of brassinosteroids in plants, *Plant Physiology Biochemistry*, 45, 95-107.

Bajguz, A., 2010, An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress, *Environmental and Experimental Botany*, 68, 175-179.

Bajguz, A., 2011, Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 406-416.

Bishop, G.J., Koncz, C., 2002, Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, *The Plant Cell*, 14, 97-110

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

Balbi, V., Devoto, A., 2008, Jasmonate signaling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios, *New Phytologist*, 177, 301-318.

Bari, R., Jones, J. D. G., 2009, Role of plant hormones in plant defence responses, *Plant Molecular Biology*, 69, 473-488.

Beauclair, L., Yu, A., Bouche, N, 2010, microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis, The Plant Journal*, 62, 454-462.

Bhakuni, G., Dube, B.K., Sinha, P., Chatterjee, C., 2009, Copper stress affects metabolism and reproductive yield of chickpea, *Journal of Plant Nutrition* 32, 703-711.

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F., Cammue, B.P., 2006, The role of ethylene in host-pathogen interactions, *Annual Review of Phyopathology*, 44, 393-416.

Bouazizi, H., Jouili, H., El Ferjani, E., 2007a, Effects of copper excess on growth, hydrogen peroxide, production and peroxidase activities in maize seedlings (*Zea mays* L.), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 751-6.

Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., El Ferjani, E., 2007b, Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): Hydrogen peroxide accumulation and peroxidases modulation, *Acta Biologica Hungarica*, 58, 209-218.

Bowen, H. J. M., 1985, *The natural environment and the biogeochemical cycles*, The Handbook of Environmental Chemistry, In: Hutzinger D. (ed.), Part D, Springer-Verlag, New York, 1-26.

Brooks, A., Collins, C.J., Thurman, D.A., 1981, The mechanism of zinc tolerance in grasses, *Journal of Plant Nutrition*, 3, 695-705.

Cao, S., Xu Q., Cao Y., Qian K., An K., Zhu Y., Binzeng H., Zhao H., Kuai, B., 2005, Loss of function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*, *Physiologica Plantarum*, 123, 57-66.

Chatterjee, J., Chatterjee, C., 2000, Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower, *Environmental Pollution*, 109 (1), 69-74.

Choi, Y., Fujioka, S., Nomura, T., Harada, A., Yokota, T., Takatsuto, S., Sakurai, A., 1997, An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C6-oxidation, *Phytochemistry*, 44, 609-613.

Choudhary, S.P., Bhardwaj, R., Gupta, B.D., Dutt, P., Gupta, R.K., Biondi, S. and Kanwar, M., 2010, Epibrassinolide induces changes in indole-3-acetic acid, abscisic acid and polyamine concentrations and enhances antioxidant potential of radish seedlings under copper stress, *Physiologia Plantarum*, 140, 280–296.

Choudhary, S.P., Kanwar, M., Bhardwaj, R., Gupta, B.D., Gupta, R.K., 2011, Epibrassinolide ameliorates Cr (VI) stress via influencing the levels of indole-3-acetic acid, abscisic acid, polyamines and antioxidant system of radish seedlings, *Chemosphere*, 84, 592–600

Choudhary, S.P., Oral, H.V., Bhardwaj, R., Yu, J-Q., Phan-Tran, L-S., 2012, Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*, *Journal of Experimental Botany*, 63 (15), 5659-5675.

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

Clouse, S.D., 2011, Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development, *The Plant Cell,* 23, 1219-1230.

Divi, U.K., Rahman, T., Krishna, P., 2010, Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways, *BMC Plant Biology* 10, 151.

El-Shintinawy, F., El-Ansary, A., 2000, Differential effect of Cd^{2+} and Ni^{2+} on amino acid metabolism in soybean seedlings, *Biologica Plantarum,* 43, 79-84.

El-Tayeb, M.A., Ahmed, M.K., 2007, Apoplastic protein pattern, hydrolases and peroxidase activity of *Vicia faba* cultivars as ınfluenced by drought, *International Journal of Agriculture and Biology,* 9 (2), 226-230.

Fariduddin, Q., Ahmad, A., Hayat, S., 2004, Response of *Vigna radiata* to foliar application of 28-homobrassinolide and kinetin, *Biologica Plantarum,* 48, 465-468.

Fariduddin, Q., Yusuf, M., Hayat, S, Ahmad, A., 2009, Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in *Brassica juncea* plants exposed to different levels of copper, *Environmental and Experimental Botany* 66 (2009) 418–424

Fassler, E., Evangelou, M.W., Robinson, B.H., Schulin, R., 2010, Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), *Chemosphere,* 80, 901-907.

Feierabend, J., Schaan, C., Hertwig, B., 1992, Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II, *Plant Physiology,* 100, 1554-1561.

Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodrigues, M.V., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, J.C., Hernandez, L.E., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2011, Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondria Mn-SOD, *Journal of Plant Physiology,* 168, 1303–1308

Forstner, U., Wittmann, G.T.W., 1979, *Metal pollution in the aquatic environment,* Springer-Verlag, Berlin, 386.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., Scott, I.M., 1997, Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiologia Plantarum,* 100, 241-254.

Fridovich, L., 1986, Biological Effect of Superoxide Radical, *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 247, 1-11.

Gangwar, S., Singh, V.P., Srivastava, P.K., and Maurya, J.N., 2011, Modification of chromium (VI) phytotoxicity by exogenous gibberellicacid application in *Pisum sativum* (L.) seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1385–1397.

Ghoulam, G., Foursy, A. ve Fares, K., 2002, Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars, *Environmental and Experimental Botany,* 47 (1), 39-50.

Glazebrook, J., 2005, Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens, *Annual Review of Phytopathology,* 43, 205-227.

Gonzalez-Garcia MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-Garcia S, Russinova E, Cano-Delgado AI. 2011, Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots, *Development*, 138, 849–859.

Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippenanderson, J.L. and Cook, J.C., 1979, Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature,* 281, 216-217.

Gudesblat, G.E., Russinova, E., 2011, Plants grow on brassinosteroids, *Current Opinion in Plant Biology* 14, 530-537.

Guo H, Li L, Ye H, Yu X, Algreen A, Yin Y. 2009, Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in Arabidopsis thaliana, Proceedings of the *National Academy of Sciences*, USA 106, 7648–7653.

Hadiarto, T., Tran, L.S., 2011, Progress studies of drought-responsive genes in rice, *Plant Cell Reports* 30, 297-310.

Hayat, S., Ahmad, A., 2011, *Brassinosteroids: a class of plant hormone,* Dordrecht: Springer ISBN: 978-94-007-0188-5.

Janas, K.M., Zielinska-Tomaszewska, J., Rybaczek, D., Maszewski, J., Posmyk, M.M., Amarowicz, R., Kosinska, A., 2010, The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings, *Journal of PlantPhysiology* 167 (2010) 270–276

Jiang, W., Lıu, D., Lıu,X., 2001, Effect of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays, Biologia Plantarum,* 44 (1), 105-109.

Jouili, H., El Feriani, E., 2003, Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess, *Comptes rendus biologies,* 326, 639-644.

Kartal, G., Temel, A., Arican, E., Gozukirmizi, N., 2009, Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division, *Plant Growh Regulation* 58 (3), 261-267.

Körpe, D.A., Aras, S., 2011, Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers, *Mutation Research* 719 (2011) 29–34

Kumar , P., Tewari, R. K., Sharma, P.N., 2007, Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants, *Plant Cell Reports,* 27 (2), 399-409.

Kurepin, L.V., Joo, S-H., Kim, S-K., Pharis, R.P., Back, T.G., 2012, Interaction of brassinosteroids with light quality and plant hormones in regulating shoot growth of young sunflower and *Arabidopsis* seedlings, *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 156-164.

Kutschera, U. and Wang, Z-Y., 2012, Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective, *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3511-3522.

Lequeux, H., Hermans, C., Lutts, S., Verbruggen, N., 2010, Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 673-682.

Lexmond, T.M., Van der Vorm, P.D.J., 1981, The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize, *Netherlands Journal of Agricultural Science,* 29, 209-230.

Loake, G., Grant, M., 2007, Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists, *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466-472.

Lorenzo, O., Solano, R., 2005, Molecular players regulating the jasmonate signaling network, *Current Opinion in Plant Biology,* 8, 532-540.

Luo, Y., Rimmer, D.L., 1995, Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metalcontaminated soil, *Environmental Pollution,* 88, 79-83.

Mazorra, L.M., Nunez, M., Echeraria, E., Coll, F., Sanchez-Blanco, M.J., 2002, Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures, *Biologica Plantarum,* 45, 593-596.

Meharg, A.A., 1994, Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment, *Plant Cell and Environmet,*17, 989-993.

Messing, S.A.J., Gabelli, S.B., Echeverria, I., Vogel, J.T., Guan, J.C., Tan, B.C., Klee, H.J., McCarty, D.R., Amzel, L.M., 2010, Structural insights into maize

Viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid, *The Plant Cell,* 22, 2970-2980.

Mitchell, R.L., Burchett, M.D., Pulkownik, A., McCluskey, L., 1988, Effects of environmentally hazardous chemicals on the emergence and early growth of selected australian native plants, *Plant and Soil,* 112, 195-199.

Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1997, Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds, *Environmental Pollution,* 98, 233-238.

Monni, S., Salemaa, M., White, C., Tuittila, E., Huopalainen, M., 2000, Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland, *Environmental Pollution,* 109, 211-219.

Muller, B., Sheen, J., 2007, Advances in cytokinin signaling, *Science,* 318, 68-69.

Müssig, C. and Altmann, T., 1999, Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids, *Plant Physiology and Biochemistry,* 37, 363-372.

Mylona, P.V., Polidoros, A.N., Scandalios, J.G.,2007, Antioxidant gene responses to ROS generating xenobiotics in developing and germinated scutella of maize, *Journal Experimental Botany,* 58, 1301–12.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmulling, T. and Tran, L-S.P., 2011, Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis, *The Plant Cell,* 23, 2169-2183.

Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Tax, F.E., Yoshida, S. and Feldmann, K.A., 2000, Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis, Plant Physiology,* 124, 201-210.

Ouzounidou, G., 1994, Root growth and pigment composition in relationship to element uptake in *Silene compacta* plants treated with copper, *Journal of Plant Nutrition,* 17, 933-943.

Ouzounidou, G., Moustakas, M. ve Eleftheriou, E.P., 1997, Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* 32, 154-160.

Özgüven, M., 1988, Yağ Bitkileri II (Kolza, Ayçiçeği, Hintyağı), Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 47, 28-65.

Pastori, G.M., Foyer, C.H., 2002, Common components, networks and pathways of cross tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls, *Plant Physiology*, 129, 460-468.

Patakas, A., Nikolaou, N., Zioziou, E., Radoglou, K., Noitsakis, B., 2002, The role of organic solute and ıon accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines, *Plant Science*, 163, 361-367.

Patterson, W., Olson, J.J., 1983, Effects of heavy metals on radicle growth of selected woody species germinated on filter paper, mineral and organic soil substrates, *Canadian Journal of Forest Research*, 13, 233-238.

Peleg, Z., Blumwald, E., 2010, Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology* 14, 290-295.

Pena, L.B., Azpilicueta, C.E., Gallego, S.M., 2011, Sunflower cotyledons cope with copper stress by inducing catalase subunits less sensitive to oxidation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25, 125-129.

Poonam, Kaur, R., Bali, S., Singh, R., Pati, P.K., Bhardwaj, R., 2014, Treatment of 24-EBL to *Brassica juncea* plants under Cu-metal stress lowers oxidative burst by activity of antioxidative enzymes, *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 10 (2), 315-327.

Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M., 2009, Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 596-602.

Pourakbar, L., Khayami, M., Khara, J., Farbodnia, T., 2007, Copper-induce change in antioxidative system in maize (*Zea mays* L.), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (20) 3662-3667.

Putt, E.D., 1997, Sunflower Technology and Production, *American Society of Agronomy*,1.

Sakurai A., Yokota T. and Clouse S.D., 1999, *Brassinosteroids: Steroidal plant hormones*, Springer, Tokyo and New York, ISBN: 4431702148.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology*, 13, 468-474.

Santner, A., Estelle, M., 2010, The ubiquitin–proteasome system regulates plant hormone signaling, *The Plant Journal*, 61, 1029-1040.

Semerci A., Özer S., 2011, Türkiye'de Ayçiçeği Ekim Alanı, Üretim Miktarı ve Verim Değerinde Olası Değişimler, *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 8(3).

Slama, I., Messedi, D., Ghnaya, T., Savoure, A., Abdelly, C., 2006, Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*, *Environmental and Experimental Botany*, 56, 231-238.

Smirnoff, N., 1993, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytologist*, 125, 27-58.

Srivastava, A., 2002. Obstacles to human hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors, *Journal of Cellular Biochemistry*, 38, 39-45.

Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993, Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem ıı are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 88, 590-598.

Stiborova, M., Doubravova, M., Brezinova, A. ve Friedrich, A., 1986a, Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Photosynthetica*, 20, 418-425.

Stiborova, M., Hromadkova, R. ve Leblova, S., 1986b, Effect of ions of heavy metals on the photosynthetic characteristics of maize (*Zea mays* L.), *Biologia Plantarum*, 4**,** 1221-1228.

Sun, Y., Fan, X-Y., Cao, D-M., Tang, W., He, K., Zhu, J-Y., He, J-X., Bai, M-Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T-W., Ji, H., Wong, W.H., Rhee, S.Y., Wang, Z-Y., 2010, Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*, *Developmental Cell*, 19, 765-777.

Suzuki, H., Inoue, T., Fujioka, S., Saito, T., Tasatsuto, S., Yokota, T., Murofushi, N., Yanagisawa, T., Sakurai, A., 1995, Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intemediate of the biosynthesis of barssinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry*, 40, 1391-1397.

Swanson, S., Gilroy, S., 2010, ROS in plant development, *Physiologia Plantarum*, 138, 384-392.

Taiz L., Zeiger E., 2006, *Plant Physiology*, Fourth edition, Sinauer Associates Inc., ISBN-100878938567.

Tambussi, E. A., Bartoli, C. G., Beltrano, J., Guiamet, J. J. ve Araus, J. L., 2000, Oxidative damage to tylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*), *Physiologia Plantarum*, 108, 398-404.

Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y., Ünalan, Ş., 2007, Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper, *Chemosphere*, 67, 89-98.

T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı, Koperatifçilik Genel Müdürlüğü, 2014, *2013 Yılı AyçiçeğiRaporu*, http://koop.gtb.gov.tr/data/5342b5ff487c8ea5e4b4d9bb/2013%20Ay%C3%A7i%C3%A7e%C4%9Fi%20Raporu.pdf.

Thao, N.P., Tran, L.S., 2011, Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean, *Critical Reviews in Biotechnology* (in press).

Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L., Sanjib, P., 2012, Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice, *Plant Physiology and Biochemistry* 53 (2012) 33-39.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2010, Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport, *Plant and Cell Physiology* 51, 1821-1839.

Wang, S-H., Yang, Z-M., Yang, H., Lu, B., Li, S-Q., Lu, Y-P., 2004, Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica junicea* L., *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, 203–212.

Wang, S.H., Zhang, H., Zhang, Q., Jin, G.M., Jiang, S.J., Jiang, D., He, Q.Y., Li, Z.P., 2011, Copper-induced oxidative stress and responses of the antioxidant system in roots of *Medicago sativa*, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197, 418-429.

Wang, L., Wang, Z., Xu, Y., Joo, S-H., Kim, S-K., Xue, Z., Xu, Z., Wang, Z., Chong. K., 2009, OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice, *The Plant Journal*, 57, 498-510.

Weser, U., Schubotz L. M. ve Younes M., 1979, *In: Copper in the Environment*, Health effects, , Nriagu J.O. (Ed.), John Wiley ve Sons, Toronto, 197-240.

Wojcik, M., Tukiendorf, A., 2003, Response of wild type of *Arabidopsis thaliana* to copper stress, *Biologia Plantarum*, 46 (1), 79-84.

Yang, C-J., Zhang, C., Lu, Y-N., Jin, J-Q. and Wang, X-L., 2011, The mechanisms of brassinosteroids' action: From signal transduction to plant development, *Molecular Plant*, 4, 588-600.

Yokota, T., 1997, The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends in Plant Science*, 2, 137-143.

Yruela, I., 2005, Copper in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17,145-156.

Yuan, M., Li, X., Xiao, J., Wang, S, 2011, Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice, *BMC Plant Biology* 11, 69.

Zhang, S., Cai, Z., Wang, X., 2009, The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 106, 4543–4548.

Zhu, J-K., 2003, Regulation of ion homeostasis under salt stress, C*urrent Opinion in Plant Biology*, 6 (5), 441-445.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Kevser Betül CEYLAN
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	27.01.1987, İstanbul
E-mail	kevserbetulburun@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2014
Lisans	Ege Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü/ Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD.	2009
Lise	Üsküdar Çağrı Bey Anadolu Lisesi	2005