

G. ALDEMİR BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ MUĞLA 2015

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MISIRDA BOR ve 24-epiBL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM ALDEMİR

**ŞUBAT 2015
MUĞLA**

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MISIRDA BOR ve 24-epiBL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM ALDEMİR

ŞUBAT 2015
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

GİZEM ALDEMİR tarafından hazırlanan **MISIRDA BOR ve 24-epiBL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 20/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

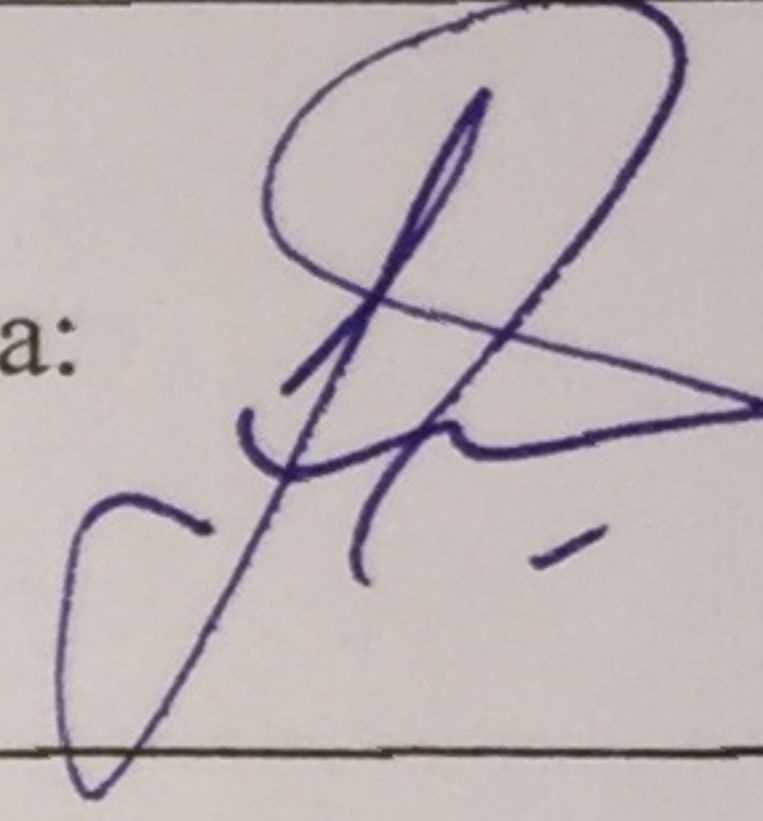
TEZ SINAV JURİSİ

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

Biyoloji Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

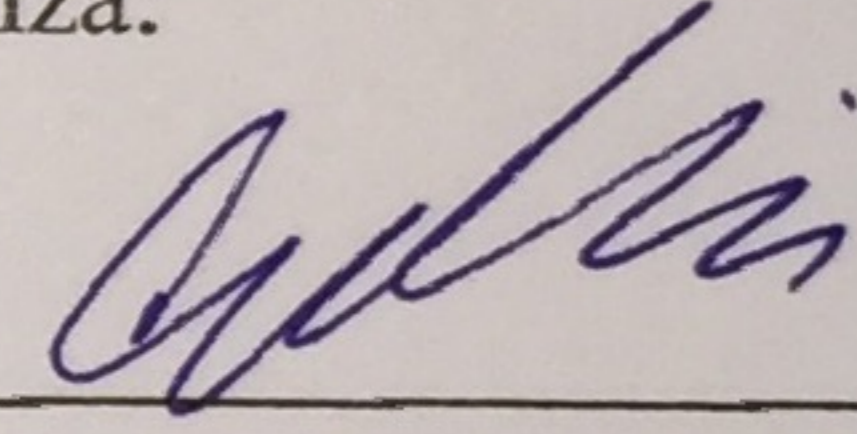


Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

Biyoloji Anabilim Dalı,

Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:

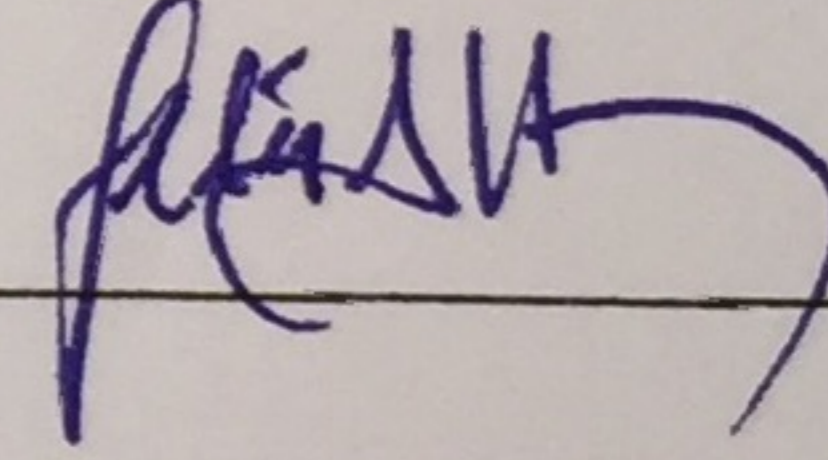


Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



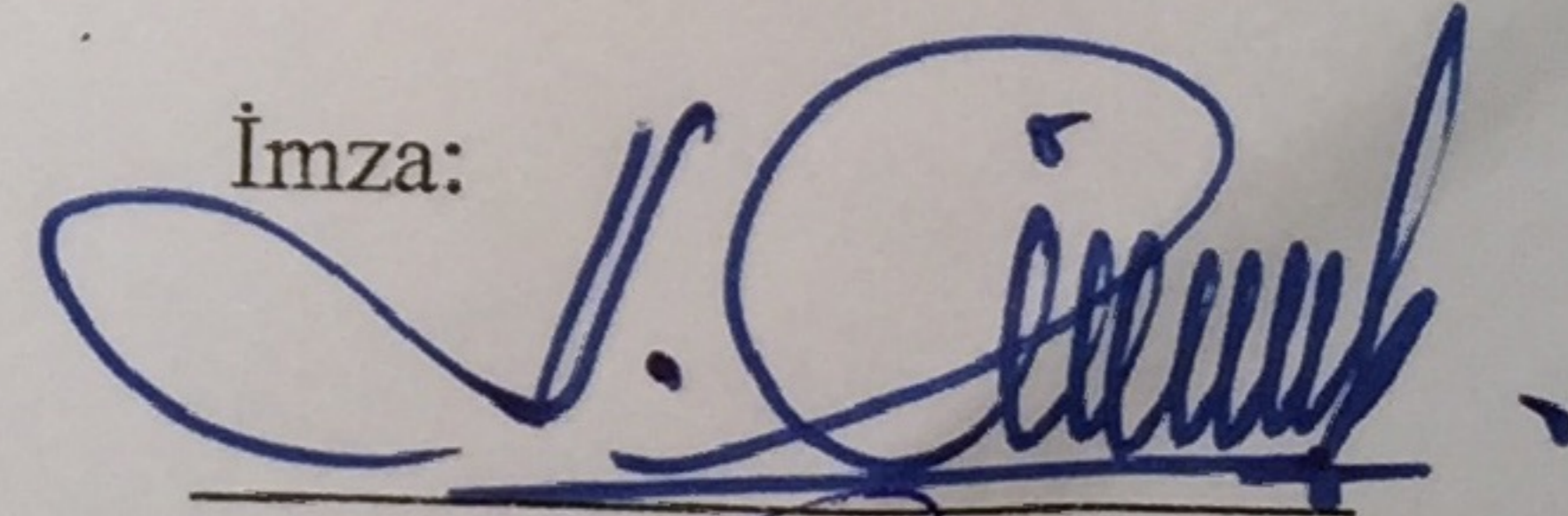
ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

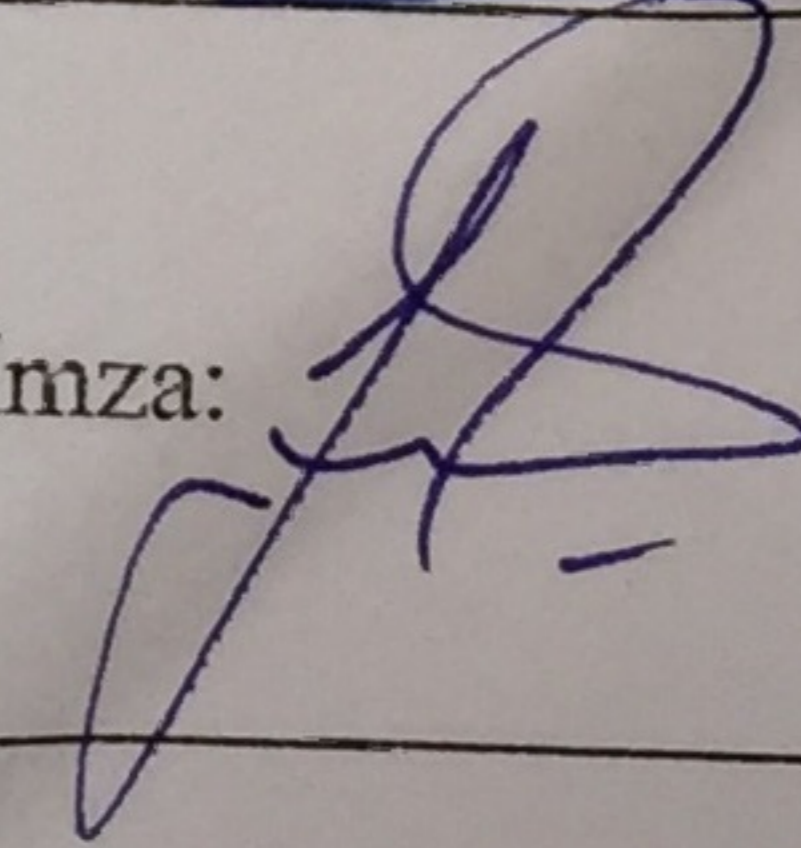


Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 20.02.2015

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

Gizem ALDEMİR

20/02/2015

(imza)

ÖZET
MISIRDA BOR ve 24-epiBL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem ALDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Şubat 2015, 95 sayfa

Bu tez çalışmasında, *Zea mays* L. (mısır) bitkisinde bor stresi ve bor stresine karşı 24-epibrassinolid (24-epiBL) uygulamasının etkisi RAPD tekniği ile araştırılmıştır. Tez kapsamında iki farklı çalışma yürütülmüş; çalışmalardan ilkinde tohumlar perlitte çimlendirilmiş, Hoagland çözeltilisi ile sulanmış ve çalışma 20 günde sonlandırılmıştır. Tohum ekiminden 12 gün sonra 5 gün boyunca borik asit (kontrol, 50, 100, 150 ppm) sulama suyuna ilave edilerek verilmiş ve son borik asit uygulamasını takiben 24-epiBL (kontrol, 0.01, 0.5, 1 μ M) uygulaması yapraklara püskürtülerek yapılmıştır. İkinci çalışmada ise, tohumlar torf içeren saksılara ekilmiş, musluk suyu ile sulanmış ve bitkiler 30 gün yetiştirilmiştir. Tohum ekiminden 13 gün sonra bitkiler borik asit (kontrol, 30, 60, 90, 120 ppm) içeren sulama suyu ile 5 gün boyunca sulanmış ve son borik asit uygulaması yapılan gün ile bunu izleyen iki gün, 24-epiBL (kontrol, 0.01, 0.5, 1 μ M) yapraklara püskürtülmüştür. Saksıda yetiştirilen bitkilerde bazı büyüme parametreleri (bitki boyu, kök boyu, bitki yaş ağırlığı, bitki kuru ağırlığı, kök yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı) ve yaprak örneklerinde bor analizi yapılmıştır. Saksı ve perlitte yetiştirilen bitki yapraklarından DNA izolasyonunu takiben RAPD analizi yapılmıştır.

Bitki büyüme parametrelerine göre (bitki boyu, kök boyu, bitki yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı, bitki kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı) kontrol, 30, 60 ve 90 ppm bor uygulamalarında 0.5 ve 1 μ M 24-epiBL uygulamasının iyileştirici etkileri gözlenirken; 120 ppm bor dozunda 24-epiBL uygulamasının iyileştirici etkisi gözlenmemiştir. Yapılan bor analizi sonucunda artan bor dozlarına bağlı olarak bitki yapraklarındaki bor miktarının arttığı belirlenmiştir. RAPD analizlerinde ise, bor uygulamasına karşı artan konsantrasyonlarda 24-epiBL (0.01, 0.5 ve 1 μ M) uygulanan bitki örneklerinden izole edilen DNA örnekleri 48 RAPD primeri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Jel üzerinde görüntülenen RAPD PCR ürünleri "Jaccard Benzerlik Matrisi" kullanılarak analiz edilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırılan örneklerde yüksek bor dozunun (120 ve 150 ppm), bitki genomunda bir takım varyasyonlara sebep olabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışma ile mısır bitkisinde bor stresine karşı 24-epiBL'nin etkisi ilk kez çalışılmış ve artan bor toksisitesine karşı 24-epiBL'nin olumlu etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak 24-epiBL'nin mısır bitkisinde bor toleransını arttırmada önemli rol oynayabileceği kanısı ile daha ayrıntılı araştırılması sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bor, Mısır, RAPD, 24-epiBL.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BORON and 24-epiBL in MAIZE

Gizem ALDEMİR

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

February 2015, 95 Pages

In this thesis, boron stress and effect of the 24-epibrassinolide (24-epiBL) treatments-PCR against the boron stress in *Zea mays* L. plant was investigated by RAPD technique. Two different studies have been carried out within the scope of the thesis; in the first of these studies the seeds were germinated in perlite, watered with Hoagland solution, and the study was terminated 20 days. 12 days after sowing the seed, during 5 days boric acid (control, 50, 100, 150 ppm) were given by addition to irrigation water and following the last application of boric acid, 24-epiBL (control, 0.01, 0.5, 1 μ M) application was sprayed on the leaves. In the second study, the seeds were sown in pots containing peat, watered with tap water and plants were grown for 30 days. 13 days after sowing the seed, plants were watered by irrigation water containing boric acid (control, 30, 60, 90, 120 ppm) during 5 days and the day of the last application of boric acid with followed by two days, 24-epiBL (control, 0.01, 0.5, 1 μ M) was sprayed on the leaves. Some growth parameters in the plants grown in pots (plant height, root length, wet weight of plant, plant dry weight, wet weight of roots, root dry weight) and boron analysis was performed on the leaf samples. After DNA isolation from plant leaves grown in pots and perlite, RAPD analysis was performed.

According to the plant growth parameters (plant height, root length, plant wet weight, wet weight of stem, plant dry weight, root dry weight), although the observed ameliorating effects of 0.5 ve 1 μ M 24-epiBL application at control, 30, 60 and 90 ppm boron application, optimizer effect of 24-epiBL was not observed in application of the 120 ppm boron dose. As a result of analysis of boron, it was determined that increasing the amount of boron in plant leaves depending on increasing of doses of boron. In RAPD analysis the DNA samples that isolated from plant samples of applied 24-epiBL increasing concentrations (0.01, 0.5 and 1 μ M) against the boron application were compared using 48 RAPD primers. RAPD PCR products displayed on the gel were analyzed using "Jaccard similarity matrix" and highest of boron dose (120-150 ppm) in the samples compared with the control group showed that may cause some variation in the plant genome.

The effect of 24-epiBL against boron stress in maize plants was studied for the first time with this work and against the increased toxicity of boron, positive effects of 24-epiBL have been identified. In conclusion, 24-epiBL hormone plays an important role for increasing boron tolerance in maize and with this idea it was concluded that further research needs to be done.

Keywords: Boron, Maize, RAPD, 24-epiBL.

Aileme...

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin başlangıcından bitimine kadar bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, özgürce çalışmamı sağlayan, öğrenmem konusunda her türlü yardımı benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım esnasında gerek manevi desteği ile yanımda olan gerekse Araştırma Laboratuvarı Merkezi Malzeme Araştırma Laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan MSKÜ Araştırma Laboratuvarı Merkezi Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Selçuk AKTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında Biyokimya Laboratuvarı'nın imkanlarını kullanmamda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Filiz ALTAN ve Yrd. Doç. Dr. Ergun KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Mısır tohumlarının temininde yardımcı olan Muğla Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Ziraat Mühendisi Sadullah ARMAĞAN'a ve bor analizi deneylerimde Muğla Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Laboratuvarında ICP-AES cihazında örneklerimi okuyarak bana yardımcı olan Ziraat Mühendisi Mustafa ÇELİKKOL'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	11
1.2.1. Mısır ve farklı bitkilerde bor stresi ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar..	12
1.2.2. Mısır ve farklı bitkilerde bor ve diğer stres faktörlerine karşı brassinosteroidlerin etkisi üzerine yapılmış bazı çalışmalar.....	16
1.2.3. Mısırdaki ve farklı bitkilerde genotoksisteyi belirlemek üzere RAPD çalışmaları	18
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
2.1. Bitki Materyali	25
2.2. Fidelerin Yetiştirilmesi.....	25
2.2.1. Tohum sterilizasyonu.....	26
2.2.2. Perlitte çimlendirme ve uygulamalar	26
2.2.3. Saksıda çimlendirme ve uygulamalar	28
2.2.3.1. Ölçümler	30
2.2.3.2. İstatistiksel analiz.....	30
2.3. Yaprak Örneklerinde Bor Analizi	30
2.3.1. ICP-AES ile bor analizi	30
2.4. Bitki Örneklerinin RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA= Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Analizleri.....	31
2.4.1. DNA izolasyonu	31
2.4.1.1. Qiagen Dneasy plant mini kit protokolü.....	32
2.4.1.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	33
2.4.2. RAPD-PCR analizleri	33
2.4.2.1. DNA amplifikasyon koşulları.....	33
2.4.2.2. PCR döngü programı.....	34
2.4.2.3. Primerler.....	34

2.4.2.4.	<i>RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi</i>	36
2.4.2.5.	<i>RAPD bant profillerinin değerlendirilmesi</i>	36
3.	BULGULAR VE İRDELEME	38
3.1.	Perlitte Çimlendirme ve Çim Bitkilerine Ait Bulgular	38
3.1.1.	DNA izolasyonu	39
3.1.1.1.	<i>Perlitte yetiştirilen bitkiciklerde RAPD-PCR analizi</i>	41
3.2.	Saksıda Yetiştirilen Bitkilere Ait Bulgular	55
3.2.1.	Bitki büyüme biyomarkırları	57
3.2.1.1.	<i>Bitki boyu</i>	57
3.2.1.2.	<i>Kök boyu</i>	58
3.2.1.3.	<i>Bitki yaş ağırlığı</i>	60
3.2.1.4.	<i>Bitki kuru ağırlığı</i>	61
3.2.1.5.	<i>Kök yaş ağırlığı</i>	62
3.2.1.6.	<i>Kök kuru ağırlığı</i>	63
3.2.2.	Bor analizi bulguları	63
3.2.3.	Saksıda yetiştirilen bitkilerde RAPD analizi bulguları.....	64
3.2.3.1.	<i>Saksıda yetiştirilen bitkilerde DNA izolasyonu</i>	64
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	86
EKLER	94
Ek A	94
ÖZGEÇMİŞ	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı bitkilerin bor gereksinimleri	4
Çizelge 2.1. Bor analizi için bitki örneklerinin kül fırınında yakma programı.....	31
Çizelge 2.2. RAPD analizlerinde kullanılan 48 primerin (sentetik dekamer oligonükleotidi) adları ve baz dizilişleri	34
Çizelge 3.1. 20 günlük bitkiciklerden izole edilen DNA'ların uygulamalara göre numaralandırılması ve DNA'ların saflıkları	40
Çizelge 3.2. Perlitte yetiştirilen bitkiciklere yapılan RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri	42
Çizelge 3.3. Perlitte yetiştirilen farklı konsantrasyonlarda H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalı 20 günlük bitkilerin RAPD analizi sonucunda ulaşılan benzerlik indeksi	54
Çizelge 3.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki boyu (cm) (Ortalama ± Standart hata) .	58
Çizelge 3.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök boyu (cm) (Ortalama ± Standart hata) ..	59
Çizelge 3.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki yaş ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata).....	60
Çizelge 3.7. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki kuru ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata).....	61
Çizelge 3.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök yaş ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata).....	62
Çizelge 3.9. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök kuru ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata).....	63
Çizelge 3.10. Bitki örneklerinde bor içeriği (ICP-AES cihazı ile yapılan analiz bulguları) (ppb) (Ortalama ± Standart hata).....	64
Çizelge 3.11. Bitkiciklerden izole edilen DNA'ların uygulamalara göre numaralandırılması ve DNA'ların saflıkları	65
Çizelge 3.12. Saksıda yetiştirilen bitki örneklerine ait RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri	67
Çizelge 3.13. Saksıda yetiştirilen farklı konsantrasyonlarda H ₃ BO ₃ ve 24-epiBL uygulamalı 20 günlük bitkilerin RAPD analizi sonucunda ulaşılan benzerlik indeksi	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. BR'lerin bitki gelişimindeki etkileri.....	6
Şekil 1.2. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi	10
Şekil 3.1. Tohumların ekiminden 7 gün sonra çimlenmeden bir görünüm.....	38
Şekil 3.2. Tohumların ekiminden 8 gün sonraki bir görünüm	38
Şekil 3.3. Tohum ekiminden 11 gün sonra bitkiciklerin görünümü	39
Şekil 3.4. H ₃ BO ₃ uygulaması ve 24- epiBL uygulaması yapılmış olan bitkilerin görünümü (Tohum ekiminden 18 gün sonra).....	39
Şekil 3.5. Perlitte yetiştirilen bitkiciklerden izole edilen DNA'lar	41
Şekil 3.6. OPA-2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 3.7. OPB-5 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 3.8. OPB-10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 3.9. OPM-1 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 3.10. OPM-12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	49
Şekil 3.11. OPM-13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	49
Şekil 3.12. OPW-5 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	50
Şekil 3.13. OPW-7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	51
Şekil 3.14. Perlitte çimlendirilen 20 günlük bitkilerin RAPD analizi dendogramı ...	55
Şekil 3.15. Tohumların ekiminden 5 gün sonraki çimlenme durumu.....	56
Şekil 3.16. Tohumların ekiminden 8 gün sonra bitkiciklerin görünümü	56
Şekil 3.17. Saksıda torfta yetiştirilen bitkilerden izole edilen DNA'lar	66
Şekil 3.18. OPA-2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	71
Şekil 3.19. OPB-10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	72
Şekil 3.20. OPM-11 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	73

Şekil 3.21. OPM-13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	74
Şekil 3.22. OPW-7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	76
Şekil 3.23. Saksıda torfta yetiştirilen 20 günlük bitkilerin RAPD analizi dendogramı	80

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

B	Bor
H ₃ BO ₃	Borik Asit
B(OH) ₄	Borat
N	Azot
P	Fosfor
K	Potasyum
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
Cu	Bakır
Fe	Demir
Mn	Mangan
Zn	Çinko
Ni	Nikel
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
Hg	Civa
Na	Sodyum
SA	Salisilik asit
NaCl	Tuz
Ca(NO ₃) ₂	Kalsiyum Nitrat
KNO ₃	Potasyum Nitrat
KH ₂ PO ₄	Mono Potasyum Fosfat
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MnCl ₂	Mangan klörür
ZnSO ₄	Çinko Sülfat
CuSO ₄	Bakır Sülfat
Fe-EDTA	Demir-EDTA
NaMoO ₄	Sodyum Molibdat
MgCl ₂	Magnezyum Klörür
dNTP	Deoksiribonükleotit tri fosfat
ddH ₂ O	Ultra Saf Su
TBE	Tris Borik Asit EDTA

BR	Brassinosteroid
BL	Brassinolid
24-epiBL	24-epibrassinolid
28-homoBL	28-homobrassinolid
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
GR	Glutasyon Redüktaz
MDA	Malondialdehit
DHAR	Dehidroaskorbat Redüktaz
APX	Askorbat Peroksidaz
2,4-D	2,4- dichlorophenoxyacetic acid
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic DNA)
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
ISSR	Kısa Dizi Tekrarları Arası (Inter Simple Sequence Repeat)
SRAP	Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (Sequence Related Amplified Polymorphism)
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
SSR	Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeat)
ICP	İndüktif Eşleşmiş Plazma (Inductively coupled plasma)
µM	Mikro molar
ppm	Milyonda bir (parts per million)
bp	Baz çifti (base pairs)
kb	Kilo baz
cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
g	Gram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre

dk	Dakika
rpm	Dakikada dönme hızı (Rotation per minutes)

1.GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Mısır, binlerce yıldan beri tarımı yapılan birkaç ender bitkiden biridir. Anavatanı Amerika kıtası olup buradan Dünya'nın her yerine yayıldığı bilinmektedir. Ülkemize girişi ise, kuzey Afrika üzerinden olmuştur. Bu bitkiye, ülkemizde mısır adının verilmiş olması, bu bitkinin Mısır ve Suriye üzerinden girdiğinin bir göstergesidir (Babaoğlu, 2005; Özcan, 2009).

Mısır Poaceae familyasına ait bir bitki olmasına karşın bu familya içerisinde çiçeklenme biçimi (monoik olması) bakımından diğer bitkilerden farklılık göstermektedir. 1900'lerin ortalarından günümüze kadar morfolojisi, fizyolojisi, genetiği ve evrimi detaylı olarak araştırılan mısır bitkisi, son yıllarda modern dünyanın gıda bitkisi ve çok yönlü kullanılan en önemli dane ürünü haline gelmiştir (Buckler ve Stevens, 2005; Özcan, 2009; Karadavut vd., 2011).

Bitkilerde büyüme, gelişme ve metabolizmayı etkileyen ya da engelleyen durumlar olarak da tanımlayabileceğimiz stres, tarımsal üretimi tehdit eden önemli unsurlardan biridir. Stres faktörleri, bitkiler üzerine etkilerini çoğunlukla, eşzamanlı ve kombine şekilde göstermektedirler. Stres faktörleri, orijinlerine göre abiyotik (soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve toprakta mineral eksikliği/fazlalığı) ve biyotik (virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlar) stres faktörleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Yıldız ve Terzi, 2007; Yılmaz vd., 2011).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Bunu %20 ile mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk pay alırken, yalnızca

%10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Bitkisel üretimde verim ve kalite, bitkilerin mineral konsantrasyonlarıyla yakından ilişkili olup, en iyi verimin alınması için, bitki besin elementlerinin de bitkide yeterli düzeylerde bulunması gerekmektedir. Bor (B), topraktaki toksik olan ve eksiklik gözlenen konsantrasyonları birbirine çok yakın olan besin elementlerinden birisidir. Bu nedenle topraktaki yeterli bor düzeyini korumak son derece güç olup yakın takip gerektirir (Halloran ve Kasım, 2002).

Toprakta bor (B); kayalar, mineraller, killer ve demir ile alüminyumun su oksitlerinin yüzeylerinde adsorbe edilmiş şekilde, organik maddeye bağlanmış olarak veya toprak çözeltisinde bağımsız, iyonize olmamış borik asit (H_3BO_3) ve borat ($B(OH)_4$) iyonları şeklinde bulunmaktadır (Nable vd., 1997). Tarımda yaygın olarak kullanılan bor kaynakları temel olarak iki ana gruba ayrılır. Birinci grubu hem çözelti hem de katı olarak uygulanabilen rafine ürünler oluştururken, maden cevherleri ikinci grubu oluştururlar. Sulu bor, boraks ve borik aside göre daha hızlı çözünmesi nedeniyle sulu bordan sıvı gübreler hazırlanabilir. Öğütülmüş üleksit ve kolemanit cevherleri genellikle azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) gübrelere boratlaştırılmasında kullanılır. Bunlarla birlikte bazı atık ürünler de borca zenginleştirilmekte ve tarımda gübre olarak kullanılabilir (Nable vd., 1997; Uygan ve Çetin, 2004). Borun yüksek bitkiler için mutlak gerekli bitki besin elementi olduğu yaklaşık 76 yıl önce belirlenmesine rağmen, bitki bünyesindeki fonksiyonları tam olarak anlaşılmış değildir (Taban ve Erdal, 2000; Tabur ve Demir, 2008). Mevcut bilgilere göre bor, bitki bünyesinde karbohidrat ve protein metabolizmasında, doku farklılaşmasında, oksin ve fenol metabolizmasında, membran permeabilitesinde, polen çimlenmesinde ve polen tüpü büyümesinde önemli roller üstlenmektedir. Borun bitkide yukarı doğru taşınmasında transpirasyonun etkili olduğu saptanmıştır (Tabur ve Demir, 2008).

Borun bitkiler tarafından alınabilirliği, toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir (Goldberg, 1997). Bu faktörlerden biri olan toprak pH'sının artması bitkiler tarafından bor alımını azaltır (Güneş vd., 2003; Kızılgöz ve Özberk, 2005).

Genel olarak organik madde kapsamı yüksek olan topraklarda bor noksanlığı daha az görülmektedir. Bu toprakların yarayışlı bor kapsamı da yüksektir (Goldberg, 1997).

Bor'un bitkiye aktif veya pasif yolla alınması ile ilgili olarak birçok tartışma konusu vardır. Bitkiler tarafından bor'un alınımının kök plazma membranlarında, sonradan oluşan cis-diol komplekslerinin ve H_3BO_3 'in kolaylıkla geçişini sağlayan pasif bir işleme dayandığı bildirilmiştir (Shelp, 1993; Hu ve Brown, 1994). Bu nedenle, bor absorpsiyonu üzerinde, öncelikli olarak bor'un alındığı ortamın bor konsantrasyonuyla beraber aynı zamanda bitkilerin transpirasyon kapasiteleri de etkilidir (Marschner, 1995; Güneş vd., 2003).

Borun en önemli görevlerinden biri hücre duvarında bulunmasıdır. Bor ile hücre duvarındaki pektik bileşikler arasındaki ilişki ilk defa 1933'te öne sürülmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalar bitkinin bor ihtiyacı ile hücre duvarının pektin içeriği arasındaki bağlantıyı doğrulamıştır (Hu vd., 1996). Köklerden pasif alınımında, transpirasyona bağlı olarak alınan bor, ksilem iletim boruları ile bitkinin tepe noktalarına doğru taşınmaktadır. Bu durumda bor'un alınması ve iletim borularında taşınması bitkinin transpirasyona bağlı su alımı ile yakından ilişkilidir (Hu ve Brown, 1994). Yoğun deneysel çalışmalar, benzer çevresel koşullar altında yetiştirilen bitkilerde bile bor alınımının bitki türlerine göre büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur (Çizelge1.1.).

Bor taşınımının bitki türleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bor'un esas itibariyle ksilemde taşındığı gösterilmiştir. Bor taşınmasının daha çok transpirasyona bağlı olması, yaprak uçları ve kenarlarında bor birikiminin nedenini de açıklamaktadır. Bor'un yapraklarda bu şekilde birikmesi toksik etkilere neden olabilmektedir. Bazı bitkiler bor akümüülasyonunun neden olacağı toksik etkilerden korunmak ve tuzlu ortamlarda tuzun bitkilerden atılmasında da kullanılan gutasyon damlaları içinde bor'u dışarı atma mekanizmasını geliştirmişlerdir (Taban ve Erdal, 2000). Subedi vd. (1999), bitkilerin topraktan aldığı bor'un %68'inin yapraklarda, %16'sının köklerde %6'sının gövdede ve %10'unun meyvede bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bor toksisitesinde yaşlı yapraklarda yaprak uçları sararır ve nekrozlar oluşur. Yapraklar yanık bir görünüm alır ve erken dökülür. Ölü dokuları içeren lekeler giderek genişler ve yaprakların dökülmesine neden olur (Kaçar ve Katkat, 2007).

Çizelge 0.1. Bazı bitkilerin bor gereksinimleri (Kacar ve Katkat, 1998)

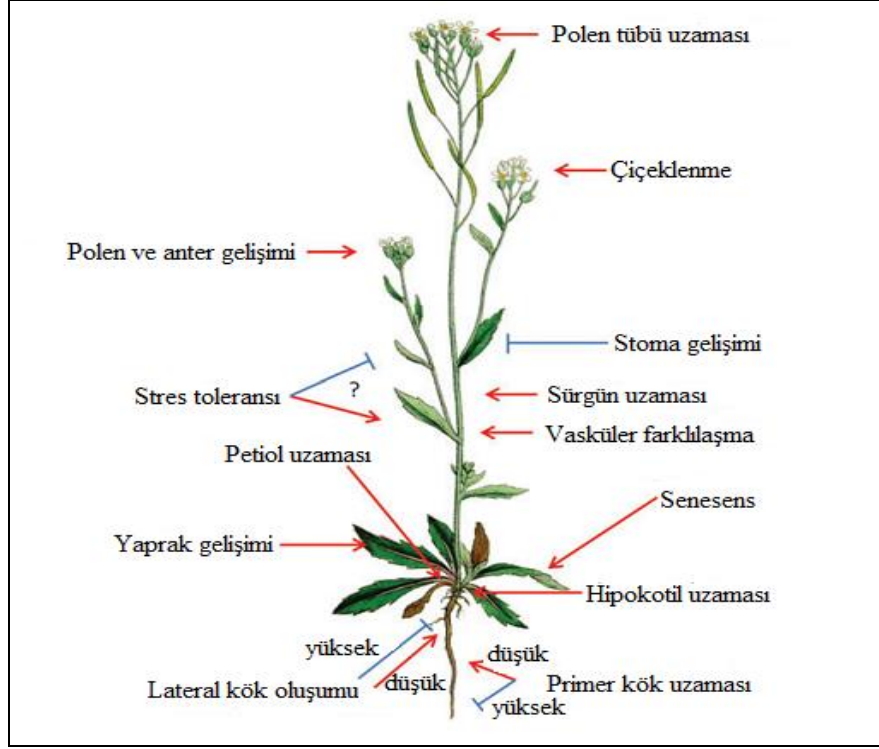
Bor gereksinimi az olan bitkiler	Bor gereksinimi orta olan bitkiler	Bor gereksinimi fazla olan bitkiler
Buğday	Çayır üçgülü	Elma
Yulaf	Kırmızı üçgül	Yonca
Arpa	Ak üçgül	Kırmızı pancar
Kara buğday	Taş yoncası	Şeker pancarı
Soya fasulyesi	Tütün	Şalgam
Bezelye	Domates	Lahana
Yeşil fasulye	Mısır	Karnabahar
Lima fasulyesi	Marul	Kuşkonmaz
Patates	Şeftali	Ayçiçeği
Çilek	Kiraz	Turp
Ahududu	Zeytin	Kereviz
Yassı salkım otu	Pamuk	Haşhaş
Brom otu	Tatlı patates	
Keten	Yer fıstığı	
	Havuç	
	Soğan	
	Armut	

Tarımda bitki büyüme düzenleyicilerinin, bitki gelişimi, verimliliği ve kalitesini arttırmasının yanı sıra, son yıllarda pek çok metabolik olayı olumsuz etkileyen stres faktörlerine karşı kullanımından da söz edilmektedir. Bitki büyüme düzenleyicileri, bitki bünyesinde üretildikleri gibi, sentetik olarak da elde edilebilirler. Büyüme düzenleyicilerinin bir kısmı bitkilerde uyarıcı veya teşvik edici etki gösterirken bir kısımda büyümeyi kısıtlayıcı veya yavaşlatıcı hatta durdurucu etki gösterirler. Gelişmeyi teşvik edici ve engelleyici maddeleri birbirinden kesin sınırlarla ayırmak pek mümkün değildir. Çünkü bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesinin değişik devrelerinde ve değişik bitki organlarına değişik konsantrasyonlarda uygulandıklarında farklı etkiler gösterebilmektedir (Gülelçin, 2008). Bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olan çevresel stresler, endojen bitki büyüme düzenleyicilerinin seviyelerini azaltabilmekte veya degradasyonuna neden olabilmektedir. Bununla birlikte çevresel stres şartlarında

bitki büyüme düzenleyicilerinin tohum veya bitkiye ekzojen uygulanması, hem endojen hormon seviyesini dengeleyebilmekte hem de stresin olumsuz etkilerini azaltabilmektedir. Doğal ve sentetik hormonların ekzojen uygulaması ile bitkilerde çeşitli abiyotik streslere karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Vladimir vd., 2000; Ashaf vd., 2010). Behnamnia vd. (2009), aynı şekilde stres koşullarında hücrelerin kendi endojen moleküler sistemlerini devreye sokarak veya çeşitli bileşiklerin ekzojen olarak uygulanması ile stresten kendilerini koruyabildiklerini belirtmişlerdir. Antioksidatif özelliğe sahip olan bu bileşiklerin önde gelenlerinden biri de brassinosteroidlerdir.

Bitki büyümesini yüksek oranda teşvik edici özellik gösteren ve yeni bir bitki hormonu grubunu oluşturan brassinosteroid (BR)'lerin keşfi, 1979 yılında Grove ve arkadaşları tarafından kolza (*Brassica napus*) bitkisinin polenlerinden brassinolidin [(22R, 23R, 24S)-2 α , 3 α ,22,23-tetrahidroksi-24-metil- β -homo-7-oksa-5 α -koleston-6-on)] izole edilmesiyle gerçekleşmiştir. Takip eden yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda 44 farklı bitkide tespit edilen BR'lerin çok düşük konsantrasyonda etkili olabildikleri bildirilmiştir (Rao vd., 2002). Tüm BR'ler daima biyolojik olarak aktif değildir. BL (brassinolid), 24-epiBL (24-epibrassinolid) ve 28-homoBL (28-homobrassinolid) en aktif BR'lerdir ve fizyolojik çalışmalarda yaygın kullanılmaktadır (Ismaili vd., 2012).

BR'lerin bitki gelişimindeki başlıca etkileri; hücre bölünmesi ve genişlemesi, hücresel farklılaşma, lateral kök gelişimi, vasküler farklılaşma, polen tüpü gelişimi, apikal dominansinin sürdürülmesi, çiçeklenme, senesens ve stres toleransının artırılması olarak sıralanabilir (Surgun vd., 2012) (Şekil 1.1.) (Çizelge 1.2.).



Şekil 0.1. BR'lerin bitki gelişimindeki etkileri (Yang vd., 2011) (Kırmızı oklar gelişim üzerine indükleyici etkiyi, mavi oklar ise engelleyici etkiyi göstermektedir. Düşük: BR'nin düşük konsantrasyonunu, yüksek: ise yüksek konsantrasyonunu belirtmektedir.)

Çizelge 1.2. Bitkilerde BR'lerin fizyolojik etkileri (Yokota, 1997)

Hücre düzeyi	Tüm Bitki Düzeyi
* Uzama ve bölünmenin teşviki	* Büyümenin teşviki
* Hormonal dengenin sağlanması	* Döllenmenin arttırılması
* Protein ve nükleik asit sentez aktivasyonu	* Vejetatif gelişim periyodunun kısaltılması
* Enzim aktivitesinin artması ve H ⁺ pompası aktivitesinin düzenlenmesi	* Meyve kalitesi ve boyutunun arttırılması
* Membran bileşimi ve doymuş yağ asiti kompozisyonunu etkileme	* Meyve kalitesi ve besinsel komponentlerin içeriğini etkileme
* Fotosentetik kapasitenin arttırılması ve ürünlerin translokasyonu	* Uygun olmayan çevresel faktörler, stres ve hastalıklara dayanıklılığın arttırılması
	* Ürün verimliliğinin arttırılması

Brassinosteroidlerin en önemli etkilerinden biri de çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı bitkilerde toleransı arttırmasıdır. Brassinosteroid kullanımının düşük ve yüksek ısıya, kuraklığa toleransı arttırdığı gibi bitki gelişiminde mineral stresinin neden olduğu inhibitör etkileri giderdiği de gösterilmiştir (Rao vd., 2002; Peleg ve Blumwald, 2011).

BR'lerin pek çok çalışmada bitkilere uygulanması sonucu sitolojik ve fizyolojik etkileri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Brassinosteroid kullanımının *Petunia hybrida*'da yaprak protoplast hücrelerinin bölünme hızını arttırdığı (Oh ve Clouse, 1998), Çin lahanası protoplastlarında hücre bölünmesini aktive ettiği (Nakajima, vd., 1996), Soya fasulyesi epikotil hücrelerinde hücre uzamasını teşvik ettiği (Zurek vd., 1994), *Eucalyptus camaldulensis* tohumlarında çimlenme oranını arttırdığı (Sasse, vd., 1995), ABA'nın inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı (Steber ve McCourt, 2001), tuz stresi altında *Oryza sativa*'da tohum çimlenmesi ve fide gelişimini arttırdığı (Anuradha ve Rao, 2001), tuzluluk altındaki *Oryza sativa* bitkisinde Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak bitkinin savunma sistemini harekete geçirdiğini (N'ñez vd., 2003), arpada primer kök sistemi gelişimini ve mitotik aktiviteyi arttırdığı (Kartal vd., 2009), *Triticum aestivum*'da ise bitki biyokütlesini arttırdığı (Shahbaz ve Ashraf, 2007) rapor edilmiştir.

Popüler bilimin moleküler genetiğe yöneldiği şu günlerde, bitkilerde oluşan abiyotik ve biyotik stresin ve bu stres faktörlerini iyileştirici biyomoleküllerin bitkide DNA düzeyinde etkilerini belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Moleküler çalışmalar için yüksek kalite ve miktarda DNA elde edilmesi önemlidir ve genellikle de zordur. DNA izolasyonundaki başarı, elde edilen DNA miktarı ve kullanılabilirliğine (restriksiyon, polimeraz ve ligaz gibi enzimlerle kullanım kolaylığına) bağlıdır (Scarafani ve Duranti, 2001).

1985 yılında Kary B. Mullis tarafından, nükleik asit dizilerinin değişik bir yöntem olan ve mevcut yöntemlerin duyarlılığının artırılmasından çok DNA veya RNA dizilerinin sayısal olarak artırılmasına dayanan, dolayısıyla mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmiştir (Scarafani ve Duranti, 2001).

PCR'in temeli; DNA denatürasyonu (DNA ipliklerinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması), primerlerin birleşmesi ve DNA polimerizasyonu ilkelerine dayanır. Çoğaltılması istenen DNA bölgesinin her iki ucunda belli sayıda diziyi tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini de tamamlayıcı olan bir başlatıcı oligonükleotid (primer) çifti zıt ve birbirleriyle çakışan yönlerde ilerleyen DNA sentezinin çok sayıda döngüde gerçekleştirilmesinde kullanılır. Her döngüde çift sarmallı DNA, iki yeni çift sarmallı molekülün yapılmasını sağlar. Bu da teorik olarak her döngüde DNA dizilerinin sayısal olarak ikiye katlanmasına yol açar. Böylece bir sonraki PCR devri için kalıp sayısı da iki katına çıkmış olur. İlk devir sabit bir 5' ucu ve değişken bir 3' ucu olan bir DNA sentezlenmesi ile sonuçlanır. Daha sonra sentezlenen DNA'nın her iki ucu da sabitlenir. Çünkü bu uçlar ya primer sekanslarından elde edilir ya da primerler tarafından belirlenir. PCR ile orijinal kalıbın her iki molekülünden 2ⁿ sayıda yeni DNA kopyası üretilir (Böylece DNA kopyalarının sayısı her döngüde eksponensiyel olarak artar). 30 döngü sonunda tek bir DNA molekülünün yaklaşık 2.10⁹ kez amplifikasyonu sağlanır. Her DNA molekülü, 20 devirde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü oluşturabilmektedir. Verim oranı ise deney başına her devirde yaklaşık %85'dir (Saiki vd., 1985; Becerril vd., 2001).

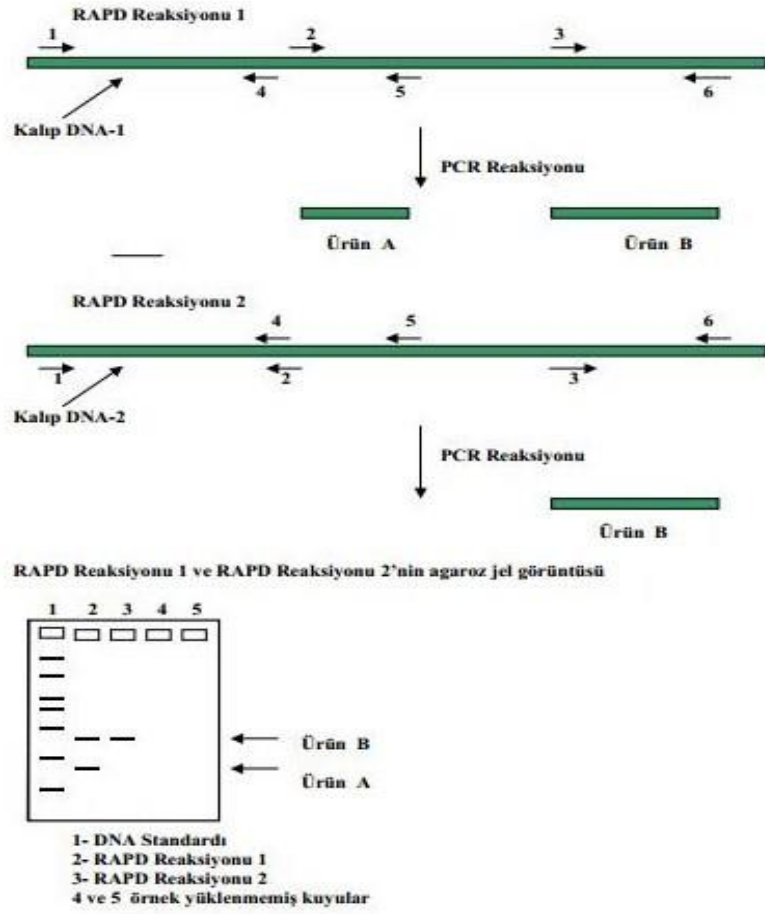
PCR teknolojisinin keşfinden sonra DNA polimorfizmini ortaya çıkarmak için hibridizasyona dayalı moleküler markörler (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism=Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) ve PCR'a dayalı moleküler markörler (RAPD: Randomly Amplified Polimorphic DNA=Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, SNP: Single Nucleotide Polymorphism=Tek Nükleotit Polimorfizmi, ISSR: Inter Simple Sequence Repeat=Kısa Dizi Tekrarları Arası, SRAP: Sequence Related Amplified Polymorphism=Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism=Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi ve SSR: Simple Sequence Repeat=Basit Dizi Tekrarları) geliştirilmiştir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

RAPD analizi, avantajları nedeniyle, prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, genotoksisite ölçümünde, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen

lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın, 2004; Akgöl ve Rencüzoğulları, 2013).

RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile amplifikasyon (çoğaltma) yapmasıdır (Aydın, 2004). Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılarda (1-10 veya daha fazla) DNA parçacıklarını çoğaltma potansiyeline sahiptir. Diğer bir deyişle farklı primerle farklı RAPD polimorfizmlerini üretmektedir (Devrim ve Kaya, 2006). Tekniğin devamında amplifikasyon sonucunda oluşan DNA ürünü, radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve amplifikasyon ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğu ile sonuçlar değerlendirilmektedir (Şekil 1.2) (Aydın, 2004).

Genetik hasarı belirlemede de kullanılan bu metot basit, hassas ve etkilidir. Hedef genom veya kullanılan primerler hakkında bilgi gerekmeksizin gelişi güzel amplifiye edilen bant profili avantajlı bir şekilde elde edilebilir. Elektroforetik olarak gözlemlendiğinde bant profillerindeki değişikliklerin nedeni, genetik materyalde oluşan hasar sonucu primer bağlanma alanlarındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Akgöl ve Rencüzoğulları, 2013).



Şekil 0.2. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi (Aydın, 2004)

RAPD-1, RAPD-2 Reaksiyonları bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır.

- Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerin kopyalarıdır
- Okların yönü DNA sentez yönünü belirlemektedir
- Sayılar kalıp DNA'da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir

1. RAPD reaksiyonunda 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin

çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin

çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

1. RAPD reaksiyonunda sadece 3 ve 6 pozisyonlarıarsındaki bölgedeki DNA dizisinin

çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2'ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenmektedir.

Bor stresinin bitkilerde birçok morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olduğu brassinosteroidlerin ise çeşitli stres faktörlerinin olumsuz etkilerini iyileştirici etkisinin olduğu belirtilmektedir. Mısır bitkisinde bor stresine karşı yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Brassinosteroidlerin de farklı bitkilere uygulamaları ile çeşitli stres faktörleri üzerine etkisi araştırılmaktadır. Yapılan literatür taramalarında mısır bitkisinde bor stresine karşı brassinosteroidlerin etkisini araştıran hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez kapsamında, *Zea mays* (Arifiye çeşidi) bitkisinde bor toksisitesini ve 24-epiBL'in ekzojen kullanımının bu toksisite üzerine etkisini RAPD yöntemi ile araştırmak amaçlanmıştır.

1.2. Kaynak Özetleri

Bor (B), bitkilerin normal gelişmesi ve optimal derecede ürün vermeleri için gerekli bir besin elementidir. Bitkilerde borun, çiçek açmaya, polen dölllenmesine, aktif tuz absorpsiyonuna, hücre bölünmesine, azot metabolizmasına, karbonhidrat metabolizmasına, hormon hareket ve etkinliğine, su-bitki ilişkilerine etki ettiği bilinmektedir. Bu önemli elementin fazla miktarda bulunması ise toksik etki göstererek bitkilerin gelişimlerinin gecikmesine ya da ölümüne neden olmaktadır (Uygan ve Çetin, 2004).

Doğal bitki steroid bileşiklerinden meydana gelen bir hormon grubu olan BR'lerin, biyolojik aktivitede oldukça önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Çünkü BR'lerin bitkinin birçok tarımsal özelliklerini, tohum verimini ve stres toleransını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca BR biyosentezinin genetik manipülasyona etkisi, bitki

metabolizmasında anlamlı ölçüde artan ürün verimleri ve çevresel streslere karşı bitkilerin korunmasında eşsiz fırsatlar sunmaktadır (Divi ve Krishna, 2009).

1.2.1. Mısır ve farklı bitkilerde bor stresi ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar

Güneş vd. (2000), Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen mısır çeşitlerinin bor toksisitesine duyarlılıklarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Sera koşullarında, toprak ortamında farklı B dozlarının etkisini sekiz farklı mısır çeşidinde (Furio, Riogrande, Sele, DK 743, Helix, Missouri, Betor ve Poker) araştırmışlardır. Mısır çeşitlerine 10 ve 30 ppm borik asit uygulanmıştır. Mısırdaki bor duyarlılıkları bakımından çeşitler arasında önemli farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Tüm çeşitlerde kontrole göre artan bor dozlarında çeşitlerin yaş ve kuru ağırlıkları artmıştır.

Bastias vd. (2004) , mısır bitkisine 100 ve 430 mM NaCl ile 20 ve 40 ppm H₃BO₃ uygulayarak bu dozların mısırdaki oluşturacağı toksisiteyi tespit etmeyi amaçlamışlardır. Kontrol bitkilerinde (NaCl uygulamasız) yaprak alanını en çok arttıran H₃BO₃ dozu 20 mg kg⁻¹ olmuştur. 100 mM ve 430 mM NaCl uygulanan bitkilerde yaprak alanını en çok arttıran B dozu ise 40 mg kg⁻¹ olmuştur. Tüm NaCl uygulamalı bitkilerde bitki boyu ve kuru ağırlığını en çok arttıran B dozu 40 mg kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Tuzun etkisine karşı borun etkisi bir toksisite oluşturmamıştır aksine yaprak alanını, bitki boyunu ve bitki kuru ağırlığını arttırarak iyileştirici bir etkiye sebep olmuştur.

Mısırdaki bor eksikliğinin generatif ve vejetatif organlar üzerine etkisi ile erkek ve dişi çiçeklerin morfolojisi üzerine etkilerini araştırmayı amaçlayan bir ekip, bitkilere 20 ppm borik asit uygulamışlar ve borik asit uygulamalı bitkilerde kuru madde miktarı, B içeriği kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Mısır bitkisinde 20 ppm borik asit’in hem generatif ve vejetatif organların gelişimini hem de erkek ve dişi çiçek morfolojisini olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir (Lordkaew vd., 2011).

Esim vd. (2012), 11-15 günlük mısır fidelerine 2 ve/veya 6 gün 2 ve 4 mM H₃BO₃ uygulamışlardır. Kök uzunluğu, MDA, H₂O₂, SOD, CAT ve POX parametreleri incelenmiştir. Kök uzunluğu artan bor dozlarıyla azalmıştır. MDA, H₂O₂, SOD, CAT artan bor dozlarıyla orantılı olarak artarken POX azalmıştır.

Palta ve Gezgin (2011), Türkiye’de Orta Anadolu koşullarında yaygın olarak yetiştirilen 13 farklı melez mısır çeşitinin bor toksisitesine duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bitkilere sera koşullarında kontrol, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 40 ppm borik asit uygulanmıştır ve toprağa uygulanan borun bitkiye etkisi kontrolden 2.5 ppm dozuna kadar düzensiz olmuş ancak 5 ppm dozundan itibaren kuru madde miktarı azalmıştır.

Aydın vd. (2003), farklı dozlardaki bor (B) ve fosforun (P) mısırın kuru madde miktarı ve mineral içeriğine etkisini araştırmışlardır. Deneme saksılarına kontrol, 0.5, 1, 2 ve 4 ppm borik asit ve 20, 40 ve 80 ppm fosfor uygulanmıştır. Kontrole göre 0.5 ve 1 ppm borik asit dozlarında çok düşük bir kuru madde artışı söz konusu iken, 2 ppm B dozunda %7.8’lik ve 4 ppm borik asit dozunda da yaklaşık %40.2’lik bir kuru madde azalması olmuştur. Uygulanan B ve P dozu arttıkça mısır bitkisinin azot (N), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), ve bakır (Cu) içerikleri genel olarak azalmış, fosfor (P), potasyum (K) ve bor (B) içerikleri artmış, demir (Fe), mangan (Mn) ve çinko (Zn) içerikleri ise kararsız bir değişim göstermiştir. Bor ve fosfor arasındaki interaksiyon ise önemsiz bulunmuştur.

Bagheri vd. (1992), *Pisum sativum*’un farklı çeşitlerinin bor toleransını tespit etmeyi amaçlamışlardır. Bitkilere 10, 20, 30 ve 40 ppm dozlarında borik asit uygulanmıştır. Artan bor dozlarının kuru ağırlık veriminde çeşitler arasında anlamlı farklılıklara neden olduğu bulunmuş ve bor, en toleranslı bitkilerin sürgünlerinde en düşük bulunmuştur.

Bagheri vd. (1994), ıslah programlarında *Pisum sativum*’un farklı çeşitlerin bor toleransına göre uygun seleksiyon kriterlerini tanımlamak için kontrol, 20, 40 ve 60 ppm B uygulaması yapmışlar ve örneklerde bitki kuru ağırlığı ile bor miktarı tespit edilerek bor toksisitesi değerlendirilmiştir. ICP spektroskopisi ile tayin edilen sonuçları artan bor dozlarına paralel olarak borun da bitki bünyesine girdiğini göstermiştir. Bitki kuru ağırlığı ölçümleri ise artan bor dozlarının bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir.

Triticum aestivum x Agropyron elongatum amfiploidinde bor toleransı araştırılmak üzere 25, 50, 75 ve 100 ppm borik asit uygulamaları yapılmıştır. Sonuçta 25 ppm uygulamasında bitki gelişiminde herhangi bir olumsuz etki yok iken borun toksik

etkisini artan konsantrasyonlarda görülmüştür. Bor konsantrasyonu arttıkça bitkinin gelişmesi olumsuz yönde etkilenmiştir (Paull vd., 1991).

Pisum sativum' da bor toleransının genetik modunu araştırmak ve yerel olarak adapte olmuş çeşitlere bu toleransın aktarılma olasılığını değerlendirmeyi amaçlayan Bagheri vd. (1996), bitkilere 60 ve 100 ppm borik asit uygulaması yapmışlardır. Yüksek bor konsantrasyonuna toleranslı olan çeşitler arasında 5 çaprazlama ve bunların resiprogları ile çalışılmıştır. F₂ populasyonlarının bora yanıtında açılımı görmek için F₃ generasyonuna gidilmiştir. Yaprak hasarları görsel olarak belirlenmiştir. Açılma oranları, her lokusta eksik dominantlık ile major gen lokuslarının etkileşimi olmak üzere iki yönde olmuştur. Toleranslı ve duyarlı olarak seçilenler değerlendirildiğinde, duyarlı olanların sürgünlerinde bor konsantrasyonu toleranslılara nazaran daha düşük bulunmuştur.

Torun vd. (2006), 70 makarnalık buğday genotipi ile B toksisitesine karşı genotipik farklılığın boyutunu araştırmak amacıyla, ekstrakte edilebilir B'un 12 mg kg⁻¹ olduğu bir toprakta iki ayrı B dozu uygulayarak (kontrol; 25 mg kg⁻¹ toprak) bir sera çalışması yapmışlardır. 70 makarnalık buğday genotipi örneklerinde kuru ağırlık ve bor konsantrasyonuna bakılmıştır. Genotipler arasında topraktaki B toksisitesine karşı, toksisite belirtilerinin şiddeti ve büyümedeki azalma bakımından büyük bir genotipik varyasyonun olduğu bulunmuştur. Bazı genotiplerin B uygulamasından etkilenmediği ve hatta bu genotiplerde B'un bitki büyümesini teşvik ettiği belirlenmiştir. Buna karşılık bazı genotiplerde B'un etkisi ile büyümede bir azalma görülmüştür. Bu sonuçların genotipler arasında görülen B toleransının, B'un köklerce alınmayarak dışarıda tutulma mekanizması ile ilişkili olmadığını, B'un hücre duvarında tutulması gibi içsel tolerans mekanizmalarının daha kabul edilebilir olduğunu gösterdiğini düşündürmüştür.

Topal vd. (2002), makarnalık (Ç-1252) buğday çeşitinde yapmış oldukları bir araştırmada, farklı B dozlarının (kontrol, 1, 2, 3 kg ha⁻¹) dane verimi, m²'deki başak sayısı, her başaktaki dane sayısı, her başaktaki toplam başakçık sayısı, fertil başakçık sayısı ve steril başakçık sayısı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Artan B dozlarına paralel olarak (2 kg ha⁻¹'a kadar) araştırılan parametreler artış göstermiş, fakat 3 kg ha⁻¹ B dozunda ise bir azalma tespit edilmiştir.

Soylu vd. (2005), kireç oranı yüksek, B noksan olan topraklarda iki yıl süren bir tarla denemesinde 6 makarnalık (Kızıltan-91, Ç-1252, Selçuklu-97, Kunduru-1149, Yılmaz-98 ve Çakmak-79) ve 6 ekmeklik (Kınacı-97, Göksu-99, Türkmen, Bezostaja-1, Gün-91 ve Sultan-95) buğday çeşidinin B uygulamasına (3 kg ha⁻¹) tepkilerini araştırmışlardır. Makarnalık buğdaylar ortalama %9.6, ekmeklik çeşitler ise %10.9 dane verim artışı göstermiştir. Makarnalık buğdaylardan Kızıltan-91 ve Yılmaz-98 B eksikliğine hassas iken Ç-1252 ve Çakmak-79 çeşidinin dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Ekmeklik buğdaylardan ise Gün-91 ve Bezostaja-1 hassas iken Kınacı-97 ve Sultan-95 dirençli olarak tespit edilmiştir.

Atalay vd. (2003), yapmış oldukları çalışmada, makarnalık buğday (Kızıltan-91) ve arpa (Tokak-157/37) in vitro fidelerinin B alım ve dokularda birikim durumlarını araştırmışlardır. Tohumlar 6.2, 18.6, 55.8, 111.6 mg/l H₃BO₃ içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kızıltan-91’de en az B birikimi kontrolde, en çok bor birikimi ise (15.1 µgB/g) 111.6 mg/l H₃BO₃’li ortamdan elde edilmiştir. Tokak-157/37’de ise en düşük B birikimi (0.53 µgB/g) ortamında, en yüksek (17.3 µgB/g) ise 111.6 mg/l H₃BO₃ içeren ortamda olmuştur.

Yorgancılar ve Babaoğlu (2005), makarnalık (*Triticum durum* Desf., Kızıltan-91, Kunduru-1149, Selçuklu-97) ve ekmeklik (*Triticum aestivum* L., Bezostaja-1, Gerek-79, Gün-91) buğday çeşitlerinde farklı B uygulamalarının çimlenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kontrol, 1.08, 3.24, 9.72, 29.16 mg kg⁻¹ borik asit içeren MS besin ortamı ve saksı denemelerinde çimlenme üzerine B dozlarının etkisi her iki şartta da (MS ortamı ve saksıda) önemli bulunmazken, çeşitlerin ve çeşit x bor interaksyonunun etkisi önemli bulunmuştur. Buğdayda çimlenmeyi engelleyecek minimum B seviyesi eşiği olarak 29.16 mg kg⁻¹ B tespit edilmiştir.

Campbell vd. (1998), yüksek B’ a farklı tepkiler verdiği bilinen beş buğday çeşidinin fidelerine yedi farklı B konsantrasyonu da (kontrol, 1.55, 3.1, 4.6, 6.2, 7.7, 9.3 mg l⁻¹ H₃BO₃) uygulayarak kök uzunluklarını ölçmüş ve tolerans indeksini belirlemeye çalışmışlardır. B dozu arttırıldıkça kök uzunluklarında bir azalma meydana gelmiş ve bu durum hassas çeşitlerde daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

Doğan (2012), *Capparis* L. cinsine ait; üç takson (*Capparis spinosa* L. var. *spinosa*, *C. ovata* Desf. var. *palaestina* Zoh., *C. ovata* Desf. var. *herbacea* Willd.) ile *Carthamus* L. cinsine ait iki takson; (*C. tinctorius* L. ve *C. lanatus* L.) olmak üzere

toplam 4 türe bağlı 5 taksona ait tohumlar farklı bor bileşiklerinden (Potasyum tetraborat tetrahidrat 1 mg/l, Amonyum tetraborat tetrahidrat 1 mg/l, Sodyum bor hidrür 1 mg/l, Lityum tetraborat tetrahidrat 100 mg/l, Sodyum tetraborat dekahidrat 100 mg/l) oluşan kontrollü koşullarda çimlendirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, farklı bor bileşiklerinin çimlenme hızı ve çimlenme kabiliyeti üzerine etkilerini tespit etmeyi amaçlamışlardır. Çimlenme yüzdesi, potasyum tetraborat tetrahidratlı ortam dışında gittikçe azalmıştır. Taksonların çimlenme yüzdeleri sırasıyla şöyle sıralanabilir; Potasyum tetraborat tetrahidratlı ortamda; %91, 92, 93, 92 ve 94, Amonyum tetraborat tetrahidratlı ortamda; %66, 88, 69, 73 ve 68, Sodyum bor hidrürlü ortamda; %56, 61, 53, 55 ve 58, Lityum tetraborat tetrahidratlı ortamda; 44, 48, 42, 43 ve 41 arasında değişmiştir, Sodyum tetraborat dekahidratlı ortamda; %26, 28, 24, 26 ve 23 olarak bulunmuştur. Çimlenmeyi en olumsuz etkileyen bor bileşiği Sodyum tetraborat dekahidratlı ortam olmuştur.

1.2.2. Mısır ve farklı bitkilerde bor ve diğer stres faktörlerine karşı brassinosteroidlerin etkisi üzerine yapılmış bazı çalışmalar

Arora vd. (2008), mısırdaki tuz stresi altında büyüme, antioksidan enzim aktivitesi ve lipit peroksidasyonu üzerine 28-homobrassinolid (28-homoBL)'in etkilerini araştırmışlardır. Bitkilere 25, 50, 75 ve 100 mM dozlarında NaCl ve 10^{-7} , 10^{-9} ve 10^{-11} M konsantrasyonlarında 28-homoBL uygulanmıştır. Homobrassinolidin fide gelişimi üzerinde tuzun toksik etkisini azalttığını tespit etmişlerdir. Toksik etkiyi en çok 25 mM tuz uygulamalarında 10^{-11} M homobrassinolid, 50 mM tuz uygulamalarında ise 10^{-9} M homobrassinolid, 75 mM tuz uygulamalarında 10^{-11} M homobrassinolid, 100 mM tuz uygulamalarında 10^{-7} M homobrassinolid azaltmıştır. Sonuç olarak en düşük tuz dozuna (25 mM) 10^{-11} M homobrassinolid uygulaması ve en yüksek tuz dozuna (100 mM) 10^{-7} M homobrassinolid uygulaması tuz stresinin etkilerini azaltmıştır.

Oryza sativa'da tuz stresi altında tohum çimlenmesi ve fide gelişimine brassinosteroidlerin etkisini çalışan Anuradha ve Rao (2001), çeltik bitkisine ayrı ayrı 0.5, 1, 3 μ M dozlarında 24-epibrassinolid (24-epiBL) ve 28-homoBL uygulamışlardır. Hem 24-epiBL hem de 28-homoBL 0.5 μ M ve 1 μ M

konsantrasyonlarında uygulamalı bitkilerde çimlenme ve fide gelişimindeki olumlu etki daha düşük bulunurken 3 μM konsantrasyonda daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Swamy ve Rao (2009), 24-epiBL'nin *Pelargonium graveolens*'de gelişime, fotosenteze ve esansiyel yağ içeriğine etkisini araştırmışlardır. 0.5, 1, 3 μM konsantrasyonlarında 24-epiBL uygulaması yapılmıştır. Sadece 3 μM uygulamalı olan bitkilerde maksimum CO_2 fiksasyonu ve esansiyel yağ içeriğinde artış gözlenmiştir.

Arabidopsis thaliana'da çiçeklenmenin indüklenmesinde hayvan seks hormonlarının (andosteron, andostenedion, progesteron, estrone, estriol, 17β -estradiol) etkisi ve 24-epiBL'nin etkisiyle karşılaştırılarak araştırılmıştır. Hayvan seks hormonları 0.1 ve 1 μM , 24-epiBL ise 0.001, 0.01, 0.1, 1 μM uygulanmıştır. Sonuç olarak hayvan steroid hormonları (0.1 ve 1 μM) generatif gelişimi indüklemiştir fakat aynı dozlarda uygulanan 24-epiBL generatif gelişimi etkilememiştir. 0.001 ve 0.01 μM 24-epiBL uygulamalılarıda ise generatif döneme geçen bitki sayısı azalmıştır (Anna vd., 2003).

Raphanus sativus'da nikel (Ni) iyonu tarafından indüklenen oksidatif stres belirtileri üzerine 24-epiBL'nin etkisini araştırmak amacı ile bitkilere 0.5, 1.0 ve 1.5 mM Ni ve 10^{-11} , 10^{-9} ve 10^{-7} M konsantrasyonda 24-epiBL uygulanmıştır. Kök gelişimini en iyi indükleyen 24-epiBL konsantrasyonu 10^{-9} M olup tüm Ni dozlarına karşı olumlu sonuçlar alınmıştır. Fakat kök gelişiminin indüklendiği istisnai bir konsantrasyon da 10^{-7} M 24-epiBL ve 0.5 mM Ni uygulamalı bitkilerde görülmüştür. Sürgün boyu artışı ve bitkilerin yaş ağırlık miktarını en iyi indükleyen 24-epiBL konsantrasyonları sırasıyla 10^{-9} M ve 10^{-7} M olmuş ve tüm Ni dozlarında olumlu sonuçlar alınmıştır (Indu vd., 2011).

Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'da farklı bor konsantrasyonlarında brassinosteroidlerin anti-stres cevabını keşfetmeyi, aynı zamanda antioksidan enzim aktiviteleri ve oksidatif stres ile mücadele mekanizmalarını tespit etmeyi amaçlamışlardır. Bitkilere 0.5, 1, 2 mM dozlarında bor, 10^{-8} M 28-homoBL uygulanmıştır. Sadece bor uygulamalı bitkilerde artan bor konsantrasyonları bitki gelişimini (kök ve sürgün uzunluğu, kök ve sürgün yaş ağırlığı, kök ve sürgün kuru ağırlığı) olumsuz yönde etkilemiştir. Sadece bor uygulanan ve bor ile brassinosteroid'in beraber uygulandığı bitkiler karşılaştırıldığında brassinosteroidin

her bor konsantrasyonunda bitki gelişimini indüklediği görülmüştür. 28-homoBL'in en yüksek olumlu etkisi bor uygulamasız bitkilerde görülmüştür. En az ise 2 mM bor uygulamalı bitkilerde görülmüştür.

Zea mays L. (mısır) bitkisinde NaCl, salisilik asit (SA) ve 24-epiBL'nin etkileri araştırılmıştır. Denemede kontrol; 60 ve 120 mM NaCl; 10^{-4} M SA; 60 mM NaCl+ 10^{-4} M SA; 120 mM NaCl+ 10^{-4} M SA; 10µM 24-epiBL; 60 mM NaCl+10 µM 24-epiBL ve 120 mM NaCl+10 µM 24-epiBL konsantrasyonlarında uygulamalar yapılmıştır. 24-epiBL uygulaması kontrole kıyasla sürgün boyunda bir artışa sebep olmuştur, bu durum 60 mM NaCl uygulamalı bitkilerde belirgin olarak görülürken 120 mM NaCl uygulamalı bitkilerde bir farklılık göstermemiştir. Yaprak sayısı ise 24-epiBL uygulaması ile tüm dozlarda azalmıştır. 24-epiBL uygulamasının kontrol grubu bitkilere kıyasla yaprak alanında bir artışa neden olduğu gözlenirken, 60 ve 120 mM NaCl uygulamalı bitkilerde yaprak alanını azaltmıştır. 24-epiBL uygulamasının bitki yaş ve kuru ağırlığını tüm dozlarda arttırdığı gözlenmiştir. 24-epiBL tüm uygulamalarda bitkilerdeki klorofil-a miktarını azaltırken, klorofil-b ve karotenoid miktarını kontrole nazaran oldukça arttırmıştır ve 60 mM NaCl uygulamalı bitkilerde klorofil-b ve karotenoid miktarında artış gözlenirken, 120 mM NaCl uygulamalı bitkilerde bir azalma tespit edilmiştir. 24-epiBL uygulaması ile tüm dozlarda prolin içeriği artmıştır (Agami, 2013).

Zea mays L. bitkisine farklı dozlarda Mn uygulanarak oluşturulan stres üzerine 24-epiBL'nin etkileri Hai-hua vd., (2009) tarafından araştırılmıştır. Bitkilere 150, 250, 350, 450, 550, 650, 750 mg kg⁻¹ dozlarında mangan (Mn) ve 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.3 mg l⁻¹ dozlarında 24-epiBL uygulanmıştır. LOX, SOD, MDA, APX, DHAR ve GR analizleri yapılmıştır ve tüm konsantrasyonlarda uygulanan 24-epiBL'in klorofil içeriği, net fotosentez oranı ve floresan klorofil miktarını arttırdığı tespit edilmiştir.

1.2.3. Mısırdaki ve farklı bitkilerde genotoksisiteyi belirlemek üzere RAPD çalışmaları

Verbascum speciosum'un metanol ekstraktının *Zea mays* üzerine genotoksik etkisi RAPD ile araştırılmıştır. Aynı zamanda mitotik indeks ve kromozom anomalileri de tespit edilerek sonuçları desteklemek amaçlanmıştır. *Verbascum speciosum*'un kök,

gövde ve yapraklarından elde edilen ekstraktlar %3.3, %5, %10 konsantrasyonlarında mısır bitkisine uygulanmıştır. En düşük mitotik aktivite %10 konsantrasyon uygulamalı bitkilerde görülmüştür. Hemen hemen tüm uygulama konsantrasyonlarında kontrole göre daha yüksek kromozom anomalilerine rastlanmıştır ve ekstrakt konsantrasyonu arttıkça kromozom anomalileri de artmıştır. Bant yoğunluğu, bantların varlığı ya da kaybı ve yeni bantların gözlenmesi, mısır bitkisine farklı dozlarda uygulanan ekstraktın DNA'da hasara sebep olduğu sonucuna götürmüştür. %3.3 ve %5 konsantrasyonunda uygulamalı bitkilerin yaprak, kök ve gövde örneklerinde bant yoğunluğunda bir artış ağırlıklı olarak görülmüştür. Farklı RAPD profilleri RAPD analizinin allelokimyasal genotoksik etkilerin saptanması için uygun bir belirteç deneyi olduğunu göstermiştir (Sunar vd. 2009).

Aksakal vd. (2012), mısır fideleri üzerine herbisit 2.4- dichlorophenoxyacetic acid (2.4-D)'in genotoksik etkisini RAPD tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Mısır fidelerine 0.5, 1, 1.5 ve 2 ppm 2.4-D uygulanmıştır. RAPD'de 16 oligonükleotid primer kullanılmıştır. Sonuç olarak en çok polimorfik bant 6 primerde görülmüştür. Tüm primerlerin genomik şablon stabilitesi (GTS) oluşturulduğunda artan 2.4-D konsantrasyonlarında genotoksik etkinin de arttığı gözlenmiştir.

Wan Liu vd. (2005), *Hordeum vulgare*'ye farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) uygulamışlardır. RAPD tekniğini kullanarak Cd tarafından indüklenen DNA hasarının tespit edilmesi ve laboratuvar ortamında fidelerin köklerinde ölçülen total çözünebilir protein seviyesi ve kök gelişimi ile RAPD profillerindeki değişiklikleri karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Bitkilere 30, 60, 120 mg l⁻¹ dozlarında Cd uygulanmıştır. RAPD'de 12 primer kullanılmış fakat yalnızca 11 primer skorlanabilir sonuçlar vermiştir. Kısaca artan Cd konsantrasyonlarında kök gelişimi, total çözünmüş protein seviyesi düşmüştür. Bant desenlerine bakıldığında artan Cd konsantrasyonlarında DNA hasarının da arttığı gözlenmiştir.

Phaseolus vulgaris' de civa (Hg), bor (B), krom (Cr), çinko (Zn) elementlerinin genotoksik etkisini RAPD ile araştırmak amaçlanmıştır. Bitkiye toksisite yaratacak konsantrasyonlarda (150 ppm ve 350 ppm) Hg, B, Cr, Zn (HgCl₂, H₃BO₃, K₂Cr₂O₇ ve ZnSO₄.7H₂O) uygulanmıştır. Kök ve yaprak örneklerinde RAPD yapılmıştır. RAPD'de 12 primer kullanılmış, 11 primer polimorfik bantlar vermiştir. Polimorfizm değeri kök ve yapraklarda sırasıyla %50.4 ve %28.0'dir. Bant desenlerine göre 150

ppm uygulamalı bitkilerin yaprak örneklerinde toksik etki Hg>B>Zn>Cr şeklinde dizilmiş, kök örneklerinde ise Hg>Zn>Cr>B olmuştur. 350 ppm uygulamalı bitkilerin yaprak örneklerinde toksik etki Hg>B>Zn>Cr sıralaması değişmemiş kök örneklerinde ise Hg>Zn>B>Cr' olmuştur (Cenkci vd., 2009).

Wan Liu vd. (2009), kadmiyum (Cd) ile kontamine olmuş topraklarda yetiştirilen *Hordeum vulgare*'de (arpa) indüklenmiş DNA hasarını RAPD tekniğini kullanarak tespit etmeyi amaçlamışlardır. Kök büyümesi ve arpa köklerindeki toplam çözünebilir protein düzeyini RAPD profilindeki değişiklikler ile karşılaştırmayı planlamışlardır. Petrilerde çimlendirilen arpa tohumları, kuvars kum ihtiva eden toprak ile doldurulmuş saksılara transfer edilmiştir. 10 gün boyunca fidelere 10, 20 ve 40 mg l⁻¹ Cd uygulanmıştır. Artan Cd dozları ile kök boyunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca kök uçlarındaki total protein miktarı da Cd dozunun artışına bağlı olarak artmıştır. RAPD analizinde 17 primer kullanılmıştır fakat bunlardan 9 tanesi spesifik ve kararlı bantlar vermiştir. Kontrol bitkilerinde 9 primer, boyutları 144–2639 bp arasında değişen 129 bant vermiştir. Her Cd konsantrasyonunda farklı polimorfik banta rastlanmıştır. 10, 20, 40 mg l⁻¹ Cd uygulamalı bitkilerde polimorfizm yüzdesi (P%) sırasıyla %37.9, %52.7 ve %53.4'dir. Bant desenlerine bakıldığında ise artan Cd dozlarına bağlı olarak genotoksisitenin arttığı belirlenmiştir.

Acacia auriculiformis ve *Acacia mangium* tuz stresine maruz bırakılmış ve yapraklardaki ozmotik potansiyel araştırılmıştır. Araştırmacılar her bir tür arasındaki genetik çeşitliliği RAPD tekniği ile tespit etmeyi amaçlamıştır. Petrilerde çimlendirilen tohumlar toprak-perlit karışımı bulunan saksılara transfer edilmiştir ve hergün yarı güçlü Hoagland solüsyonu ile sulanmıştır. Dikimden 15 gün sonra, 18 fide 30 gün boyunca yarı güçlü Hoagland solüsyonuna 34 mM NaCl ilavesi yapıp sulanarak tuz stresine maruz bırakılmıştır. Diğer 18 fide ise kontrol olarak kabul edilmiştir. Kontrol bitkilerine kıyasla tuz stresine maruz bırakılmış bitkilerde ozmotik potansiyelde artış olduğu gözlenmiştir. RAPD ile *A. auriculiformis* ve *A. mangium*'da sırasıyla 71 ve 63 bant elde edilmiştir. *A. auriculiformis*'de bant büyüklükleri 389-2457 bp iken *A. mangium*'da 383-2862 bp arasında değişmiştir. *A. auriculiformis* ve *A. mangium*'da tespit edilen bantlardan sırasıyla 39 (55%) ve 18

(29%)'i polimorfiktir. Bu çalışmada tuz stresinin her iki türde büyümeyi azalttığı tespit edilmiştir (Nguyen vd., 2004).

Hindistan'da farklı bölgelerden toplanan 23 *Acorus calamus* L. bitkisine kromozomal anormalliklere, mutasyona ve kansere neden olduğu bilinen β -Asarone (z)-1,2,4-trimetoksi-5-prop-1-enil-benzen uygulanmıştır. Bu bitkilerde ploidi düzeyini belirlemek ve RAPD tekniği ile 23 bitki arasındaki genetik ilişkiyi tespit etmek amaçlanmıştır. Kök ucu örnekleri ile yapılan sitolojik çalışmalar sonucu 23 bitkiden 5'inin ploidi düzeyi triploidi kalan 18'inin tetraploid olduğu belirlenmiştir. RAPD'de kullanılan 34 primer çok düşük sayıda amplifikasyon ürünü verirken 6 primer polimorfik ve tekrarlanabilir amplifikasyon ürünleri üretmiştir. Toplamda 48 RAPD markırı 6 primer ile 36 polimorfik bant vermiştir. Amplifikasyon ürünlerinin boyutları 0.1-2 kb arasında değişmektedir. UPGMA analizi kullanılarak 23 birey arasındaki anormallik tespit edilmiştir. Dendogramın biri 5 biri 18 bireyi içermek üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Ahlawat vd., 2010).

Araştırmacılar, tohumlarını farklı dozlarda (5, 10, 15, 20 ve 25 Kr) gama ışınına maruz bırakılmış *Jatropha curcas* L. bitkisinde oluşan DNA hasarını RAPD tekniği ile belirlemişlerdir. Kullanılan 23 primerden 17 tanesi polimorfik bant vermiştir. Gözlenen toplam 90 banttan yalnızca 53 tanesi polimorfik olarak skorlanmıştır. Sonuç olarak dendogramda 5 ve 25 Kr uygulamalı mutantların 10, 15 ve 20 Kr uygulamalı mutantlara nazaran kontrol grubu bitkilere daha uzak olduğu gözlenmiştir (Dhakshanamoorthy vd., 2011).

14 günlük *Oryza sativa* bitkileri, 24 ve 96 saat boyunca, 50, 150 ve 300 μ M dozlarında arsenik As(III) kimyasalına maruz bırakılmıştır. Araştırmacılar iki farklı pirinç çeşiti (PB1 ve IR64) kullanarak tasarladıkları bu çalışmada, As (III)'in genotoksik etkisini RAPD tekniğini kullanarak tespit etmeyi amaçlamışlardır. Ayrıca RAPD profilindeki değişiklikleri büyüme biyomarkırları (tohum çimlenmesi, kök boyu, sürgün boyu), fizyolojik (klorofil ve protein içeriği) ve biyokimyasal (SOD, CAT, Prolin ve MDA içeriği) analizlerden elde ettikleri sonuçlar ile karşılaştırarak elde edilecek verilerin ağır metallerin bitki üzerindeki genotoksik etkisini belirlemede destekleyici olacağını düşünmüşlerdir. 24 ve 96 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde artan arsenik dozlara bağlı olarak tohum çimlenme kabiliyetinde, kök boyu ve sürgün boyunda bir azalma gözlenmiştir. Klorofil ve

protein içeriğine bakıldığında 24 ve 96 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde de artan konsantrasyonla orantılı olarak klorofil içeriğinde azalma olduğu gözlenmiştir. 24 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde SOD içeriği çoktan aza doğru 150µM>300µM>50µM>kontrol As (III) olarak sıralanırken 24 saat ve 96 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde artan konsantrasyonlara CAT içeriğinde bağlı olarak bir artış gerçekleşmiştir. 24 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde MDA içeriğinin artan konsantrasyonlara bağlı olarak arttığı gözlenirken 96 saat As (III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde MDA içeriğinin çoktan aza doğru 150>50>300 µM >kontrol konsantrasyon uygulamalarında olduğu belirlenmiştir. 24 saat As(III)'e maruz bırakılmış PB1 çeşitinde prolin içeriği 150>300>50 µM >kontrol iken IR64 çeşitinde bu sıralama 150>50>300 µM >kontrol olarak değişmektedir. 96 saat As(III)'e maruz bırakılmış her iki pirinç çeşitinde prolin içeriğinin çoktan aza doğru 150>50>300 µM >kontrol olduğu tespit edilmiştir. RAPD analizinde 20 dekamer oligonükleotid primeri kullanılmıştır fakat yalnızca 11 tanesi net ve tekrarlanabilir bantlar vermiştir. Gözlenen toplam bant sayısı PB1 ve IR64 çeşitlerinin kontrol bitkilerinde sırasıyla 51 ve 42'dir. Gözlenen toplam bant sayısı PB1 (51'i kontrol, 79'u As(III) uygulamalı) çeşitinde IR64 42'si kontrol, 29'u As(III) uygulamalı) çeşitine göre daha fazladır. Genomik şablon kararlılığı (GTS) hesaplanmıştır. Sonuç olarak kök boyu-sürgün boyu, klorofil ve protein içeriği As(III) içeriği arttıkça GTS'yi düşürmüştür. Ancak stres ile ilişkili markır olarak bilinen SOD ve MDA içeriği As(III)'e maruz kalan bitkilerde artış göstermiştir. Bu etki RAPD profilinde bantların varlığı/yokluğu (bant desenleri) ile desteklenmiştir (Ahmad vd., 2012).

Kekeç vd. (2010), *Phaseolus vulgaris* L. ve *Triticum aestivum* L. bitkilerine 5, 10, 25, 50, 100 ve 125 ppm borik asit uygulayarak oluşacak genotoksik etkiyi RAPD tekniği ile gözlemlemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma sürecinde kök ve gövde uzunluklarında da ölçümler yapılmıştır. Bor buğdayda 10 ppm (%13)'den, fasulyede 5 ppm (%19)'den sonraki dozlarda kök gelişimini engellemiştir ve bu da DNA değişimine bağlanmıştır. RAPD'de değişim gözlemleri buğdayda 100 ppm, fasulyede 25 ppm'den sonraki dozlarda başlamıştır. Spesifik RAPD band değişiklikleri (bantlardaki yoğunluklar, kayıplar, azalışlar, artışlar) karşılaştırılmıştır ve bitkiler bor toleranslarına göre sınıflandırılmışlardır. Bora duyarlı olan bitkilerde, tüm konsantrasyonlarda normal bantlar kaybolmuştur. Bora yarı toleranslı olan

bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda (100, 125 ppm) bantlar kaybolmuştur. Bora toleranslı bitkilerde ise tüm konsantrasyonlarda tüm bantlar görünmüştür. Sonuç olarak; fasulyenin bora duyarlı, buğdayın ise toleranslı olduğu tespit edilmiştir.

Sakçalı vd. (2013), mısır (Arifiye çeşiti) tohumlarını yüzey sterilizasyonu yaptıktan sonra kontrol (0), 5, 10, 25, 50, 100, 125 ve 150 ppm dozlarında borlu ortama ekmişlerdir. Borlu ortamda yetişen bitkilerde kök ve bitki boyu gelişimi, total çözülebilir protein miktarı ve ayrıca kök ve gövdedeki B miktarını tespit etmişlerdir. Bunun yanında B'un toksik etkisini mitotik indeksi, kromozom anormalliklerini gözlemleyerek ve RAPD analizi ile bu sonuçları desteklemeyi amaçlamışlardır. RAPD analizi için 20 primer kullanılmıştır. Kök boyunun en uzun olduğu doz 5 ppm B (20.5 cm) uygulaması iken bunu sırasıyla 10, 25 ppm B uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri takip etmiştir. En küçük kök boyu 150 ppm B (3.5 cm) uygulanan bitkilerde görülürken bunu sırasıyla 125, 50 ve 100 ppm B uygulanan bitkiler takip etmiştir. Bitki boyunun en uzun olduğu doz 5 ppm B (6.6 cm) olarak belirlenmişken bunu 10, 25 ve 50 ppm B uygulanan bitkiler takip etmiştir. En kısa bitki boyu 150 ppm B (2.4 cm) uygulanan bitkilerde görülürken bunu 100, 125 ppm B uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri takip etmiştir. Total çözülebilir protein miktarı en fazla kontrol bitkilerinde belirlenmişken bunu 5, 10 ve 25 ppm B uygulanan bitkiler takip etmiştir. En düşük total çözülebilir protein miktarı ise 100 ppm B uygulanan bitkide görülmüştür ve bunu 125 ve 150 ppm B uygulanan bitkiler takip etmiştir. Kökte bor konsantrasyonu en yüksek 150 ppm B uygulanan bitkilerde görülmüştür. Bunu 100, 50, 125, 10, 25, 5 ppm B uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri takip etmiştir. Gövdede bor konsantrasyonu en fazla 150 ppm B uygulanan bitkilerde bulunmuştur. Bunu 100, 125 ve 50 ppm B uygulanan bitkiler takip etmiştir. 50 ppm B uygulanan bitkilerden sonra bor konsantrasyonu sırasıyla kontrol bitkileri ve 25, 10, 5 ppm B uygulanan bitkiler olmak üzere giderek azalmıştır. Mitotik indeksi en yüksek olan doz 5 ppm B uygulanan bitkiler olmuştur. Bunu 25, 10 ppm B uygulanan bitkiler ve kontrol bitkileri takip etmiştir. Kontrol bitkilerinden sonra ise sırasıyla 50, 100, 125 ve 150 ppm B olmak üzere mitotik indeks düşmüştür. Artan bor dozları ile doğru orantılı olarak kromozom anormalliklerinde de bir artış görülmüştür. RAPD analizinde ise yüksek bor konsantrasyonlarında normal bantların kaybolduğu görülmüştür. Farklı bor konsantrasyonlarına maruz bırakılmış mısır bitkisi ile yapılan RAPD analizi sonucunda GTS (genomik şablon stabilitesi) hesaplanmıştır. GTS

sonuçlarına göre borun en toksik etkisi 100 ve 125 ppm B uygulanan bitkilerde grlmŖken bunu 50, 25, 150, 5, 10 ppm bor uygulanan bitkiler ve kontrol takip etmiŖtir. Bu sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıŖtır. GTS sonuçları kök geliŖimi ile karŖılaŖtırıldıėında anlamlı bir korelasyon gzlenmemiŖtir.

Erturk vd. (2013), mısır bitkisine 5, 10, 20, ve 40 mM çinko sülfat ($Zn SO_4$) ve 5, 10, 20 ve 40 mM borik asit (H_3BO_3) uygulamıŖlardır. Zn ve B'un mısır bitkisinde oluŖturacaėı toksik etkiyi total çözülebilir protein miktarını tespit ederek belirlemeyi ve bu sonuçları RAPD analizi ile birlikte değerlendirmeyi amalamıŖlardır. RAPD analizinde 16 primer kullanılmıŖtır. B için total çözülebilir protein miktarı en fazla 40 mM H_3BO_3 uygulamasında grlmŖtir. Bunu 20 mM H_3BO_3 , 5 mM H_3BO_3 , kontrol, 10 mM H_3BO_3 uygulanan bitkiler takip etmiŖtir. Zn için total çözülebilir protein miktarı en fazla 5 mM Zn uygulamasında grlmŖtir. Bunu kontrol bitkileri ve 10 mM Zn, 20 mM Zn ve 40 mM Zn uygulanan bitkiler takip etmiŖtir. Uygulama yapılmıŖ (Zn, B) ve uygulama yapılmamıŖ (kontrol) bitkilerin RAPD profiline bakıldığında bant desenlerinde farklılıklar gzlenmiŖtir. B ve Zn konsantrasyonu arttığa polimorfizm değeri de artmıŖtır. GTS sonuçları artan B ve Zn konsantrasyonlarında toksisitenin de doğru orantılı olarak arttığını gstermiŖtir.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Mısır bitkisinin bilimsel sınıflandırması (Seçmen vd., 2004) :

- Alem: Plantae (Bitkiler)
Bölüm: Angiosperms (Kapalı tohumlular)
Alt bölüm: Monocots (Bir çenekliler)
Takım: Poales
Familya: Poaceae (Buğdaygiller)
Alt familya: Panicoideae
Oymak: Andropogoneae
Cins: *Zea*
Tür: *Zea mays* L. (mısır) ‘dır.

Bu tez çalışmasında *Zea mays* L. (mısır) Arifiye çeşiti kullanılmıştır. Tohumlar Muğla Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü’nden temin edilmiştir. Çeşit, uzun boylu, bol koyu yeşil aksamı ile silajlık çeşit özelliklerini taşımaktadır. Orta geçici kompozit bir çeşittir. Yaprakları geniş ve yayvandır. Sarı at dişi tane yapısındadır. Hasatta tane rutubeti %25-35 arasında değişmektedir. 85 günde çiçeklenir. Bitki boyu 220-240 cm’dir. Koçan yüksekliği 125-140 cm’dir. Tane verimi 700-1100 kg/da’dır. Silajlık verim ana üründe 5.5-7.5 ton/da, ikinci üründe 4.5-6.5 ton/da’dır. Tane/koçan oranı %80’dir. Olgunlaşma süresi 135 gündür. Yaprak yanıklığı (*Helminthosporium* spp.) hastalığına dayanıklı, sap ve koçan çürüklüğüne (*Fusarium* spp.) orta dayanıklıdır (Muğla Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, 2013).

2.2. Fidelerin Yetiştirilmesi

Borik asit (H_3BO_3) ve 24-epibrassinolide uygulamaları için iki farklı deneme kurulmuştur.

- Tohumlar laboratuarda perlitte çimlendirilmiş ve 20 gün büyütülmüştür.
- Tohumlar torf içeren saksılara ekilmiş ve dış mekanda 30 gün büyütülmüştür.

Tohum ekimi sterilize edilmiş tohumlar ile yapılmıştır.

2.2.1. Tohum sterilizasyonu

Mısır tohumları öncelikle %2.25'lik Na-hipoklorit çözeltisinde 4-5 dk bekletilmiş, ardından 3 kere distile su ile çalkalanarak yüzeysel sterilizasyonu yapılmıştır (Yokaş vd., 2008; Doğru vd., 2012).

2.2.2. Perlitte çimlendirme ve uygulamalar

Her biri 20 gözlü 16 adet viyol perlit (0.3-0.6 mm)(Persa Madencilik Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. Kınık-İzmir) ile doldurulmuş ve distile su ile sulanarak ekim için hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan viyollere, yüzeysel sterilizasyonu yapılan tohumlar, bir göze bir tohum olmak üzere ekilmiş (320 adet mısır tohumu ekilmiştir) ve sulanmıştır. 28°C oda sıcaklığında tutulan viyoller tohum ekimini takiben, 7 gün boyunca her bir viyol her gün 250'şer ml olmak üzere distile su ile sulanmıştır. 8. günden itibaren her bir viyol her gün 250'şer ml Hoagland çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1950) ile sulanmıştır.

Hoagland Çözeltisinin Hazırlanması:

Hoagland Çözeltisi Stokları:

Makroelementler

• $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 236.1 \text{ g/l}$	}	Her birinden 1'er litre stok hazırlanmıştır.
• $\text{KNO}_3 \rightarrow 101.1 \text{ g/l}$		
• $\text{KH}_2\text{PO}_4 \rightarrow 136.1 \text{ g/l}$	}	
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 246.5 \text{ g/l}$		

Mikroelementler

• $\text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow 2.8 \text{ g}$

• $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1.8 \text{ g}$

• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.2 \text{ g}$

• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.1 \text{ g}$

• $\text{NaMoO}_4 \rightarrow 0.025 \text{ g}$

1 litre stok hazırlanmıştır.

• $\text{Fe-EDTA} \rightarrow 15 \text{ g}$ } 1 litre distile suda çözülerek stok hazırlanmıştır.

1 litre Hoagland çözeltisi için;

Makroelement stoklarından KH_2PO_4 'den 1 ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan 2 ml, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 'dan ve KNO_3 'den 5'er ml; mikroelement stoğundan 1 ml ve Fe-EDTA stoğundan 1 ml alınıp distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Borik asit (H_3BO_3) uygulaması; Hoagland çözeltisine 50, 100 ve 150 ppm borik asit ilave edilerek günlük sulamalar yapılmıştır. Tohum ekiminden 12 gün sonra borik asit uygulamasına başlanmış ve 5 gün art arda borik asitli (50, 100 ve 150 ppm) Hoagland çözeltisi ile sulama yapılarak devam edilmiştir.

24-epibrassinolide (24-epiBL) uygulaması; 5. gün borik asit uygulamasını takiben 0, 0.01, 0.5 ve 1 μM konsantrasyonlarında 24-epiBL bitkiyi ıslatacak şekilde püskürterek uygulanmıştır (spreyleme). Bu işlem, tohum ekiminden 18 gün sonra borik asit uygulamasının 5. günü, 1 uygulama olarak yapılmıştır.

24-epibrassinolide çözeltisinin hazırlanması: (24-EpiBL, Sigma 1641)

24-epiBL (10 mg), birkaç damla etanolde çözüldükten sonra üzeri distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti hazırlanmıştır. Stoktan ilgili konsantrasyonlar (0.01, 0.5 ve 1 μM) hazırlanarak uygulamalar yapılmıştır.

24-epibrassinolid uygulaması yapıldıktan sonraki gün tüm viyoller 250'şer ml distile su ile sulanmıştır ve bir gün sonra tüm bitkicikler hasat edilmiştir.

Ekimden 20 gün sonra deneme sonlandırılmış olup hasat edilen bitkiler DNA izolasyonu ve RAPD çalışmaları için -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

Tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı olarak planlanan çalışmanın borik asit ve 24-epiBL uygulama doz ve kombinasyonları aşağıda verilmiştir:

1. Kontrol (0 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL)
2. 0 ppm H₃BO₃+ 0.01 µM 24-epiBL
3. 0 ppm H₃BO₃+ 0.5 µM 24-epiBL
4. 0 ppm H₃BO₃+ 1 µM 24-epiBL
5. 50 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL
6. 50 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL
7. 50 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL
8. 50 ppm H₃BO₃+ 1 µM 24-epiBL
9. 100 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL
10. 100 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL
11. 100 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL
12. 100 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL
13. 150 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL
14. 150 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL
15. 150 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL
16. 150 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL

2.2.3. Saksıda çimlendirme ve uygulamalar

28 cm çaplı saksılara 1500 g torf konulmuş her saksıya 5'er adet tohum ekilmiştir (Güneş vd., 2000). İzleyen günlerde her bir saksı her gün nemini koruyacak şekilde (750'şer ml su ile) sulanmıştır.

Kontrol, 30, 60, 90 ve 120 ppm olarak belirlenmiş olan borik asit (H_3BO_3) konsantrasyonları sulama suyuna eklenerek verilmiştir. Tohum ekiminden 13 gün sonra borik asit uygulamasına başlanmış ve günde bir kez olmak üzere 5 gün art arda sulama suyu ile birlikte uygulanmıştır. Borik asit uygulaması 5 gün yapılmıştır. Sonra çeşme suyu ile sulamaya devam edilmiştir. Son borik asit (H_3BO_3) uygulaması günü ve izleyen 2 gün 24-epiBL uygulaması bitkinin tüm yapraklarını ıslatacak şekilde spreylenerek yapılmıştır. Epibrassinolide uygulaması 24 saat aralıklarla toplam 3 uygulama olarak yapılmıştır. 24-epiBL konsantrasyonları kontrol, 0.01, 0.5 ve 1 μM 'dir.

Son 24-epiBL uygulamasından sonra da bitkiler çeşme suyu ile sulanarak bir hafta sonra hasat edilmiştir (çimlenmeden 30 gün sonra). Borik asit ve 24-epiBL uygulama konsantrasyonları aşağıda verilmiştir:

1. Kontrol (0 ppm H_3BO_3 + 0 μM 24-epiBL)
2. 0 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
3. 0 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
4. 0 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL
5. 30 ppm H_3BO_3 + 0 μM 24-epiBL
6. 30 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
7. 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
8. 30 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL
9. 60 ppm H_3BO_3 + 0 μM 24-epiBL
10. 60 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
11. 60 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
12. 60 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL
13. 90 ppm H_3BO_3 + 0 μM 24-epiBL
14. 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
15. 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
16. 90 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL

17. 120 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL
18. 120 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL
19. 120 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL
20. 120 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL

2.2.3.1. Ölçümler

Hasat edilen bitkilerde bitki boyu (cm) (köksüz), kök boyu (cm), bitki yaş ağırlığı (g) (köksüz) ve bitki kuru ağırlığı (g) (köksüz) belirlenmiştir. Ayrıca, hasat edilen bitki örnekleri bor analizi, DNA izolasyonu ve RAPD çalışmaları için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.2. İstatistiki analiz

Verilerin istatistiki analizi SPSS 14.0 paket programı ile yapılmıştır. One way Anova Testi kullanılmıştır.

2.3. Yaprak Örneklerinde Bor Analizi

2.3.1. ICP-AES ile bor analizi

Örnekler Muğla Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü laboratuvarı prosedürüne göre hazırlanmış ve laboratuvar bünyesinde bulunan ICP-AES cihazında okunmuştur. Bitki yaprakları saf su ile yıkanmış ve pastör fırınında 70 °C'de 2 gün (48 saat) kurutulmuştur. Kurutulup öğütülmüş yaprak örneğinden 0.5 gram porselen kroze içinde tartılmış ve örnekler sırasıyla kül fırınına yerleştirilmiştir. Kül fırınında Çizelge 2.3.'deki programa göre 2 kere yakılmıştır. Cihaz kapatılarak porselen krezeler içindeki örnekler kül fırınında soğumaya bırakılmış ve krezeler çeker ocak içine alınmıştır. Çeker ocak çalışır vaziyette iken her örneğe 0.5 ml %37'lik HCl yavaş yavaş ilave edilmiştir. 5 dakika bekledikten sonra örnekler pisetle taşırmayacak şekilde saf su ilave edilmiş örnekler whatman kağıdından (No: 1) 50 ml'lik falcon tüpler içerisine süzölmüştür. Süzme işlemi bittikten sonra falcon tüp 50

ml ölçü çizgisine kadar saf su ile tamamlanmış ve ICP-AES cihazında okuma yapılarak örneklerdeki bor miktarı tespit edilmiştir.

Çizelge 2.1. Bor analizi için bitki örneklerinin kül fırınında yakma programı (Kaçar ve İnal, 2008)

Yakma tekerrürü	Yakma derecesi (°C)	Yakma süresi (saat)
1	150°C	1.5 h
	250°C	2 h
	350°C	2 h
	550°C	2 h
2	250°C	1.5 h
	400°C	2 h
	600°C	2 h
	800°C	1.5 h

2.4. Bitki Örneklerinin RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA= Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Analizleri

2.4.1. DNA izolasyonu

Tüm bitki örneklerinden DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Plant Mini Kit ile gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulama konsantrasyonuna ait örneklerden uygulamayı temsil edecek şekilde yapraklar bir araya getirilerek hazırlanan örneklerden DNA izole edilmiştir.

2.4.1.1. Qiagen Dneasy plant mini kit protokolü

- 0.1 g yaprak örneği steril edilmiş -20°C’de bekletilmiş porselen havanda sıvı nitrojen ile toz haline getirilmiş ve 1.5 ml’lik plastik tüpe konulmuştur.
- 1.5 ml’lik plastik tüpte toz halinde bulunan yaprak örneği üzerine 400 µl AP1 Buffer ve 4 µl RNase A eklenerek kuvvetlice vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler 10 dk 65°C’de sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresince tüpler 2-3 kere ters düz edilmiştir.
- Sıcak su banyosundaki inkübasyon sona erdikten sonra tüplere 130 µl P3 Buffer eklenerek karıştırılmış ve tüpler 5 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- Tüpler 5 dk 20000xg (14000 rpm)’de santrifüj edilmiştir.
- QIAshredder spin kolon 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve pipetle çekilen süpernatant kolona transfer edilmiştir. Daha sonra QIAshredder spin kolonlar 14000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolondan akan süpernatant yeni bir ependorf tüpe transfer edilmiştir ve üzerine süpernatantın 1.5 katı hacminde AW1 Buffer eklenerek pipetlenmiştir.
- Bu karışımın 650 µl’si 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilen DNeasy mini spin kolona pipetle transfer edilmiş ve 1 dk 6000xg (≥ 8000 rpm)’de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır ve karışımın kalanı için aynı işlem tekrarlanmıştır.
- DNeasy mini spin kolon yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir ve kolona 500 µl AW2 Buffer eklenerek 1 dk 8000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı atılmıştır.
- DNeasy mini spin kolona tekrar 500 µl AW2 Buffer eklenmiş ve bu sefer 2 dk 14000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- DNeasy mini spin kolon yeni bir 1.5 ml’lik ependorf tüpe yerleştirilmiştir.
- Elüsyon için spin kolona 100 µl AE Buffer eklenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildikten sonra 1 dk 8000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Spin kolona yeni bir ependorf tüp yerleştirilerek son basamak tekrarlanmıştır.

2.4.1.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların miktar ve kalitesi, %1'lik agaroz jel ile belirlenmiştir. Spektrofotometre okumaları ile elde edilen değerler ve bunların birbirine oranları kullanılarak DNA saflıkları belirlenmiştir. Optik densite (OD), 260 (OD260) ve 280 nanometre optik densitedeki (OD280) DNA'nın saflığını gösteren bu değerlerin 1.8 ile 2.0 arasında olması istenmektedir (Özdil ve Başpınar, 2005).

Agaroz jel ve spektrofotometre okumaları sonucunda elde edilen verilerden yararlanılarak, DNA son konsantrasyonu 50 ng/μl olacak şekilde ddH₂O ile seyreltilmiş ve daha sonraki analizler için -20°C'lik derin dondurucuda kullanım zamanına kadar saklanmıştır.

2.4.2. RAPD-PCR analizleri

2.4.2.1. DNA amplifikasyon koşulları

DNA amplifikasyonu, Doyle&Doyle (1987)'a ait metot modifiye edilerek yapılmıştır. PCR reaksiyonu için hazırlanan çözeltinin kokteyl içeriği aşağıda verilmiştir (1x kokteyl):

- 10x Buffer (KCl) → 1.5 μl
- MgCl₂ (25 mM) → 2 μl
- dNTP (100 mM) → 1.2 μl
- Primer (10 μM) → 1 μl
- ddH₂O → 4.1 μl
- Taq Polymerase (5U/ μl, 500U) → 0.2 μl
- Kalıp DNA → 5 μl (5 ng/μl)

Toplam: 15 μl

PCR için Thermo Scientific marka taq polimeraz #EP0402) kullanılmıştır.

2.4.2.2. PCR döngü programı

- Ön denatürasyon----- 94°C’de → 30 sn
- Denatürasyon----- 94°C’de → 25 sn
- Bağlanma----- 35°C’de → 45 sn
- Uzama----- 72°C’de → 1 dk
- Son uzama----- 72°C’de → 5 dk
- Muhafaza----- +4°C’de → ∞

35 döngü

PCR reaksiyonu Biometra Uno II (Almanya) cihazında yapılmıştır.

2.4.2.3. Primerler

RAPD analizlerinde 48 adet sentetik dekamer oligonükleotid denenmiştir. Bu primerlere ait baz dizilişleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. RAPD analizlerinde kullanılan 48 primerin (sentetik dekamer oligonükleotidi) adları ve baz dizilişleri

No	Primer Kodu	Primer Sekansı (5'→3')	Moleküler Ağırlık	Pikomol
1	OPA-1	CAGGCCCTTC	2964	2730
2	OPA-2	TGCCGAGCTG	3044	1150
3	OPB-1	GTTTCGCTCC	2970	6364
4	OPB-2	TGATCCCTGG	3019	5656
5	OPB-3	CATCCCCCTG	2924	6314
6	OPB-4	GGACTGGAGT	3108	4894
7	OPB-5	TGCGCCCTTC	2955	6475
8	OPB-6	TGCTCTGCC	2955	6475
9	OPB-7	GGTGACGCAG	3093	4959
10	OPB-8	GTCCACACGG	3013	5379
11	OPB-9	TGGGGGACTC	3084	5267
12	OPB-10	CTGCTGGGAC	3044	5495
13	OPB-11	GTAGACCCGT	3028	5302
14	OPB-12	CCTTGACGCA	2988	5533
15	OPB-13	TTCCCCCGCT	2915	6822

Çizelge 2.2. (devam)

No	Primer Kodu	Primer Sekansı (5'→3')	Moleküler Ağırlık	Pikomol
16	OPB-14	TCCGCTCTGG	2995	6161
17	OPB-15	GGAGGGTGTT	3139	4990
18	OPB-16	TTTGCCCGGA	3019	5656
19	OPB-17	AGGGAACGAG	3126	4387
20	OPB-18	CCACAGCAGT	2997	5194
21	OPB-19	ACCCCCGAAG	2982	5267
22	OPB-20	GGACCCTTAC	2988	5533
23	OPC-4	CCGCATCTAC	2948	5785
24	OPC-5	GATGACCGCC	3013	3200
25	OPD-8	GTGTGCCCA	3004	2050
26	OPH-18	GAATCGGCCA	3037	1640
27	OPM-1	GTTGGTGGCT	3090	5533
28	OPM-2	ACAACGCCTC	2957	5415
29	OPM-3	GGGGGATGAG	3173	4600
30	OPM-4	GGCGGTTGTC	3075	5616
31	OPM-5	GGGAACGTGT	3108	4894
32	OPM-6	CTGGGCAACT	3028	5302
33	OPM-7	CCGTGACTCA	2988	5533
34	OPM-8	TCTGTTCCCC	2930	6699
35	OPM-9	GTCTTGCGGA	3059	5415
36	OPM-10	TCTGGCGCAC	3004	5743
37	OPM-11	GTCCACTGTG	3019	5656
38	OPM-12	GGGACGTTGG	3124	5058
39	OPM-13	GGTGGTCAAG	3108	4894
40	OPM-14	AGGGTCGTTC	3059	5415
41	OPM-15	GACCTACCAC	2957	5415
42	OPM-16	GTAACCAGCC	2997	5194
43	OPM-17	TCAGTCCGGG	3044	5495
44	OPM-18	CACCATCCGT	2948	5785
45	OPM-19	CCTTCAGGCA	2988	5533

No	Primer Kodu	Primer Sekansı (5'→3')	Moleküler Ağırlık	Pikomol
46	OPW-1	CTCAGTGTCC	2979	2690
47	OPW-5	GGCGGATAAG	3117	1510
48	OPW-7	CTGGACGTCA	3028	1830

2.4.2.4. RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Farklı konsantrasyonlarda borik asit ve 24-epibrassinolid uygulanan mısır bitki yapraklarından izole edilen DNA'lar %1.5'lük (w/v) agaroz jelde yatay elektroforez sistemi kullanılarak yürütülmüştür. Genomik DNA için 3 g, PCR ürünleri için 4.5 g agaroz tartılıp 300 ml 0.5xTBE tampon solüsyonu içine konulduktan sonra mikrodalga fırında çözündürülerek iyice kaynatılmıştır. Agaroz jel katılaşmadan önce (50-60°C) 30 µl EtBr (10 mg/ml) eklenmiştir. Jel biraz soğuyunca jel tabaklarına hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Agaroz katılaştıktan sonra taraklar çıkarılmış ve içinde 0.5x TBE tampon solüsyonu (içeriği aşağıda verilmiştir) bulunan jel elektroforezi tankına yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 10 µl PCR ürünü ve 2 µl loading dye (Thermo Scientific, #R0611) yüklenerek toplam hacim 12 µl olmuştur. Tüm jellerde RAPD bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemede 1 kb'lik DNA moleküler ağırlık markörü kullanılmış ve kuyucuklara 2 µl yüklenmiştir. DNA örnekleri ve PCR ürünleri 100 V, 500 mA'de 120 dakika yürütüldükten sonra Gel Capture yazılımı kullanılarak DNR Bio-Imaging Systems Mını BIS Pro marka jel dökümantasyon sisteminde fotoğraflanmıştır. Tüm jel fotoğraflarının negatifleri kullanılmıştır.

TBE içeriği (5X), 1 litre için:

- | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Disodium EDTA (4.6875 g) • Trizma Base (54 g) • Borik asit (27.5 g) | } | <p><u>0.5X TBE, 1 litre için:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 5X TBE • 900 ml distile su |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

2.4.2.5. RAPD bant profillerinin değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen bant desenleri incelenerek polimorfik olan bantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda borik asit ve 24-

epiBL uygulamalı örneklerin karşılaştırılmasında, bantlar var (1) veya yok (0) olarak değerlendirilmiş ve çalışmada polimorfizm oranı şu formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Polimorfizm oranı (\%)} = \frac{\text{Polimorfik bant sayısı}}{\text{Toplam bant sayısı}} \times 100$$

(Monomorfik bant sayısı + Polimorfik bant sayısı)

UPMGA dendogram analizleri, Jaccard katsayıları kullanılarak benzerlik veri matrislerinden elde edilmiştir (Dr. Santi Garcia-Vallve ve Dr. Pere Puigbo, Rovirai Virgili Üniversitesi, Biyokimya ve Biyoteknoloji Bölümü, Tarragona, İspanya, 2002).

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. Perlitte Çimlendirme ve Çim Bitkilerine Ait Bulgular

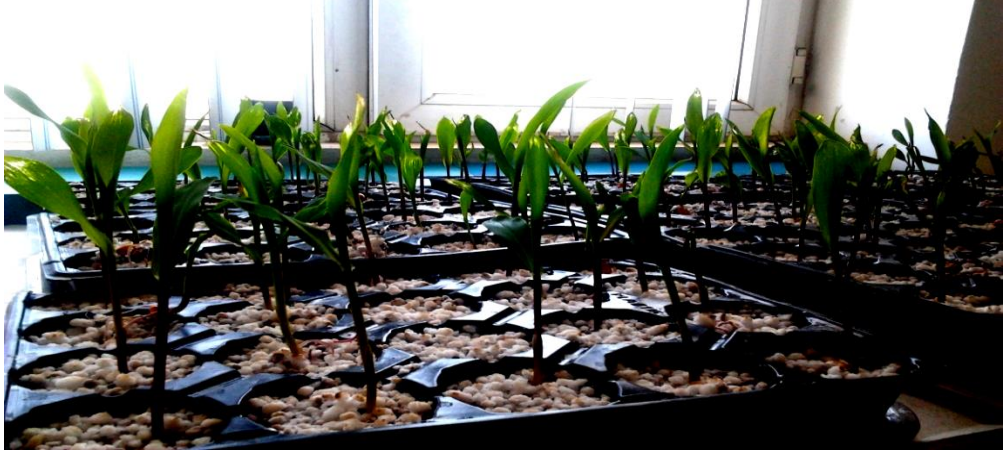
Tohumların perlite ekiminden 4 gün sonra ilk çimlenme görülmüştür. Yaprak kınından ilk yaprakların çıkışı tohum ekiminden 7 gün sonra gözlenmiştir (Şekil 3.1) (Şekil 3.2). Şekil 3.3.'de tohum ekiminden 11 gün sonra ve Şekil 3.4.'de ise 18 gün sonra bitkiler gözlenmiştir.



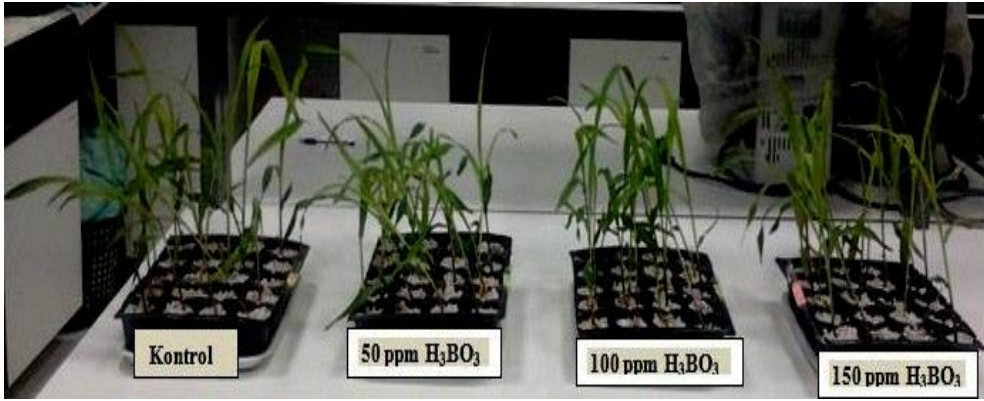
Şekil 3.1. Tohumların ekiminden 7 gün sonra çimlenmeden bir görünüm



Şekil 3.2. Tohumların ekiminden 8 gün sonraki bir görünüm



Şekil 3.3. Tohum ekiminden 11 gün sonra bitkiciklerin görünümü



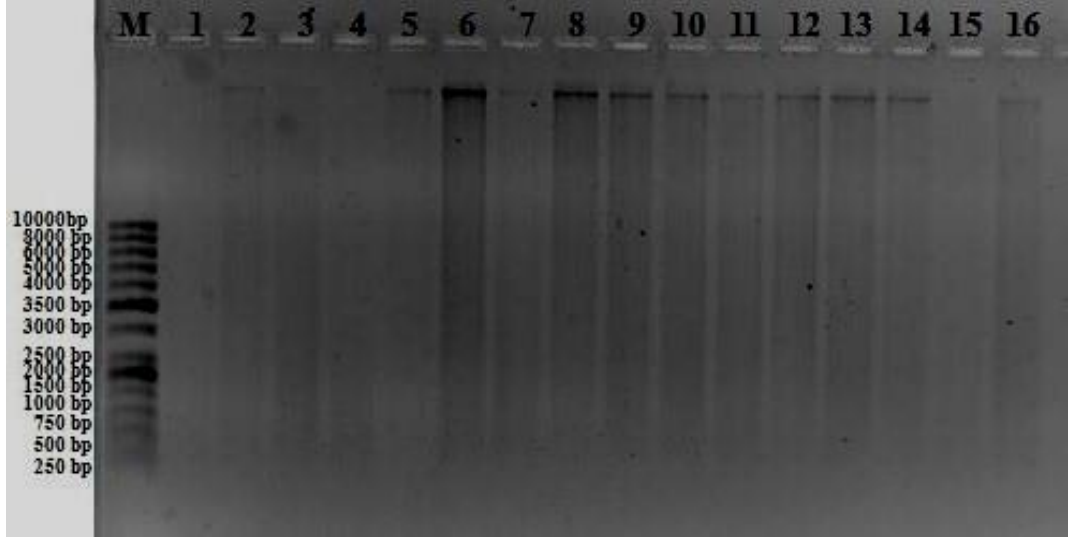
Şekil 3.4. H₃BO₃ uygulaması ve 24- epiBL uygulaması yapılmış olan bitkilerin görünümü
(Tohum ekiminden 18 gün sonra)

3.1.1. DNA izolasyonu

20 günlük bitkilerden izole edilen DNA'lar uygulamalara göre numaralandırılmış, saflıkları spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve Çizelge 3.1'de verilmiştir. İzolasyonu yapılan DNA'ların %1'lik jel üzerindeki görünümleri Şekil 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. 20 günlük bitkiciklerden izole edilen DNA'ların uygulamalara göre numaralandırılması ve DNA'ların saflıkları

Borik asit ve 24-epiBL Uygulamaları	Örnek	A260	A280	A260/A280	DNA miktarı (stok) ng/µl
Kontrol (0 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL)	1	0.064	0.063	1.01	422.4
0 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	2	0.013	0.010	1.3	85.8
0 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	3	0.014	0.013	1.07	92.4
0 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	4	0.016	0.014	1.14	105.6
50 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	5	0.017	0.015	1.13	112.2
50ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	6	0.043	0.040	1.07	283.8
50ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	7	0.008	0.006	1.33	52.8
50ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	8	0.086	0.084	1.02	567.6
100 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	9	0.038	0.036	1.05	250.8
100 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	10	0.022	0.021	1.04	145.2
100 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	11	0.041	0.039	1.05	270.6
100 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	12	0.043	0.040	1.07	283.8
150 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	13	0.021	0.018	1.16	138.6
150 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	14	0.046	0.043	1.06	303.6
150 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	15	0.024	0.021	1.14	158.4
150 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	16	0.130	0.126	1.03	858



Şekil 3.5. Perlitte yetiştirilen bitkiciklerden izole edilen DNA'lar

3.1.1.1. Perlitte yetiştirilen bitkiciklerde RAPD-PCR analizi

Farklı konsantrasyonlarda borik asit ve 24-epibrassinolide uygulanmış 20 günlük bitkilerden izole edilmiş olan 16 DNA örneği ile gerçekleştirilen RAPD-PCR analizlerinde 48 primer denenmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Perlitte yetiştirilen bitkiciklere yapılan RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri

No	Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm (%)
1	OPA-1	2000, 1800, 1000, 900, 550, 450	6	6	0	0
2	OPA-2	1600, 1500, 1000*, 900, 850*, 800*, 750*, 650, 600*, 550*, 500*, 350	12	5	7	58.3
3	OPB-1	1500*, 1000*, 750, 500, 450, 400	6	4	2	33.3
4	OPB-2	900,650*	2	1	1	50
5	OPB-3	1750, 1500, 1400, 900, 750, 650, 450, 350, 300	9	9	0	0
6	OPB-4	1500*, 1250, 750, 650, 600, 500, 400	7	6	1	14.2
7	OPB-5	1850*, 1500*, 1000*, 850*, 750, 575*, 550,250*	8	2	6	75
8	OPB-6	1500, 1450*, 1400, 900, 750, 650, 500, 350	8	7	1	12.5
9	OPB-7	1350*, 1000, 900, 750, 650, 600, 350*	7	6	1	14.2
10	OPB-8	1500*, 1250, 1000, 750, 650*, 500, 350, 300*	8	5	3	37.5
11	OPB-9		0	0	0	0
12	OPB-10	1800*, 1500, 1400, 1300*, 1000, 900*, 750, 550, 500*, 450*, 300*	11	5	6	54.5
13	OPB-11	2500, 2000, 1500, 1000, 750*	5	4	1	25
14	OPB-12	2000*, 1800, 1750*, 1500, 750, 600, 400	7	5	2	28.5
15	OPB-13		0	0	0	0
16	OPB-14	2750*, 2500*, 2000, 1500, 1000, 900, 650	7	5	2	28.5

Çizelge 3.2. (devam)

No	Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm (%)
17	OPB-15	2000, 1600, 1500, 1400, 1100, 900, 750, 500, 350*, 300*	10	8	2	20
18	OPB-16		0	0	0	0
19	OPB-17	1800, 1750, 1500, 900, 850, 750, 350, 300*	8	7	1	12.5
20	OPB-18	1500*, 1000, 800, 750, 675, 650, 500, 300*	8	6	2	25
21	OPB-19	1850, 750, 350	3	3	0	0
22	OPB-20	3000*, 1800*, 1000, 800, 750, 500, 300	7	5	2	28.5
23	OPC-4	2500*, 1650, 1625, 1500, 1425, 1000	6	5	1	16.6
24	OPC-5	1750, 1200, 800, 750*	4	3	1	25
25	OPD-8	1100, 1000, 900, 800, 400, 350	6	6	0	0
26	OPH-18	1600*, 1500, 1400*, 1000, 900	5	3	2	40
27	OPM-1	2000*, 1500, 1450*, 1100*, 1000, 950, 675*, 550*, 500*, 900*	10	3	7	70
28	OPM-2		0	0	0	0
29	OPM-3		0	0	0	0
30	OPM-4	1450, 1200, 900, 750, 650, 350*	6	5	1	16.6
31	OPM-5	1400, 1000, 975, 750, 500, 450	6	6	0	0
32	OPM-6	1500, 1000, 900*, 650, 600, 550, 450	7	6	1	14.2
33	OPM-7	1600, 1500, 1400, 1300, 1100, 1000, 750, 675, 500, 350	10	10	0	0

Çizelge 3.2. (devam)

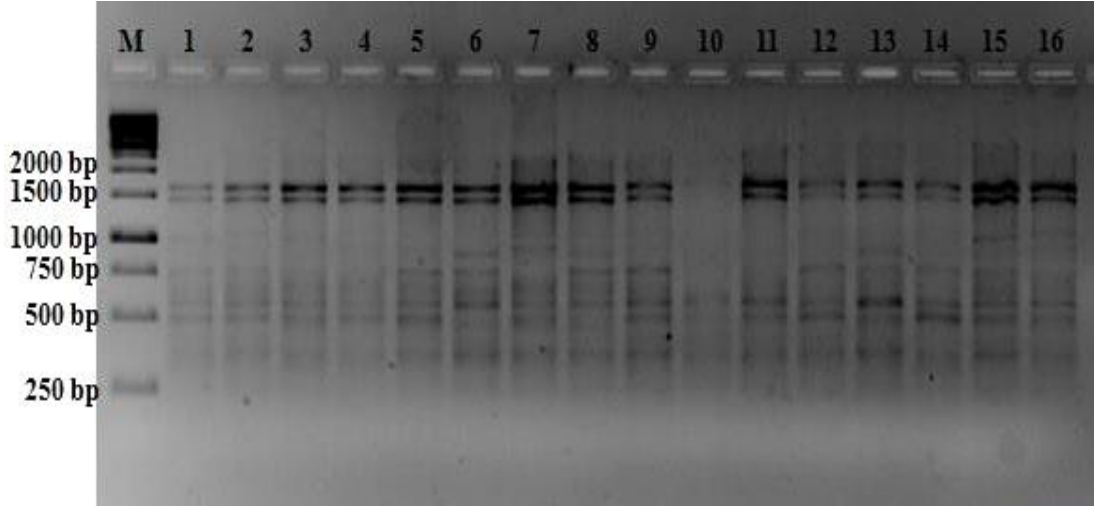
No	Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm (%)
34	OPM-8	1000, 500, 350	3	3	0	0
35	OPM-9		0	0	0	0
36	OPM-10		0	0	0	0
37	OPM-11	1800*, 1750, 1500, 1000, 750, 550, 400	7	6	1	14.2
38	OPM-12	1100*, 1000, 900*, 850*, 750*, 650*, 600*, 500*, 400	9	2	7	77.7
39	OPM-13	1500, 1400*, 1350*, 1100, 900, 875*, 850*, 500, 350*, 300*	10	4	6	60
40	OPM-14	1500,1100*, 1000, 750, 500, 375, 300	7	6	1	14.2
41	OPM-15		0	0	0	0
42	OPM-16	2000*, 1875, 1450, 1100, 750, 675	6	5	1	16.6
43	OPM-17	1100, 1000, 850*, 750*, 500, 475	6	4	2	33.3
44	OPM-18	1850*, 1700, 1500, 1100, 900, 850, 750, 700, 675*, 500, 475	11	9	2	18.1
45	OPM-19	1100, 900	2	2	0	0
46	OPW-1	2000, 1100*, 800	3	2	1	33.3
47	OPW-5	1750, 700*, 500*, 450*, 400, 350*, 300	7	3	4	57.1
48	OPW-7	1200, 1000*, 900*, 800, 750*, 650*, 600*, 450*, 300*	9	2	7	77.7
TOPLAM			279	194	85	

*Polimorfik PCR bandı

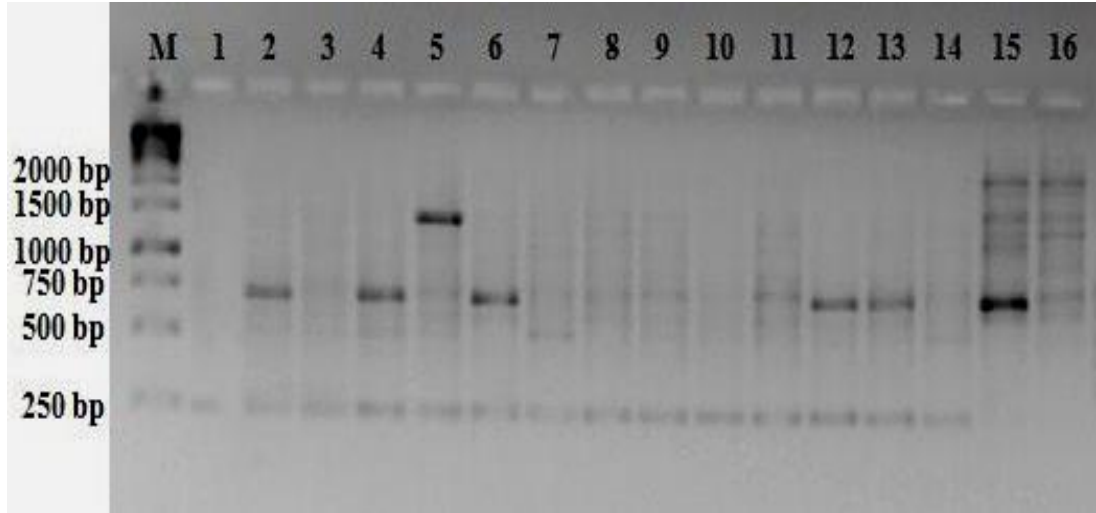
Sadece 8 primer (OPA-2, OPB-5, OPB-10, OPM-1, OPM-12, OPM-13, OPW-5, OPW-7) polimorfik bantlar vermiştir ve 48 primerden 8 tanesinden (OPB-9, OPB-13, OPB-16, OPM-2, OPM-3, OPM-9, OPM-10, OPM-15) PCR ürünü alınmamıştır. Uygulanan 40 primerden 32'si (%80) DNA örneklerinde polimorfik RAPD-PCR bantları verirken 8'i (%20) ise monomorfik PCR bantları vermiştir. Toplam 279 adet amplifikasyon ürünü elde edilmiş olup bu ürünlerin 85 tanesinin polimorfik (%29.34) ve 194 tanesinin monomorfik (%70.65) olduğu tespit edilmiştir. En çok bant OPA-2 (12 bant) primerinde gözlenirken en az bant OPB-2 ve OPM-19 (2 bant) primerlerinde gözlenmiştir. En büyük bant ağırlığına sahip PCR ürünü 3000 bp olarak OPB-20 primerinde, en düşük bant ağırlığına sahip PCR ürünü ise 250 bp olarak OPB-5 primerinde tespit edilmiştir.

OPA-2 primeri ile 16 bitki örneği kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 300-2200 bp arasında 14 bant elde edilmiştir. Bu 14 banttan 1600, 550, 500 ve 350 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 2200 bp'de 100 ppm H_3BO_3 (9), 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7), 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (8) uygulanan bitkilerde, 1100 bp'de 0.01 μM 24-epiBL (2) ve 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulanan bitkilerde, 850 bp'de 150 ppm H_3BO_3 (13) ve 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) uygulanan bitkilerde, 450 bp'de 100 ppm H_3BO_3 (9), 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10), 100 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11) ve 100 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12) uygulanan bitkilerde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.6).

OPB-5 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-2500 bp arasında 15 bant elde edilmiştir. Bu 15 banttan 1500, 1400 ve 750 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 2500 bp'de 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) ve 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulanan bitkilerde, 450 bp'de sadece 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) uygulanan bitkilerde ve 480 bp'de sadece 100 ppm H_3BO_3 (9) uygulanan karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.7).

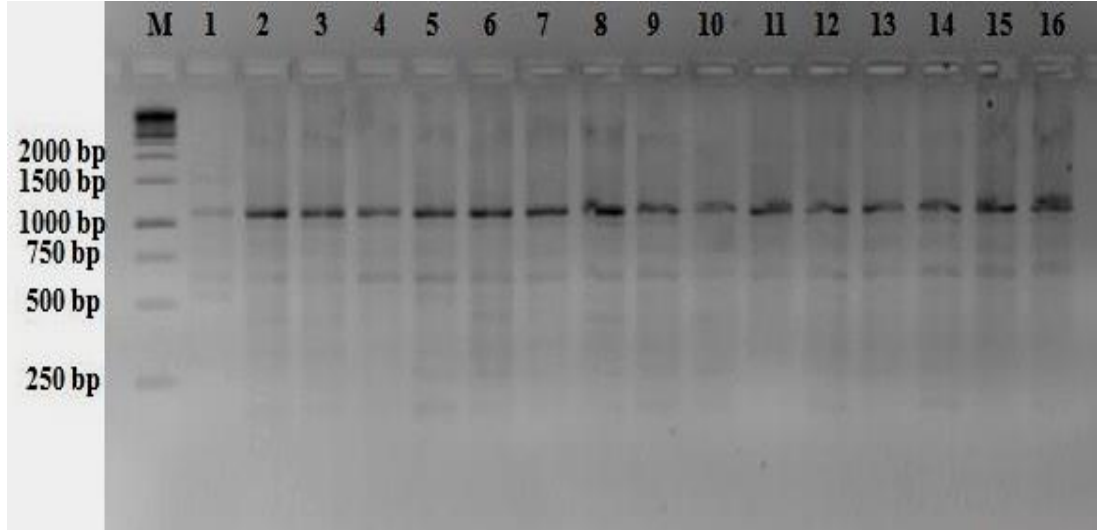


Şekil 3.6. OPA-2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



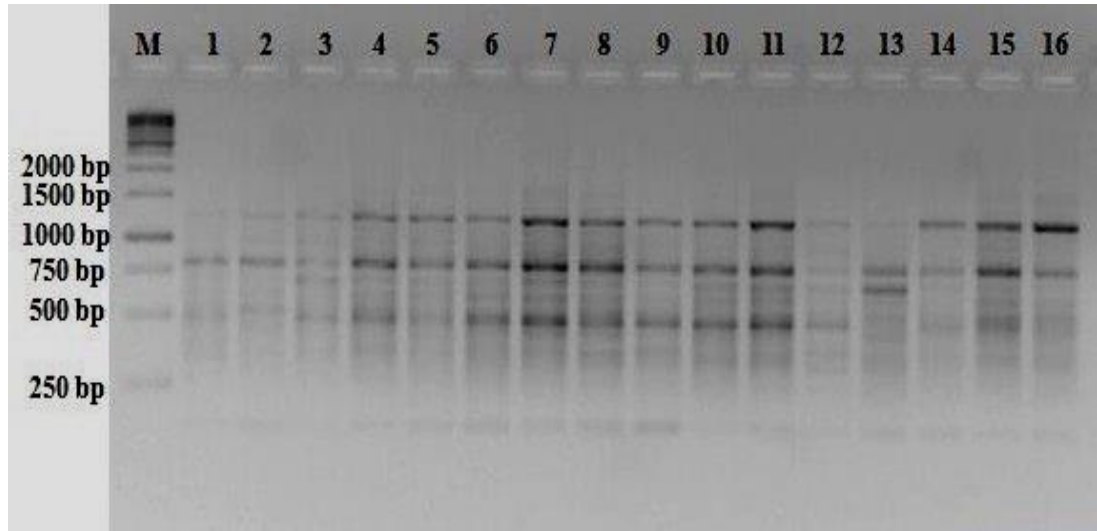
Şekil 3.7. OPB-5 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPB-10 primeri ile 16 örneğin PCR ürünleri jel görüntüleri değerlendirildiğinde 400-1490 bp arasında 10 bant elde edilmiştir. Bu 10 banttan 1200, 760 ve 740 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 1490 bp'de kontrol, 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) ve 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (8) uygulanan bitkilerde, 1300 bp'de 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulanan bitkilerde, 850 bp'de 0.01 μM 24-epiBL (2), 0.5 μM 24-epiBL (3) ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) uygulanan bitki örneklerinde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.8.).



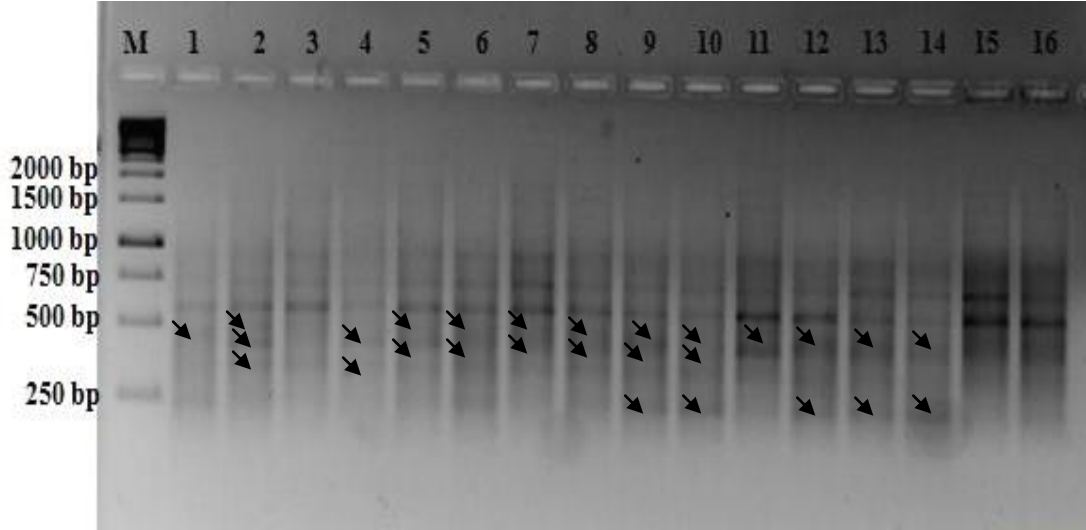
Şekil 3.8. OPB-10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPM-1 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-2500 bp arasında 17 bant elde edilmiştir. Bu 17 banttan 1300, 800, 750 ve 200 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 2500 bp’de ve 2000 bp’de sadece 1 μ M 24-epiBL (4), 520 bp’de sadece 0.01 μ M 24-epiBL (2) ve 350 bp’de sadece 100 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL (12 numaralı) uygulamalı örneklerde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.9.).



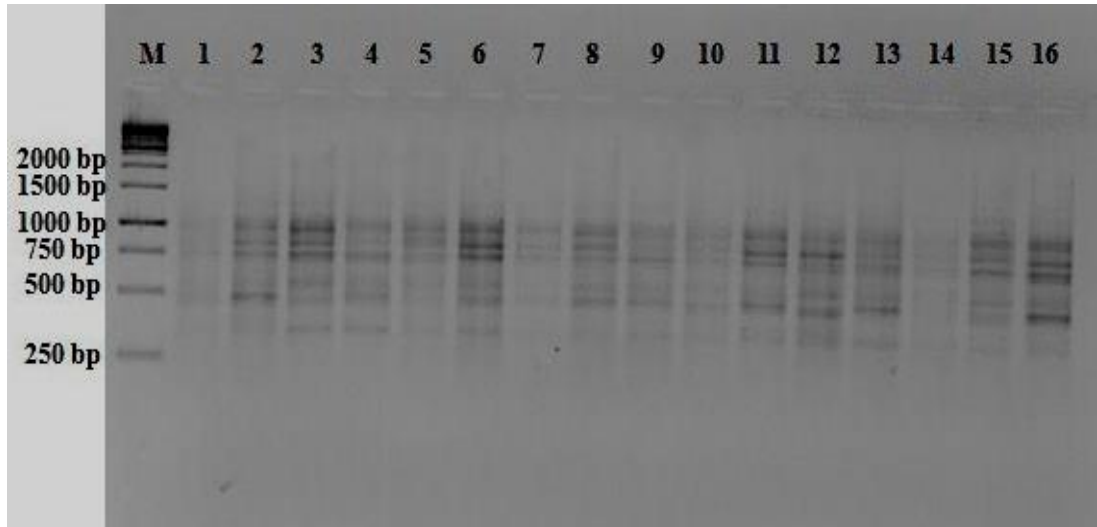
Şekil 3.9. OPM-1 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPM-12 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-1750 bp arasında 12 bant elde edilmiştir. Bu 12 banttın 700 ve 600 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 1750 bp'de 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7), 100 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11), 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) ve 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulanan örneklerde, 1250 bp'de 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) ve 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulanan örneklerde, 1050 bp'de 50 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (6), 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) ve 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiB (8) uygulananlarda, 500 bp'de ve 350 bp'de sadece 0.01 μM 24-epiBL (2) uygulanan bireylerde karakteristik bantlar saptanmıştır. Buna göre bor ve epiBL uygulamaları ile kaybolan veya yeni görülen bantlar Şekil 3.10. üzerinde ok ile gösterilmiştir. OPM-12 primeri ile elde edilen polimorfik bantlar kontrole (1) göre 0.01 μM 24-epiBL (2) uygulamalı örneklerde 450 bp, 350 bp, 300 bp büyüklüğünde bantlar ortaya çıkmışken kontrolde görülen 400 bp büyüklüğündeki bant yok olmuştur, 0.5 μM 24-epiBL (3) uygulamalı örnekte kontrol grubuna benzer şekilde bu bantlar kaybolmuştur. 1 μM 24-epiBL (4) uygulamalı örnekte ise 350 bp ve 300 bp büyüklüğünde bantlar tekrar ortaya çıkmaktadır. 50 ppm H_3BO_3 (5), 50 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (6), 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7), 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (8), 100 ppm H_3BO_3 (9), 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10) uygulamalı örneklerde 450 bp ve 350 bp büyüklüğünde bantlar görülmekte ve bununla birlikte sadece 100 ppm H_3BO_3 (9) ve 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10) uygulamalı örneklerde 250 bp büyüklüğünde bantlar da görülmektedir. 100 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11) uygulamalı örnekte 250 bp'deki bant yok olurken 450 bp büyüklüğündeki bant hala görünmektedir. 100 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12), 150 ppm H_3BO_3 (13), 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (14) uygulamalı örneklerde 450 bp ve 250 bp büyüklüğünde bantlar görünmektedir. Yüksek bor dozlarında ve epiBL uygulamalı örneklerde ise (150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) ve 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16)) söz konusu bantlar yoktur (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. OPM-12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

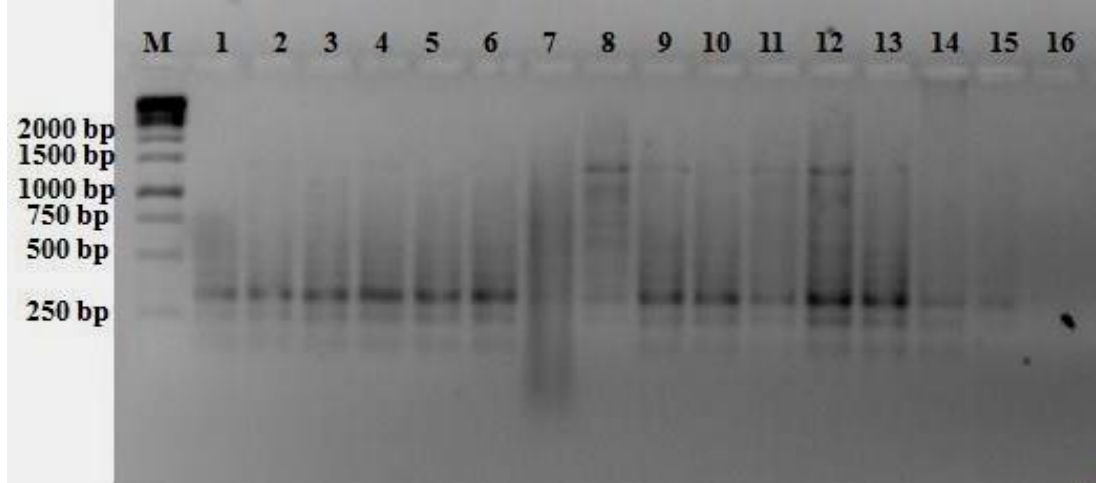
OPM-13 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 350-1600 bp arasında 11 bant elde edilmiştir. Bu 11 banttan 1000, 850, 750, 450 ve 350 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 1600 bp'de sadece 0.5 μ M 24-epiBL (3) uygulanan örneklerde karakteristik bant saptanmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. OPM-13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPW-5 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-1400 bp arasında 10 bant elde edilmiştir. Bu 10 banttan 400 ve 350 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde

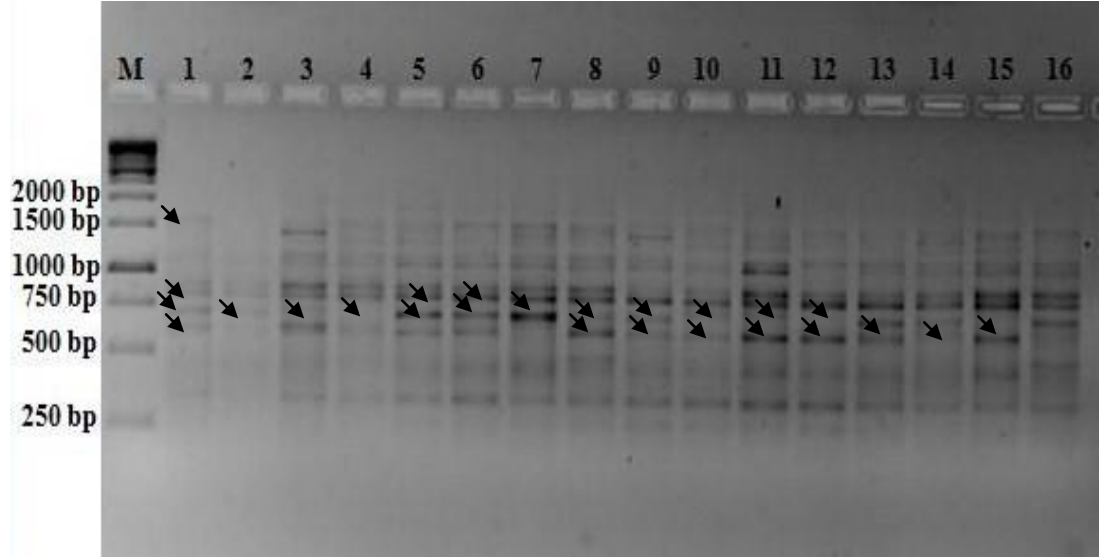
gözlenmiştir. Ayrıca 900 bp’de sadece 50 ppm B + 1 µM 24-epiBL uygulanan örnekte ve 750 bp’de kontrol (1), 100 ppm H₃BO₃ (9), 50 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (7) ve 50 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (8) uygulanan bitki örneklerinde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. OPW-5 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPW-7 primeri ile 16 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-2000 bp arasında 19 bant elde edilmiştir. Bu 19 banttan 1200, 900, 800 ve 350 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Ayrıca 2000 bp’de 50 ppm H₃BO₃ (5), 150 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (14) ve 150 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (15) uygulamalı örneklerde, 1400 bp’de 50 ppm H₃BO₃ (5), 0 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (4) ve 100 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (10) uygulamalı örneklerde, 1050 bp’de 150 ppm H₃BO₃ uygulamalı örnekte, 1000 bp’de 100 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (12) uygulamalı örnekte, 650 bp’de 50 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (7) uygulamalı örnekte, 500 bp’de 50 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (8) ve 150 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (16) uygulamalı örneklerde karakteristik bantlar saptanmıştır. Bor ve epiBL uygulamaları ile bazı bantlar kaybolurken bazı yeni bantların görülmesi Şekil 3.13. üzerinde ok ile gösterilmiştir. OPW-7 primeri için elde edilen polimorfik bantlar kontrole (1) kıyasla 0.01 µM 24-epiBL (2) ve 0.5 µM 24-epiBL (3) uygulamalı örneklerde 1500 bp büyüklüğündeki bantlar kaybolmuş, 0.5 µM 24-epiBL (3) uygulamalı örnekte 1450 bp büyüklüğünde bir bant ortaya çıkmıştır.

1 μM 24-epiBL (4) uygulamalı örnekte 750 bp büyüklüğündeki bant kontrole göre kaybolurken 50 ppm H_3BO_3 (5) ve 50 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (6) uygulamalı örneklerde bu bant tekrar ortaya çıkmıştır. 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) uygulamalı örnekte kontrole göre 600 bp büyüklüğündeki bant yok olmuştur. 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (8), 100 ppm H_3BO_3 (9), 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10), 100 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11), 100 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12), 150 ppm H_3BO_3 (13), 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (14) ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) Örneklerde 600 bp büyüklüğündeki bant tekrar ortaya çıkarken 150 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulamalı örnekte tekrar kaybolmuştur. Ayrıca 700 bp büyüklüğündeki bant 100 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12) uygulamalı örnekte ve sonraki diğer uygulamalı örneklerde (13, 14, 15, 16 numaralı örnekler) yok olmuştur (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. OPW-7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Jaccard similarity programı ile hesaplanarak oluşturulan benzerlik indeksi tablosu Çizelge 3.3’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en düşük oran (0.450) kontrol bitkileri ve 150 ppm B + 1 μM 24-epiBL uygulanan bitkiler arasında tespit edilmiştir. En yüksek benzerlik indeksi ise 0.793 ile 100 ppm B + 0.5 μM 24-epiBL ve 150 ppm B + 0.5 μM 24-epiBL uygulanan bitkiler arasındadır (Çizelge 3.3.).

Uygulamalar arasındaki uzaklıkları gösteren dendogram kontrol bitkileri ve, farklı uygulamalı bitkiler olmak üzere 2 ana gruba (Grup A ve Grup B) ayrılmıştır (Şekil 3.14.).

Grup A: 1. Kontrol (0 ppm B + 0 μ M 24-epiBL) bitkilerini içermektedir.

Grup B: 2. 0.01 μ M 24-epiBL

3. 0.5 μ M 24-epiBL

4. 1 μ M 24-epiBL

5. 50 ppm H_3BO_3

6. 50 ppm H_3BO_3 + 0.01 μ M 24-epiBL

7. 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μ M 24-epiBL

8. 50 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL

9. 100 ppm H_3BO_3

10. 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μ M 24-epiBL

11. 100 ppm H_3BO_3 + 0.5 μ M 24-epiBL

12. 150 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL

13. 150 ppm H_3BO_3

14. 100 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL

15. 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μ M 24-epiBL

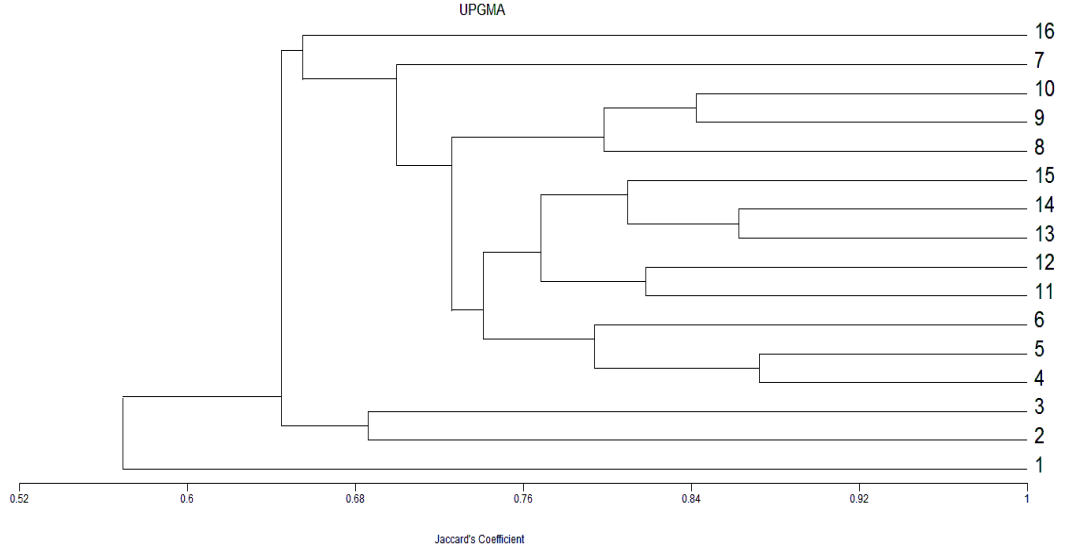
16. 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μ M 24-epiBL uygulanan bitkilerden oluşmaktadır.

Birinci grup olan Grup A sadece kontrol grubu bitkilerinden oluşurken Grup B kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri 0.01 μ M 24-epiBL ve 0.5 μ M 24-epiBL uygulanan bitkileri olmak üzere sadece 24-epiBL uygulamalıları içerirken diğer grup tekrar iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri 150 ppm B + 1 μ M 24-epiBL uygulanan bitkilerden oluşurken diğer grup da kendi içinde iki ayrı gruba ayrılmıştır. Gruplardan biri 50 ppm H_3BO_3 + 0.5 μ M 24-epiBL uygulanan bitkileri içerirken diğer grup da kendi içinde iki farklı gruba ayrılmıştır ve her grup kendi içinde tekrar iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan biri 50 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL,

100 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL ve 100 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerden diğeri ise 50 ppm H₃BO₃, 150 ppm H₃BO₃, 1 µM 24-epiBL, 50 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL, 100 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL, 100 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL, 150 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL ve 150 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL uygulanan bitkilerden oluşmuştur.

Çizelge 3.3. Perlitte yetiştirilen farklı konsantrasyonlarda H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalı 20 günlük bitkilerin RAPD analizi sonucunda ulaşılan benzerlik indeksi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.000															
2	0.577	1.000														
3	0.625	0.686	1.000													
4	0.592	0.720	0.745	1.000												
5	0.615	0.736	0.725	0.872	1.000											
6	0.589	0.764	0.722	0.755	0.833	1.000										
7	0.567	0.569	0.607	0.633	0.705	0.758	1.000									
8	0.600	0.625	0.613	0.613	0.683	0.790	0.758	1.000								
9	0.625	0.650	0.638	0.696	0.772	0.767	0.734	0.823	1.000							
10	0.571	0.655	0.643	0.673	0.750	0.776	0.636	0.774	0.842	1.000						
11	0.483	0.565	0.632	0.722	0.707	0.733	0.730	0.708	0.767	0.746	1.000					
12	0.545	0.576	0.618	0.712	0.727	0.724	0.667	0.726	0.821	0.768	0.818	1.000				
13	0.604	0.691	0.648	0.780	0.792	0.786	0.721	0.698	0.789	0.737	0.786	0.811	1.000			
14	0.585	0.643	0.660	0.725	0.808	0.737	0.677	0.683	0.772	0.719	0.737	0.759	0.863	1.000		
15	0.508	0.590	0.603	0.691	0.737	0.733	0.677	0.657	0.683	0.635	0.793	0.724	0.786	0.833	1.000	
16	0.450	0.583	0.542	0.625	0.672	0.645	0.597	0.603	0.625	0.578	0.672	0.633	0.719	0.702	0.789	1.000



Şekil 3.14. Perlitte çimlendirilen 20 günlük bitkilerin RAPD analizi dendogramı

3.2. Saksıda Yetiştirilen Bitkilere Ait Bulgular

Tohumların saksıya ekiminden 5 gün sonra ilk çimlenme gözlenmiştir (Şekil 3.15.) ve Şekil 3.16.'da tohumların ekiminden 8 gün sonra bitkicikler gözlenmiştir.



Şekil 3.15. Tohumların ekiminden 5 gün sonraki çimlenme durumu



Şekil 3.16. Tohumların ekiminden 8 gün sonra bitkiciklerin görünümü

3.2.1. Bitki büyüme biyomarkırları

Saksılara tohum ekiminden 13 gün sonra 5 gün art arda bitkiciklere sulama suyu ile birlikte bor uygulanmıştır. Kültürün 18. günü 24-epiBL uygulanmaya başlanmış ve bitkilere 3 gün art arda günde 1 kez olmak üzere 24-epiBL çözeltileri püskürtülerek verilmiştir. Tohum ekiminden 27 gün sonra hasat edilen bitkilerde bitki boyu, kök boyu, bitki yaş ağırlığı ve kök yaş ağırlığı bulunmuştur.

3.2.1.1. Bitki boyu

Borik asit uygulamaları (24-epiBL uygulamasız) tüm dozlarda bitki boyunda kontrole göre bir artışa sebep olmuş ve en yüksek artışın 30 ppm H_3BO_3 uygulama dozunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4.). Bastias vd. (2004), mısır bitkilerinde bitki boyunu 40 mg kg^{-1} B dozunun arttırdığını tespit etmişlerdir. Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'da 0.5 mM (30 ppm), 1 mM (60 ppm) ve 2 mM (120 ppm) artan bor konsantrasyonlarında bitki boyunda bir azalma gözlenmiştir. Genel olarak bor uygulamaları ile toksik etki nedeniyle büyüme ve gelişmede görülen gerilemeden söz edilmektedir. Çalışmamızda ise bitki boyu bakımından böyle bir gerileme görülmemiştir. Bor uygulamalarını takiben 24-epiBL uygulaması yapıldıktan hemen sonra bitkiler hasat edilmiştir. Bu nedenle toksik etki belirtileri görülmediği sonucuna varılmıştır.

Artan konsantrasyonlarda 24-epiBL uygulamalarının (H_3BO_3 uygulamasız) bitki boyunda artışa neden olduğu gözlenmiştir. Özellikle 0.5 μM 24-epiBL uygulamasındaki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. 30 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde bitki boyunu kontrole göre en çok arttıran konsantrasyon 0.5 μM 24-epiBL olmuştur. 0.01 μM 24-epiBL dozunun ise bitki boyunda istatistikî olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. 60 ppm borik asit uygulamasında epibrassinolid uygulamasının iyileştirici etkisi görülmeye başlanmış ancak 30 ppm uygulamasındaki gibi 0.5 μM 24-epiBL konsantrasyonu değil 1 μM 24-epiBL konsantrasyonu daha etkili olmuştur. Benzer olarak 90 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde de 24-epiBL'nin bitki boyundaki artış en fazla 1 μM 24-epiBL uygulamalı bitkilerde olmuş fakat istatistikî olarak anlamlı bulunmamıştır. 120 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde de hiçbir 24-epiBL dozu bitki boyunda istatistiki olarak

anlamli artiş sağlamamıştır (Çizelge 3.4.). *Zea mays* L. (mısır) bitkisinde NaCl'e karşı, salisilik asit (SA) ve 24-epiBL'nin etkilerini araştıran Agami (2013), 10 µM 24-epiBL dozunun kontrole kıyasla bitki boyunda artışa sebep olduğunu göstermiştir. Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'da 0.5, 1 ve 2 mM bor konsantrasyonlarına karşı 10^{-8} M 28-homoBL uygulamışlardır. 28-homoBL'nin borun her dozunda bitki gelişimini indüklediğini gözlemlemişlerdir. 28-homoBL'nin en iyi etkisi 0.5 mM bor uygulamalılarında görölmüş bunu 1 mM bor uygulamalılarıdaki etki takip etmiştir. Bu tez çalışmasında, 0.5 µM 24-epiBL konsantrasyonu bitki boyunda, kontrole göre 8.75 cm'lik bir artışla literatürde belirtilen verilerle uyum sağlamaktadır. Bununla birlikte bu konsantrasyon iki katına çıkarıldığında (1 µM 24-epiBL), bitki boyundaki bu artış kontrole göre 4.17 cm olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4.). Bu veriler ışığında 24-epiBL'nin, uygun konsantrasyonlarda bitki boyunun uzamasını teşvik edebileceği, ancak düşük ve yüksek konsantrasyonlarda büyümede bir baskılama ve/veya toksik bir etki oluşturabileceği düşünülebilir.

Çizelge 3.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki boyu (cm) (Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H ₃ BO ₃	30 ppm H ₃ BO ₃	60 ppm H ₃ BO ₃	90 ppm H ₃ BO ₃	120 ppm H ₃ BO ₃
0 µM	40.83±2.63	47.16±1.917	42.75±1.97	44.66±1.55	42.50±4.16
0.01 µM	42.91±2.39	42.41±1.29*	45.8±1.15	41.83±1.32	43.56±1.46
0.5 µM	49.58±1.54*	50.91±.89	44.08±1.23	44.41±2.03	46.21±1.96
1 µM	45.00±1.13	47.00±1.62	46.83±2.12	46.08±1.86	43.56±1.78
Ortalama	44.54±1.24	46.88±0.92	44.87±0.84	44.25±0.86	43.98±1.12

3.2.1.2. Kök boyu

Borik asit uygulamaları ile (24-epiBL uygulamasız) bitki boyunda olduğu gibi kök boylarında da bir artış görölmüştür ve en uzun kök 60 ppm H₃BO₃ uygulamasında olmuştur (Çizelge 3.5.). Campbell vd. (1998), beş buğday çeşidinin fidelerine altı farklı bor konsantrasyonu (Kontrol, 1.55, 3.1, 4.6, 6.2, 7.7, 9.3 mg l⁻¹ H₃BO₃)

uygulamışlar ve artan bor dozlarında kök uzunluklarında bir azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Esim vd. (2012), *Zea mays* L. bitkisinde 11-15 günlük fideler için 2 ve/veya 6 gün, 2 ve 4 mM H₃BO₃ uygulamışlardır. Kök boyu artan bor dozlarıyla azalmıştır. Bizim çalışmamızda 24-epiBL uygulamaları (borik asit uygulamasız) kök uzamasına sebep olmuştur ve en uzun kök 0.5 µM 24-epiBL uygulamasında (47.41 cm) gözlenmiştir fakat istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. 60 ve 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 24-epiBL uygulamalarının hiçbir konsantrasyonu kök boyunda bir artışa sebep olmamış; 30 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde istatistiki olarak anlamlı olmamakla birlikte 0.5 µM 24-epiBL'in kontrole göre kök boyunu arttırmıştır. Aynı şekilde 90 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde istatistiki olarak anlamlı olmamakla birlikte 0.01 µM 24-epiBL uygulamasının kontrole göre kök boyunu arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca 30, 60 ve 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 1 µM 24-epiBL'in kontrole göre kök boyunu azalttığı gözlenmiş ve istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. (Çizelge 3.5). Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'ya 0.5, 1 ve 2 mM bor dozları ve 10⁻⁸ M 28-homoBL dozunu uygulamışlardır. 28-homoBL'nin borun her dozunda bitki gelişimini indüklediğini gözlemlemişlerdir. 0.5 mM bor ve 28-homoBL doz kombinasyonu en verimli doz iken bunu 1 mM bor ve 28- homoBL doz kombinasyonu takip etmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök boyu (cm) (Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H ₃ BO ₃	30 ppm H ₃ BO ₃	60 ppm H ₃ BO ₃	90 ppm H ₃ BO ₃	120 ppm H ₃ BO ₃
0 µM	37.00±4.03	52.83±5.80	54.25±3.64	48.33±7.79	47.66±3.92
0.01 µM	40.66±5.54	48.16±6.55	41.05±8.01	54.16±2.47	41.50±5.30
0.5 µM	47.41±6.89	54.00±7.76	45.33±3.95	42.75±3.37	38.78±3.50
1 µM	40.12±6.74	37.78±2.84*	29.58±3.93*	38.66±6.88	38.68±2.90*
Ortalama	41.40±2.83	47.78±3.03	42.55±3.05	45.97±2.88	41.34±2.03

3.2.1.3. Bitki yaş ağırlığı

24-epiBL uygulamasız sadece H₃BO₃ uygulanan bitkilerde (30, 60, 90 ve 120 ppm) artan bor konsantrasyonu ile kontrole göre bitkilerin yaş ağırlıklarında artış görülmüştür. H₃BO₃ dozlarına göre bu artış 120 ppm>30 ppm>90 ppm>60 ppm şeklinde olmuştur. 30 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde bitki yaş ağırlığını arttırmada en etkili olan 24-epiBL konsantrasyonu 0.5 µM olmuştur ve 0.01 µM'da ise bitki yaş ağırlığında istatistiki olarak bir azalma tespit edilmiştir. 60, 90 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde ise en etkili konsantrasyonun 1 µM 24-epiBL olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 3.6). 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde hiçbir 24-epiBL konsantrasyonu kontrole göre bitki yaş ağırlığında artış sağlamamış ve 1 µM 24-epiBL uygulamasındaki düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. 60 ppm H₃BO₃ ve 1 µM 24-epiBL uygulanan bitkilerin yaş ağırlığındaki artış istatistiki olarak anlamlı, 30 ppm H₃BO₃ ve 0.01 µM 24-epiBL uygulaması ile 120 ppm H₃BO₃ ve 1 µM 24-epiBL uygulanan bitkilerin yaş ağırlığındaki azalış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.6). *Zea mays* L. (mısır) bitkisinde NaCl, salisilik asit (SA) ve 24-epiBL'nin etkilerini araştıran Agami (2013), 10 µM 24-epiBL'in kontrole kıyasla bitki yaş ağırlığında bir artışa sebep olduğunu belirtmiştir. Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'ya 0.5, 1 ve 2 mM bor ve 10⁻⁸ M 28-homoBL uygulamışlardır. Borun her konsantrasyonunda 28-homoBL'nin bitki gelişimini indüklediğini gözlemlemişlerdir. En yüksek etki 0.5 mM bor uygulamalarında görülmüş ve bunu 1 mM bor'a olan etkisi takip etmiştir.

Çizelge 3.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki yaş ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H ₃ BO ₃	30 ppm H ₃ BO ₃	60 ppm H ₃ BO ₃	90 ppm H ₃ BO ₃	120 ppm H ₃ BO ₃
0 µM	5.23±0.87	6.88±0.47	5.36±0.63	6.02±0.39	7.26±0.84
0.01 µM	6.62±1.02	5.47±0.27*	6.13±0.38	5.68±0.54	6.15±0.78
0.5 µM	6.74±0.76	8.00±0.22	6.17±0.29	5.71±0.62	6.47±0.61
1 µM	4.28±1.29	6.48±0.60	7.52±0.70*	6.99±0.70	5.53±0.46*
Ortalama	5.85±0.49	6.70±0.27	6.29±0.29	6.10±0.29	6.29±0.34

3.2.1.4. Bitki kuru ağırlığı

Bor uygulamaları ile bitki yaş ağırlıklarındaki duruma benzer bitkilerin kuru ağırlıklarında da artan bor konsantrasyonları ile (24-epiBL uygulamasız) bir artış görülmüştür. Uygulama dozlarına göre bu artış sırasıyla 120 ppm>90 ppm>30 ppm>60 ppm şeklinde olmuştur. Bastias vd. (2004), kontrol, 100 mM ve 430 mM NaCl uygulamalı mısır bitkilerinde bitki kuru ağırlığını en çok 40 mg kg⁻¹ B'un arttırdığını tespit etmişlerdir. Mısır bitkisine 20 ppm B uygulayan Lordkaew vd. (2011), uygulamalı 20 ppm bitkilerde kontrole göre kuru madde miktarını daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada, 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 24-epiBL uygulamaları bitki kuru ağırlığında artış gözlenmemiş; 30 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 0.5 µM 24-epiBL uygulaması bitki kuru ağırlığında istatistiki olarak anlamlı bir artış sağlamıştır. 60 ve 90 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 24-epiBL'in bitki kuru ağırlığını arttırmada en etkili olan dozun 1 µM 24-epiBL olduğu görülmektedir (Çizelge 3.7.).

Zea mays L. (mısır) bitkisinde NaCl, salisilik asit (SA) ve 24-epiBL'nin etkilerini araştıran Agami (2013), 10 µM 24-epiBL dozunun kontrole kıyasla bitki kuru ağırlığında artışa sebep olduğunu belirtmiştir.

Çizelge 3.7. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre bitki kuru ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H ₃ BO ₃	30 ppm H ₃ BO ₃	60 ppm H ₃ BO ₃	90 ppm H ₃ BO ₃	120 ppm H ₃ BO ₃
0 µM	0.36±0.05	0.53±0.02	0.39±0.02	0.53±0.03	0.55±0.08
0.01 µM	0.53±0.06	0.41±0.04	0.46±0.02	0.43±0.03	0.52±0.06
0.5 µM	0.51±0.05	0.63±0.01*	0.50±0.07	0.49±0.05	0.46±0.07
1 µM	0.57±0.01	0.55±0.03	0.54±0.10	0.58±0.05	0.44±0.04
Ortalama	0.49±0.02	0.53±0.02	0.47±0.03	0.51±0.02	0.49±0.03

3.2.1.5. Kök yaş ağırlığı

Artan bor dozlarına bağlı olarak (24-epiBL uygulamasız) kök yaş ağırlığında bir artış gözlenmiştir. Kontrol bitkilerinde kök yaş ağırlığını en çok arttıran 24-epiBL dozu 0.5 μM olmakla birlikte istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. 30 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde kök yaş ağırlığını en fazla 24-epiBL uygulamasız bitkilerde olmuştur. 60 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde ise kök yaş ağırlığı 0.5 μM 24-epiBL uygulamalı örneklerde bulunmuştur. 90 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde kök yaş ağırlığını 1 μM 24-epiBL uygulamalılarından, 120 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde ise 24-epiBL uygulamasız bitkilerde olmuştur. Ayrıca 120 ppm H_3BO_3 uygulanan bitkilerde 0.01 μM 24-epiBL uygulaması ile kök yaş ağırlığında istatistiki olarak anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Çizelge 3.8.). Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'ya 0.5, 1 ve 2 mM bor dozları ve 10^{-8} M 28-homoBL dozunu uygulamışlardır. 28-homoBL'nin borun her dozunda bitki gelişimini indüklediğini gözlemlemişlerdir. En etkin 10^{-8} M 28-homoBL dozu iken bunu 0.5 mM bor ve 10^{-8} M 28-homoBL kombinasyonu ve bunu da 1 mM bor ve 10^{-8} M 28-homoBL kombinasyonu takip etmiştir. Bununla birlikte, sabit konsantrasyonda tutulan 28-homoBL (10^{-8} M) ile artırılan deşimlerde borun (0.50, 1.0, veya 2.0 mM) bitki kök yaş ağırlığında kontrol grubuna göre %42.4 oranında bir azalma gösterdiği saptanmıştır ve araştırmacılar artırılan bor konsantrasyonunun (2.0 mM'a kadar) bitki üzerinde toksik bir etkiye sebep olabileceğini belirtmişlerdir (Yusuf vd., 2011).

Çizelge 3.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H_3BO_3 ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök yaş ağırlığı (g) (Ortalama \pm Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H_3BO_3	30 ppm H_3BO_3	60 ppm H_3BO_3	90 ppm H_3BO_3	120 ppm H_3BO_3
0 μM	17.20 \pm 0.43	26.45 \pm 0.43	17.78 \pm 0.21	19.66 \pm 0.43	25.58 \pm 0.30
0.01 μM	13.01 \pm 0.38	21.21 \pm 0.45	20.55 \pm 0.34	19.00 \pm 0.29	14.76 \pm 0.28*
0.5 μM	22.95 \pm 0.38	26.08 \pm 0.43	23.38 \pm 0.29	15.76 \pm 0.37	18.32 \pm 0.20
1 μM	16.20 \pm 0.40	16.05 \pm 0.22	15.31 \pm 0.25	21.86 \pm 0.34	18.95 \pm 0.27
Ortalama	17.46 \pm 0.20	22.19 \pm 0.20	19.25 \pm 0.14	19.07 \pm 0.17	19.01 \pm 0.14

3.2.1.6. Kök kuru ağırlığı

Borik asit uygulamaları kontrole göre kök kuru ağırlığında dozlara göre 30 ppm>120 ppm>90 ppm>60 ppm sıralaması olarak bir artış göstermiştir. Kontrol, 30 ppm ve 60 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 0.5 µM 24-epiBL uygulaması ile kök kuru ağırlığı artmış (istatistiki olarak anlamlı değil); 90 ppm ve 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde ise hiçbir 24-epiBL dozu kök kuru ağırlığını arttırmamıştır (Çizelge 3.9). Yusuf vd. (2011), *Vigna radiata*'da 10⁻⁸ M 28-homoBL konsantrasyonunun kök kuru ağırlığı üzerinde en etkili sonucu verdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanında artırılan dozlarda bor (0.50, 1.0, veya 2.0 mM) ile 10⁻⁸ M 28-homoBL birlikte kullanımı sonucunda kontrole göre birki kök kuru ağırlığında %54.4 oranında bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar bitki kök yaş ağırlığında olduğu gibi bitki kök kuru ağırlığında da artırılan bor konsantrasyonunun toksik bir etkiye sahip olabileceğini göstermişlerdir (Yusuf vd., 2011).

Çizelge 3.9. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalarına göre kök kuru ağırlığı (g) (Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm H ₃ BO ₃	30 ppm H ₃ BO ₃	60 ppm H ₃ BO ₃	90 ppm H ₃ BO ₃	120 ppm H ₃ BO ₃
0 µM	0.22±0.04	0.33±0.05	0.24±0.02	0.28±0.05	0.31±0.03
0.01 µM	0.25 ±0.06	0.24±0.03	0.28±0.05	0.24±0.05	0.24±0.02
0.5 µM	0.30±0.04	0.37±0.05	0.29±0.02	0.25±0.03	0.25±0.02
1 µM	0.21±0.03	0.23±0.03	0.24±0.02	0.28±0.04	0.26±0.02

3.2.2. Bor analizi bulguları

Yapılan bor analizi, artan dozlarda uygulama H₃BO₃ ile bitkideki bor miktarının da arttığını ve bitkinin deney sürecinde uygulanan H₃BO₃'i bünyesine aldığını göstermiştir. Lordkaew vd. (2011), mısır bitkisine kontrol, 20 ppm bor dozları uygulamışlar ve 20 ppm bor uygulamalı bitkilerde B içeriği ve konsantrasyonunu kontrol dozuna göre daha yüksek bulmuşlardır. Bagheri vd. (1994), *Pisum sativum*'a kontrol, 20, 40 ve 60 ppm dozlarında B uygulamışlar ve ICP spektroskopisi ile yapılan

ölçümlere göre artan bor dozlarına paralel olarak borun bitki bünyesine girdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, 30 ppm ve 120 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde hiçbir 24-epiBL konsantrasyonu borun bitki bünyesine alımında bir azalma sağlamamıştır. Kontrol (0 ppm) bitkilerinde 24-epiBL sırasıyla 0.5 µM>0.01 µM>1 µM konsantrasyonlarında bitkideki bor miktarını azaltmıştır ve bu azalış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. 60 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 0.01 µM 24-epiBL uygulaması bor miktarında istatistikî olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. 90 ppm H₃BO₃ uygulanan bitkilerde 0.5 µM 24-epiBL uygulaması bor miktarında istatistiki olarak anlamlı bir azalış göstermiştir (Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.10. Bitki örneklerinde bor içeriği (ICP-AES cihazı ile yapılan analiz bulguları) (ppb)
(Ortalama ± Standart hata)

24-epiBL	0 ppm B	30 ppm B	60 ppm B	90 ppm B	120 ppm B
0 µM	67.95±14.18 ^b	316.35±21.96 ^a	825±23.96 ^b	1197.5±9.52 ^b	1217±19.62 ^a
0.01µM	25.98±3.92 ^a	364.60±3.57 ^{ab}	516±0.46 ^a	1340.5±35.50 ^c	1990±10.39 ^c
0.5µM	24.85±2.80 ^a	329.55±11.92 ^b	949.90±7.33 ^b	1055.3±70.84 ^a	1535.5±4.33 ^b
1µM	26.62±2.81 ^a	718.55±3.60 ^c	1498.50±86.31 ^c	2284.5±12.41 ^d	2607±67.54 ^d

3.2.3. Saksıda yetiştirilen bitkilerde RAPD analizi bulguları

3.2.3.1. Saksıda yetiştirilen bitkilerde DNA izolasyonu

Uygulamalara göre bitki örneklerinin numaralandırılması ve elde edilen DNA'ların saflıkları belirlenmiştir (Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür) (Çizelge 3.11.). İzolasyonu yapılan DNA'ların %1'lik jel üzerindeki görünüşleri ise Şekil 3.17.'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Bitkiciklerden izole edilen DNA'ların uygulamalara göre numaralandırılması ve DNA'ların saflıkları

Borik asit ve 24-epiBL Uygulamaları	No	A260	A280	A260/A280	DNA miktarı (stok) ng/µl
Kontrol (0 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL)	1	0.047	0.040	1.175	310.2
0 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	2	0.060	0.058	1.034	396
0 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	3	0.062	0.059	1.050	409.2
0 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	4	0.082	0.080	1.025	541.2
30 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	5	0.061	0.060	1.016	402.6
30 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	6	0.058	0.057	1.017	382.8
30 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	7	0.041	0.039	1.051	270.6
30 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	8	0.039	0.037	1.054	257.4
60 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	9	0.061	0.060	1.016	402.6
60 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	10	0.015	0.014	1.071	99
60 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	11	0.013	0.011	1.181	85.8
60 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	12	0.016	0.015	1.066	105.6
90 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	13	0.011	0.010	1.1	72.6
90 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	14	0.048	0.035	1.371	316.8
90 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	15	0.021	0.019	1.105	138.6
90 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	16	0.020	0.019	1.052	132
120 ppm H ₃ BO ₃ + 0 µM 24-epiBL	17	0.014	0.013	1.076	92.4
120 ppm H ₃ BO ₃ + 0.01 µM 24-epiBL	18	0.017	0.015	1.133	112.2
120 ppm H ₃ BO ₃ + 0.5 µM 24-epiBL	19	0.036	0.034	1.058	237.6
120 ppm H ₃ BO ₃ + 1 µM 24-epiBL	20	0.041	0.039	1.051	270.6



Şekil 3.17. Saksıda torfta yetiştirilen bitkilerden izole edilen DNA'lar

20 DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PCR analizlerinde 48 primer denenmiştir fakat bunlardan sadece 5 tanesi (OPA-2, OPB-10, OPM-11, OPM-13, OPW-7) polimorfik bantlar vermiştir (Çizelge3.12.).

Çizelge 3.12. Saksıda yetiştirilen bitki örneklerine ait RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri

No	Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm (%)
1	OPA-1	2000, 1800, 1000, 900, 500, 450	6	6	0	0
2	OPA-2	1600, 1500, 1100*, 1000*, 900, 850*, 800*, 750*, 650, 600*, 550*, 500*, 350	13	5	8	61.5
3	OPB-1	1500*, 1000*, 750, 500, 450, 400	6	4	2	33.3
4	OPB-2		0	0	0	0
5	OPB-3	1750, 1500, 1400, 900, 750, 650, 450, 350, 300	9	9	0	0
6	OPB-4	1500*, 1250, 750, 650, 600, 500, 400	7	6	1	14.2
7	OPB-5	1850*, 1500, 1000, 850*, 750, 575, 500, 250*	8	5	3	37.5
8	OPB-6	1500, 1450*, 1400, 900, 750, 650, 500, 350	8	7	1	12.5
9	OPB-7	1350*, 1000, 900, 750, 650*, 600, 350*	7	4	3	42.8
10	OPB-8	1500*, 1250, 1000, 750, 650*, 500, 350, 300*	8	5	3	37.5
11	OPB-9		0	0	0	0

Çizelge 3.12. (devam)

12	OPB-10	1850*, 1500, 1400, 1300*, 1000, 900*, 750, 550*, 500, 450*, 300*	11	5	6	54.5
13	OPB-11	2500, 2000, 1500, 1000, 750*	5	4	1	25
14	OPB-12	2000*, 1800, 1750*, 1500, 750, 600, 400	7	5	2	28.5
15	OPB-13		0	0	0	0
16	OPB-14	2750*, 2500*, 2000, 1500, 1000, 900, 650	7	5	2	28.5
17	OPB-15	2000, 1600, 1500, 1400, 1100, 900, 750, 510, 350*, 300*	10	8	2	20
18	OPB-16		0	0	0	0
19	OPB-17	1800, 1750, 1500, 900, 850, 750, 350, 300*	8	7	1	12.5
20	OPB-18	1500*, 1100, 800, 750, 675, 650, 500, 300*	8	6	2	25
21	OPB-19	1850, 750, 350, 300	4	4	0	0
22	OPB-20	3000*, 1800*, 1000, 800, 750, 500, 300	7	5	2	28.5
23	OPC-4	2500*, 1650, 1600* , 1500, 1425, 1000	6	4	2	33.3
24	OPC-5	1750, 1200, 800, 750*	4	3	1	25
25	OPD-8	1100, 1000, 900, 800, 400, 350	6	6	0	0

Çizelge 3.12. (devam)

26	OPH-18	1600*, 1500, 1400*, 1000, 900	5	3	2	40
27	OPM-1	2000*, 1500, 1450, 1100*, 1000, 950, 675, 550*, 500, 450	10	7	3	30
28	OPM-2		0	0	0	0
29	OPM-3		0	0	0	0
30	OPM-4	1450, 1200, 900, 750, 650, 350*	6	5	1	16.6
31	OPM-5	1400, 1000, 975, 750, 500	5	5	0	0
32	OPM-6	1500, 1000, 900*, 650, 600, 550, 450	7	6	1	14.2
33	OPM-7	1600, 1500, 1400, 1300, 1100, 1000, 750, 675, 500, 350	10	10	0	0
34	OPM-8	1000, 500, 350	3	3	0	0
35	OPM-9		0	0	0	0
36	OPM-10		0	0	0	0
37	OPM-11	1800*, 1750, 1500*, 1000, 750*, 550, 400*	7	3	4	57.1
38	OPM-12	1100*, 1000, 900, 850, 750*, 650, 600*, 500*, 400	9	5	4	44.4
39	OPM-13	1500, 1400*, 1350*, 1100, 900, 870*, 850*, 500, 340*, 300*	10	4	6	60

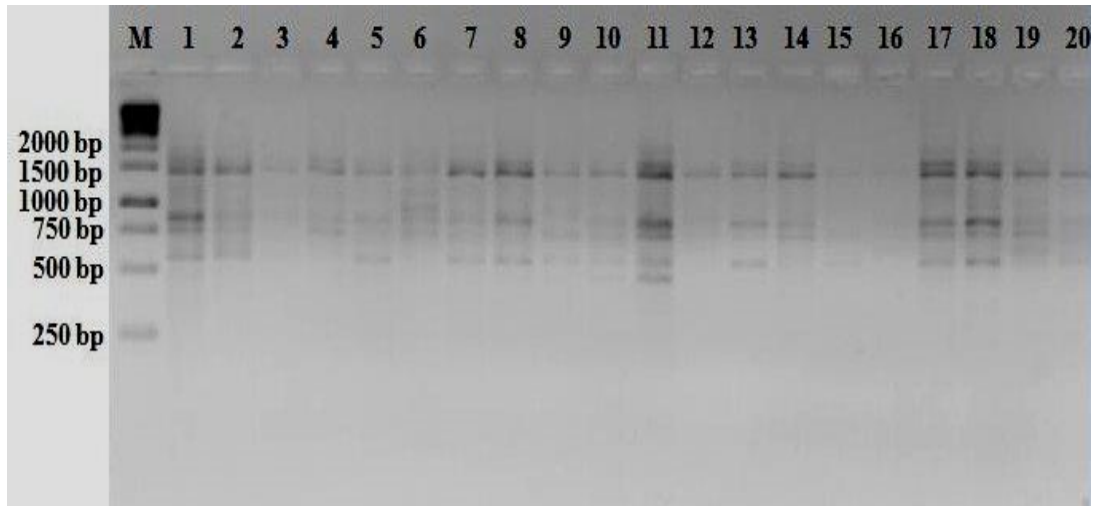
Çizelge 3.12. (devam)

40	OPM-14	1500,1100*, 1000, 750, 500, 375, 300	7	6	1	14.2
41	OPM-15		0	0	0	0
42	OPM-16	2000*, 1875, 1450, 1100, 750, 670	6	5	1	16.6
43	OPM-17	1100, 1000, 850*, 750*, 500, 470	6	4	2	33.3
44	OPM-18	1850*, 1700, 1500, 1100, 900, 850, 750, 700, 675*, 500, 475	11	9	2	18.1
45	OPM-19		0	0	0	0
46	OPW-1	2000, 1100*, 800	3	2	1	33.3
47	OPW-5	1750, 700*, 500*, 450*, 400, 350*, 300	7	3	4	57.1
48	OPW-7	1200, 1000*, 900*, 800, 750*, 650*, 610*, 450*, 310*	9	2	7	77.7
TOPLAM			276	195	81	

*Polimorfik PCR bandı

Çalışmamızda kullanılan 48 primerden 10 tanesinden (OPB-2, OPB-9, OPB-13, OPB-16, OPM-2, OPM-3, OPM-9, OPM-10, OPM-15, OPM-19) PCR ürünü alınmamıştır. Uygulanan 38 primerden 31'i (%81.5) DNA örneklerinde polimorfik RAPD-PCR ürünleri verirken 7'si (%18.4) ise monomorfik PCR bantları vermiştir. Toplam 276 adet amplifikasyon ürünü elde edilmiş olup bu ürünlerin 81 tanesinin polimorfik (%29.34) ve 195 tanesinin monomorfik (%70.65) olduğu tespit edilmiştir. En çok bantı OPA-2 (13 bant) primeri verirken en az bant OPM-8 ve OPW-1 (3 bant) primerlerinde gözlenmiştir. En büyük bant ağırlığına sahip PCR ürünü 3000 bp olarak OPB-20 primerinde gözlenirken en düşük bant ağırlığına sahip PCR ürünü 250 bp olarak OPB-5 primerinde tespit edilmiştir.

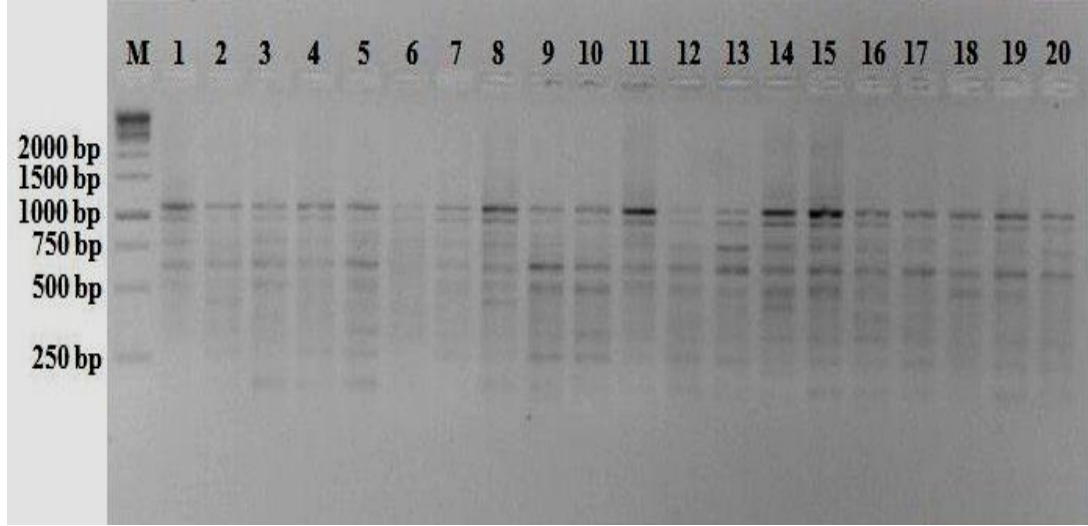
OPA-2 primeri ile 20 bitki örneği kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 350-2000 bp arasında 11 bant elde edilmiştir. Bu 11 banttan 1800 ve 1500 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde ortak olarak görülmüştür. Ayrıca 1000 bp'de 30 ppm H₃BO₃ (5) ve 120 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (18) uygulanan örneklerde ve 350 bp'de 30 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (6) ve 60 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (11) uygulanan örneklerde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. OPA-2 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPB-10 primeri ile 20 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-3000 bp aralığında 16 bant elde edilmiştir. Bu 16 banttan 1050, 750, 650 bp uzunluğundaki bantlar tüm örneklerde

ortak olarak görülmüştür. Ayrıca 3000, 2000 ve 250 bp'lik bantlar karakteristik olarak 90 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (14) ve 90 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (15) uygulanan bitkilerde görülürken, 1500 bp sadece 90 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (14) uygulanan bitkilerde ve 1250 bp sadece 90 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (15) uygulanan bitkilerde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.19.).

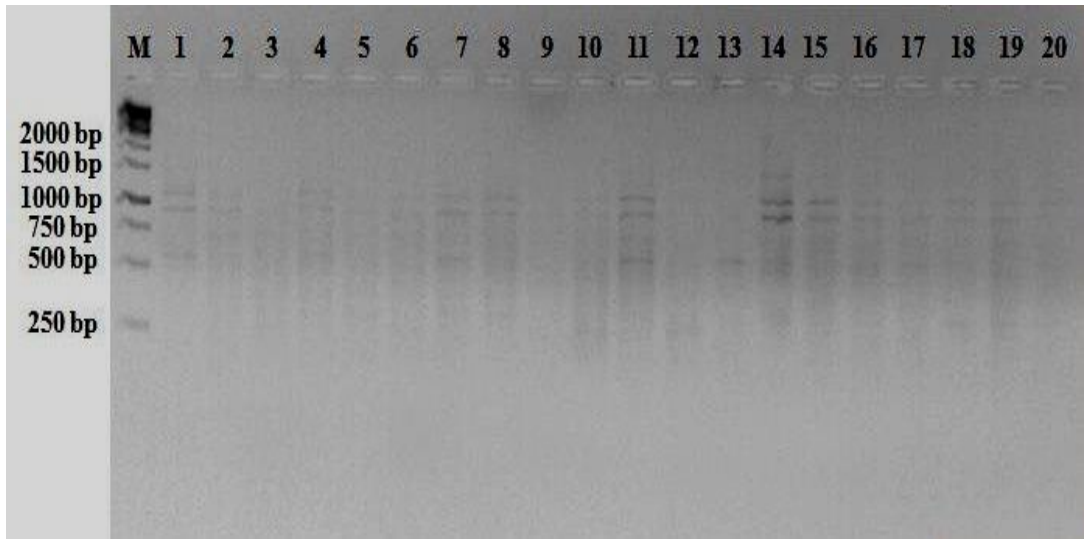


Şekil 3.19. OPB-10 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

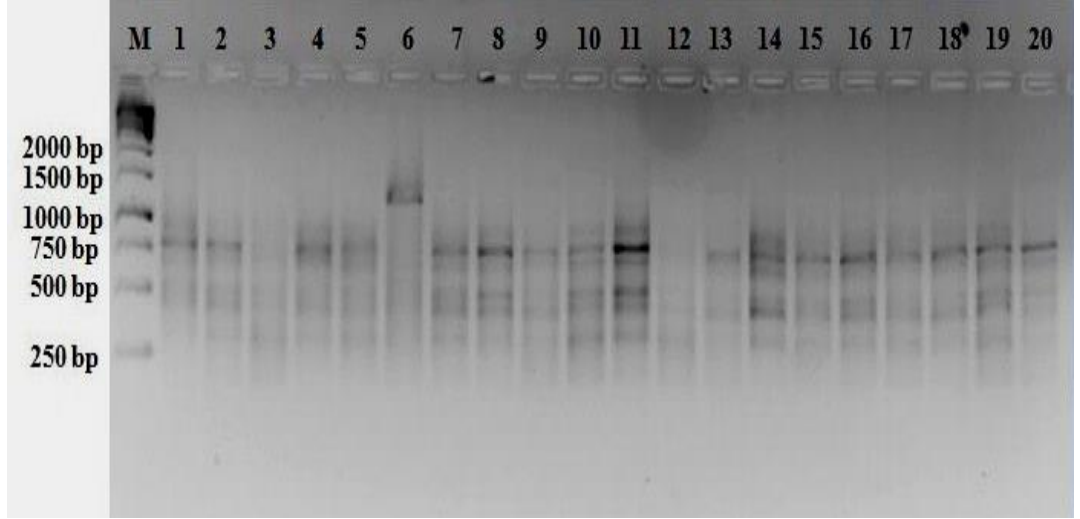
OPM-11 primeri ile 20 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-1350 bp arasında 9 bant elde edilmiştir. Bu 9 banttan tüm örneklerde ortak olarak bir bant görülmemiştir. Ayrıca 1350 bp'de 90 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL, 1250 bp'de kontrol (1), 750 bp'de 60 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL, 90 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (14) ve 90 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (15), 350 bp'de 120 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (18), 120 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL(19) ve 120 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (20) , 300 bp'de 60 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL(12), 250 bp'de 60 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (10) uygulanan bireylerde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.20.).

OPM-13 primeri ile 20 örnek kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-2000 bp arasında 12 bant elde edilmiştir. Bu 12 banttan 760, 740, 550, 300 bp uzunluğundaki bantlar tüm

örneklerde ortak olarak gözlenmiştir. Ayrıca 2000 bp’de sadece kontrol (1) ve 30 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL(6), 1500 bp’de sadece kontrol (1), 0.01 µM 24-epiBL (2) ve 120 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (20), 1450 bp’de sadece 60 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (12), 1400 bp’de kontrol(1) ve 30 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (6), 1250 bp’de sadece 30 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (6), 250 bp’de sadece 60 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (11), 200 bp’de sadece 60 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL (10), 60 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL(11), 120 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL (19) ve 120 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL (20) uygulanan bitki örneklerinde karakteristik bantlar saptanmıştır (Şekil 3.21.).



Şekil 3.20. OPM-11 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

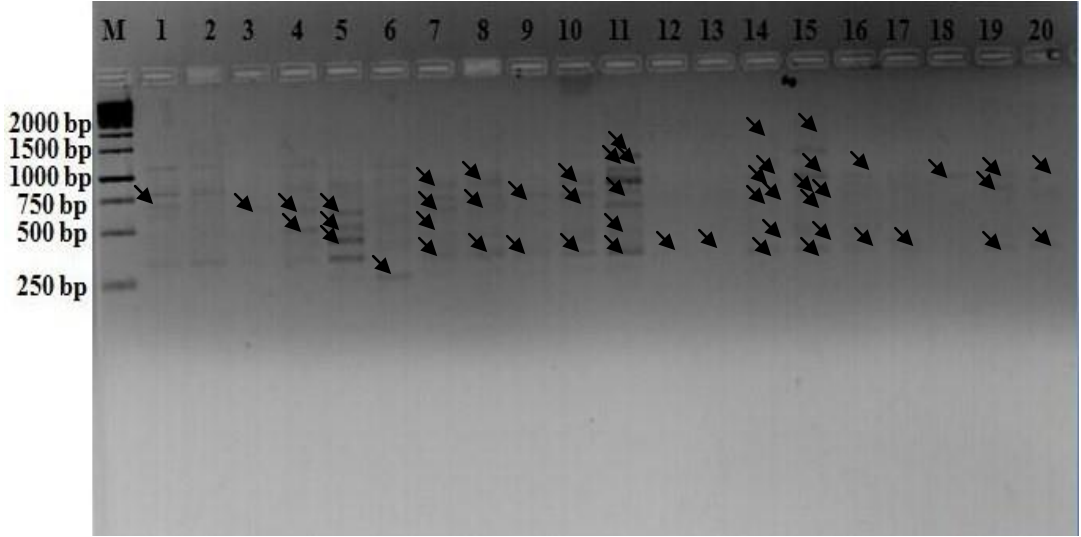


Şekil 3.21. OPM-13 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

OPW-7 primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüleri değerlendirildiğinde 250-2300 bp arasında 13 bant elde edilmiştir. Bu 13 banttan tüm örneklere karakteristik bir bant saptanmamıştır. Ayrıca 2300 bp'lik bant sadece 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL(14) ve 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL(15) uygulamalı örneklerde görülürken, 680 ve 1800 bp'lik bant profilleri sadece 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) uygulanan örneklerde görülmüştür. Bununla beraber 2000 bp'lik bant profili 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (14) ve 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) bitki örneklerine karakteristiktir. Aynı zamanda bu bant 60 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11) örnekte de belirlenmiştir. Ayrıca bor ve epiBL uygulamaları ile kaybolan veya yeni görülen bantlar da Şekil 3.22. üzerinde ok ile gösterilerek belirtilmiştir. OPW-7 primeri için elde edilen polimorfik bantlar kontrole (1) kıyasla 0.01 μM 24-epiBL (2) uygulamalı örnekte 700 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuştur. 0.5 μM 24-epiBL (3) uygulamalı örnekte 700 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuştur ve 650 bp büyüklüğünde bant ortaya çıkmıştır. 1 μM 24-epiBL (4) uygulamalı örnekte 700 bp büyüklüğündeki bant tekrar ortaya çıkarken 500 bp büyüklüğünde bir bant daha gözlenmiştir. 30 ppm H_3BO_3 (5) uygulamalı örnekte 400 bp büyüklüğünde bir bant ortaya çıkmıştır. 30 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (6) uygulamalı örnekte 250 bp büyüklüğünde bir bant belirlenirken ve 400 bp, 500 bp, 650 bp ve 700 bp büyüklüğündeki bantlar kaybolmuştur. 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) uygulamalı örnekte 1000 bp, 750 bp, 650 bp ve 350 bp büyüklüğündeki bantlar ortaya çıkmıştır. 30 ppm H_3BO_3 +

1 μM 24-epiBL (8) uygulamalı örnekte ise 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7) uygulamalı örnekten farklı olarak 650 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuştur. 60 ppm H_3BO_3 (9) uygulamalı örnekte ise 1000 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuştur. 60 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10) uygulamalı örnekte tekrar 1000 bp , 750 bp ve 350 bp büyüklüğündeki bantlar gözlenmiştir. 60 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11) uygulamalı örnekte 1250 bp, 1000 bp, 900 bp , 750 bp, 500 bp ve 350 bp büyüklüğündeki bantlar ortaya çıkmıştır. 60 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12) ve 90 ppm H_3BO_3 (13) uygulamalı örneklerde tüm bantlar kaybolmuş sadece 350 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir. 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (14) ve 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (15) uygulamalı örneklerde 2000 bp, 1250 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 450 bp ve 350 bp büyüklüğünde bantlar ortaya çıkmıştır. 90 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16) uygulamalı örnekte bu bantlardan sadece 1000 bp ve 350 bp büyüklüğünde olan bantlar kalırken 120 ppm H_3BO_3 (17) uygulamalı örnekte sadece 350 bp büyüklüğünde olan bant, 120 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (18) uygulamalı örnekte 750 bp boyutunda olan bant, 120 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (19) uygulamalı örnekte 750 bp, 650 bp ve 350 bp büyüklüğünde olan bantlar ve 120 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (20) uygulamalı örnekte ise 750 bp ve 350 bp büyüklüğünde olan bantlar görünmektedir (Şekil 3.22.).

Bant profillerindeki bu değişim bor ve 24-epiBL'nin DNA üzerinde bir varyasyona sebep olmuş olabileceklerini göstermektedir.



Şekil 3.22. OPW-7 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Jaccard similarity programı ile hesaplanarak oluşturulan benzerlik indeksi tablosu Çizelge 3.13'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en düşük oran (0.385) kontrol (0 ppm B + 0 µM 24-epiBL) ve 60 ppm B + 1 µM 24-epiBL uygulanan bitkiler arasında tespit edilmiştir. En yüksek benzerlik indeksi ise 0.774 ile 120 ppm B + 0.5 µM 24-epiBL ve 120 ppm B + 0.01 µM 24-epiBL uygulanan bitkiler arasında bulunmuştur.

Uygulamalı bitkiler arasındaki uzaklıkları gösteren dendrogram, farklı sayıda bitki örneklerini içeren 2 ana gruba ayrılmıştır (Şekil 3.23.).

Grup A: 6. 30 ppm B + 0.01 µM 24-epiBL uygulanan bitkileri içermektedir.

Grup B: 1. Kontrol (0 ppm H₃BO₃ + 0 µM 24-epiBL)

2. 0.01 µM 24-epiBL

3. 0.5 µM 24-epiBL

4. 1 µM 24-epiBL

5. 30 ppm H₃BO₃

7. 30 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL

8. 30 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL

9. 60 ppm H₃BO₃

10. 60 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
11. 60 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
12. 60 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL
13. 90 ppm H_3BO_3
14. 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
15. 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
16. 90 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL
17. 120 ppm H_3BO_3
18. 120 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL
19. 120 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL
20. 120 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL uygulanan bitkilerden oluşmaktadır.

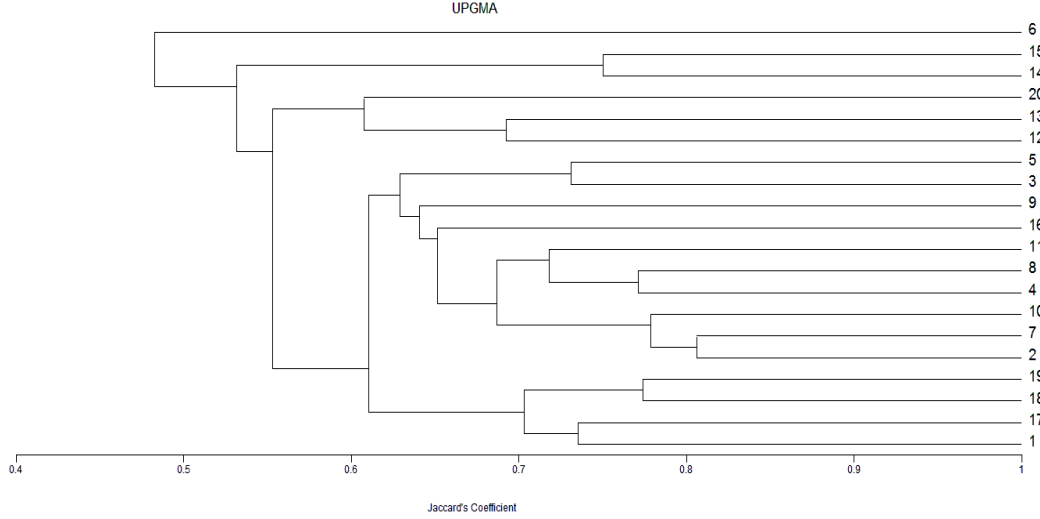
Birinci grup olan Grup A 30 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (6) uygulanan bitkileri içerirken diğer grup iki farklı gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri tekrar kendi içinde iki gruba ayrılarak 90 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (14) ve 90 ppm H_3BO_3 + 0,5 μM 24-epiBL (15) uygulanan bitkilerden oluşurken diğer grup da kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan biri 60 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (12) ve 90 ppm H_3BO_3 (13) ve 120 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (20) uygulanan bitkileri içerirken diğer grup ise kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan biri 30 ppm H_3BO_3 (5), 60 ppm H_3BO_3 (9), 0.01 μM 24-epiBL (2) , 0.5 μM 24-epiBL (3), 1 μM 24-epiBL (4), 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (7), 30 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL(8), 60 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (10), 60 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (11) ve 90 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL (16), uygulanan bitkilerden oluşurken diğer grup kontrol, 120 ppm H_3BO_3 (17), 120 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL (18) ve 120 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL (19) uygulanan bitkilerden oluşmuştur.

Çizelge 3.13. Saksıda yetiştirilen farklı konsantrasyonlarda H₃BO₃ ve 24-epiBL uygulamalı 20 günlük bitkilerin RAPD analizi sonucunda ulaşılan benzerlik indeksi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1.000																			
2	0.703	1.000																		
3	0.514	0.667	1.000																	
4	0.615	0.667	0.563	1.000																
5	0.568	0.667	0.731	0.618	1.000															
6	0.553	0.474	0.484	0.436	0.545	1.000														
7	0.595	0.806	0.704	0.647	0.645	0.486	1.000													
8	0.667	0.771	0.576	0.771	0.629	0.526	0.706	1.000												
9	0.556	0.606	0.654	0.656	0.548	0.531	0.690	0.618	1.000											
10	0.605	0.758	0.714	0.758	0.656	0.421	0.800	0.667	0.700	1.000										
11	0.643	0.650	0.556	0.692	0.605	0.476	0.632	0.744	0.595	0.684	1.000									
12	0.385	0.457	0.577	0.457	0.484	0.424	0.516	0.432	0.517	0.531	0.462	1.000								
13	0.514	0.559	0.593	0.559	0.548	0.531	0.633	0.571	0.643	0.645	0.595	0.692	1.000							
14	0.543	0.545	0.487	0.619	0.537	0.422	0.524	0.591	0.564	0.571	0.682	0.439	0.564	1.000						

Çizelge 3.13. (devam)

15	0.500	0.533	0.439	0.643	0.488	0.413	0.512	0.651	0.512	0.523	0.596	0.364	0.476	0.750	1.000					
16	0.629	0.636	0.630	0.688	0.633	0.471	0.667	0.647	0.621	0.733	0.538	0.452	0.567	0.512	0.575	1.000				
17	0.735	0.697	0.586	0.600	0.645	0.529	0.625	0.611	0.581	0.688	0.632	0.469	0.690	0.524	0.477	0.724	1.000			
18	0.676	0.639	0.485	0.639	0.588	0.486	0.571	0.649	0.625	0.583	0.625	0.429	0.625	0.558	0.511	0.559	0.719	1.000		
19	0.686	0.600	0.533	0.600	0.594	0.486	0.625	0.611	0.531	0.636	0.632	0.469	0.633	0.524	0.477	0.613	0.733	0.774	1.000	
20	0.579	0.629	0.567	0.583	0.529	0.472	0.606	0.639	0.515	0.571	0.537	0.548	0.667	0.512	0.500	0.594	0.606	0.600	0.656	1.000



Şekil 3.23. Saksıda torfta yetiştirilen 20 günlük bitkilerin RAPD analizi dendogramı

Perlitte ve saksıda yetiştirilen bitkilerin RAPD analizi bulgularına ait sonuçlar tartışma ile birlikte verilmiştir.

Perlitte yetiştirilen bitkiler ile yapılan RAPD denemeleri sonucu elde edilen verilerle oluşturulan dendogram analizleri 0.863'lük benzerlik indeksiyle 150 ppm H_3BO_3 ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL uygulamalarında yakınlık göstermiştir, 0.508'lik benzerlik indeksiyle kontrol (0 ppm B + 0 μM 24-epiBL) ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL uygulamaları birbirine uzak bulunmuştur (Çizelge 3.3.). 0.842'lik benzerlik indeksiyle 100 ppm H_3BO_3 ve 100 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL uygulamaları birbirine yakın bulunurken, 0.542'lik benzerlik indeksiyle 0.5 μM 24-epiBL ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL birbirinden uzak bulunmuştur (Çizelge 3.3.) Yine 0.790'lık benzerlik indeksiyle 50 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL ve 50 ppm H_3BO_3 + 1 μM 24-epiBL uygulamaları birbirine yakın bulunurken, 0.583'lük benzerlik indeksiyle 0.01 μM 24-epiBL ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL uygulamaları birbirinden uzak bulunmuştur (Çizelge 3.3.).

Saksıda yetiştirilen bitkiler ile yapılan RAPD denemeleri sonucu elde edilen verilerle oluşturulan dendogram analizleri 0.800'lük benzerlik indeksiyle 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL ve 60 ppm H_3BO_3 + 0.01 μM 24-epiBL uygulamaları birbirine yakın görülürken, 0.413'lük benzerlik indeksiyle 30 ppm B + 0.01 μM 24-epiBL ve 90 ppm H_3BO_3 + 0.5 μM 24-epiBL uygulamaları birbirinden uzak bulunmuştur (Çizelge 3.13.). 0.771'lik benzerlik indeksiyle 1 μM 24-epiBL ve 60 ppm H_3BO_3

uygulamaları birbirine yakın bulunurken, 0.457'lik benzerlik indeksiyle 0.01 µM 24-epiBL ve 60 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL uygulamaları birbirine uzak bulunmuştur (Çizelge 3.13.). 0.733'lük benzerlik indeksiyle 120 ppm H₃BO₃ ve 120 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL uygulamaları birbirine yakın görülürken, 0.588'lik benzerlik indeksiyle 30 ppm H₃BO₃ ve 120 ppm H₃BO₃ + 0.01 µM 24-epiBL uygulamaları birbirine uzak bulunmuştur (Çizelge 3.13.).

Genlerin baz dizilimleri üzerinde meydana gelebilecek bir bozulma ve/veya değişim, hücrelerde bu genin ifadesini olumlu ya da olumsuz etkileyebilmektedir. Özellikle büyüme ve gelişme faktörlerini (enzim, hormon) ifade eden genlerin toksisite gibi etkenlerle olumsuz olarak etkilenmesi ya da genin ifadesinin daha iyi yönde etkilenmesi, hücre, doku ve organların büyüme ve gelişmesini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilir (Inomata vd., 1995; Britten, 1996). Bu tez çalışmasında, artırılan konsantrasyonlarda bor ve epibrassinolidin DNA üzerinde varyasyona sebep olabilecek etkinin belirlenmesi amacıyla uygulamalar yapılmış ve örneklerde RAPD ile bant profilleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar bu varyasyonları göstermiştir. Agaroz jel üzerinde değerlendirilen RAPD bant profilleri, kontrol grubu ile karşılaştırılan örneklerde bor toksisitesinin DNA üzerinde bir takım baz değişimlerine yol açmış olabileceği epibrassinolidin de etkisi olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

Perlitte yetiştirilen bitkilerde yapılan RAPD denemelerinde, en fazla bant OPA-2 primerinden (12 bant, %58.3 polimorfizm) elde edilmiştir. Bununla beraber OPM-12 ve OPW-7 primerleri %77.7 ile en yüksek polimorfizm göstermiştir (Çizelge 3.2.).

Saksıda yetiştirilen bitkilerde yapılan RAPD denemelerinde, en fazla bant OPA-2 primerinden (13 bant, %61.5 polimorfizm) elde edilmiştir. Bununla beraber OPW-7 primeri %77.7 ile en fazla polimorfizm oranı göstermiştir (Çizelge 3.12.).

Sunar vd. (2009), *Verbascum speciosum*'un metanol ekstraktının *Zea mays* üzerindeki genotoksik etkisini RAPD ile araştırmışlardır. Sonuç olarak bant profilleri ekstraktların DNA'da hasara yol açtığını bant profillerini değerlendirerek belirlemişlerdir. Mısır fideleri üzerine bir herbisit olan 2.4-dichloro phenoxy acetic acid (2.4-D)'in genotoksik etkisini RAPD tekniğini kullanarak araştıran Aksakal vd. (2012), GTS sonuçları ile artan 2.4-D konsantrasyonlarında genotoksik etkinin de arttığını göstermişlerdir. Sakçalı vd. (2013), mısır bitkilerini kontrol, 5, 10, 25, 50,

100, 125 ve 150 ppm dozlarında bor'a maruz bırakmışlar ve toksisiteyi RAPD tekniği kullanarak araştırmışlardır. GTS sonuçlarına göre borun en toksik etkisi 100 ve 125 ppm B uygulanan bitkilerde görülmüşken bunu sırasıyla 50, 25, 150, 5, 10 ppm uygulamalı bitkiler izlemiştir. Bu sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Erturk vd. (2013), mısır bitkisine 5, 10, 20 ve 40 mM ZnSO₄ ve 5, 10, 20 ve 40 mM H₃BO₃ uygulamışlar ve toksisiteyi tespit etmek için RAPD tekniğini kullanmışlardır. GTS sonuçlarına göre B ve Zn konsantrasyonu arttıkça toksisitenin de arttığını belirtmişlerdir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilindiği gibi borlu topraklar tarımsal üretimi sınırlamakta ve verimde kayıplara sebep olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda borun toksik etkisine karşı yeni bir hormon sınıfı olan brassinosteroidlerden 24-epiBL'nin iyileştirici etkisi olup olmadığı araştırılmak istenmiştir. Tarım ürünleri içerisinde ekonomik değeri yüksek olan mısıra bor ve 24-epiBL uygulamaları yapılarak konu araştırılmıştır.

Saksıda yetiştirilen bitki örneklerinde yapılan bor analizi sonucunda artan bor dozlarına bağlı olarak bitki bünyesindeki bor miktarının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca bu bitkilerde büyüme biyomarkırları (bitki boyu, kök boyu, bitki yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı, bitki kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı)'nın kontrol, 30, 60 ve 90 ppm bor dozlarında 0.5 ve 1 μ M 24-epiBL uygulamasının iyileştirici etkileri gözlenirken; 120 ppm dozunda 24-epiBL uygulamasının iyileştirici hiçbir etkisi gözlenmemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda borik asit ve 24-epibrassinolid uygulanmış perlitte yetiştirilen 20 günlük bitkilerden izole edilen DNA'lar ile 48 adet primer kullanılarak gerçekleştirilen RAPD denemeleri sonucu elde edilen verilerle oluşturulan dendogram analizleri 0.872'lik benzerlik indeksiyle en yakın 1 μ M 24-epiBL ve 50 ppm H_3BO_3 uygulamalarını, 0.450'lik benzerlik indeksiyle en uzak kontrol (0 ppm B + 0 μ M 24-epiBL) ve 150 ppm H_3BO_3 + 0.01 μ M 24-epiBL uygulamalarını göstermiştir (Çizelge 3.3). Bu da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek bor uygulamasının, bitki genomunda bir takım varyasyonlara sebep olabileceğini göstermektedir. Saksı denemelerinde ise, 0.806'lik benzerlik indeksiyle en yakın 0.01 μ M 24-epiBL ve 30 ppm H_3BO_3 + 0.5 μ M 24-epiBL uygulamalarını, 0.385'lik benzerlik indeksiyle en uzak kontrol (0 ppm B + 0 μ M 24-epiBL) ve 60 ppm H_3BO_3 + 1 μ M 24-epiBL uygulamalarını, göstermiştir (Çizelge 3.13.). Diğer taraftan artırılan konsantrasyonlarda 24-epiBL (0.01, 0.5 ve 1 μ M) uygulanan örneklerle yapılan RAPD PCR ürünlerinin agaroz jelde bant profilleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem saksı hem de perlit çalışmalarında polimorfik bantlar ve bu bantların değerlendirilmesiyle polimorfizm belirlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi DNA üzerinde meydana gelebilecek varyasyonlar bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyebileceği gibi bunun tersi de söz konusu olabilir (Inomata vd.,

1995; Britten, 1996). Bu bağlamda elde edilen RAPD sonuçları 24-epiBL uygulamalarının bitki genomunda bir varyasyon meydana getirmiş olabileceğini ve bu varyasyonun olumlu nitelikte olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda bant profillerine bakıldığında da bor ve 24-epiBL'nin DNA üzerinde birtakım varyasyonlara sebep olmuş olabileceği görülmektedir.

Mevcut veriler daha önce yapılmış benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, yüksek konsantrasyonda bor uygulamalarına karşı bitki genomuna özgü birtakım varyasyonel yanıtlar gerçekleşebilir olduğu doğrulanmış olur. Yüksek oranda bor uygulamasının bitki genomu üzerindeki varyasyonlarına yönelik ilk çalışma, 1929 yılında Haas tarafından meyve ağaçları üzerinde yapılmıştır. İlerleyen dönemlerde, pek çok araştırmacı benzer uygulamaları farklı bitki türleri üzerinde; Oertli ve Roth (1969), şeker pancarı, pamuk ve soya üzerinde, Francois ve Clark (1979) yirmi beş farklı süs bitkisi üzerinde, Bagheri vd. (1996) bezelye üzerinde incelemiştir. Bütün bu çalışmalar, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan bora karşı bitkinin, büyümede gerileme ve/veya bor toksik semptomlarının görülmesi ile yanıt verdiğini tanımlamıştır. Ayrıca bu çalışmalar, bora yüksek toleranslı bitkilerde her hangi bir etkinin olmadığını, diğer taraftan bora yüksek hassasiyet gösteren bitkilerde de ölümlerin gerçekleşebileceğini göstermiştir (Nable vd., 1997).

Diğer taraftan, 30 gün süren saksı denemelerine ait dendogram analizleri incelendiğinde, 0.364'lik benzerlik indeksiyle en uzak 90 ppm H₃BO₃ + 0.5 µM 24-epiBL ve 60 ppm H₃BO₃ + 1 µM 24-epiBL uygulamaları arasındaki ilişki göze çarpmaktadır (Çizelge 3.13). PCR ürünlerinin agaroz jel analizleri ile görüntülenen bant profilleri neticesinde oluşturulan benzerlik indeksine göre 24-epiBL konsantrasyonu iki katına çıktığında belirgin bir polimorfizm görülmüştür. Brassinosteroidler, hücre bölünmesi ve büyümesinde görevli anahtar büyüme düzenleyicileridirler (Haubrick, 2006) ve bu bağlamda uygulanan konsantrasyon, bitki hücrelerinin büyüme ve bölünmeye teşvik edilmesinde önem arz edeceğinden 24-epiBL uygulanan bitkinin genomu üzerinde varyasyonel bir etki oluşturabilir. Bu çalışmada bor ve 24-epiBL uygulamalarının bitki genomu üzerindeki varyasyonel etkileri RAPD primerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna yönelik yapılan diğer çalışmalardan Sakçalı vd. (2013) mısır bitkisi üzerinde borun toksik etkisini değerlendirirken RAPD, Xu vd. (2001) lahanaya bitkisi üzerinde bor etkisinin

değerlendirilmesinde RFLP ve AFLP, yine Kekeç vd. (2010) buğday ve fasulye'de boru RAPD primerleriyle değerlendirmişlerdir.

Mevcut çalışma ve literatürde yer alan çalışmalar, bor ve 24-epiBL'nin farklı konsantrasyonlarının, bitki büyüme, gelişme, çiçeklenme, tohum çimlenmesi gibi fizyolojik olayları üzerinde etkisinden dolayı bitki genomu üzerinde varyasyonlar oluşturabileceğini doğrular niteliktedir, ayrıca, bu varyasyonel değişikliklerin tanımlanmasında ve değerlendirilmesinde RAPD gibi moleküler markör sistemlerinin verimli bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir.

Mısır bitkisinde bor toksisitesi ile ilgili temel bir araştırma olan bu çalışmanın gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agami, R.A. (2013) Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide, *South African Journal of Botany*, 88: 171-177.
- Ahlawat, A., Katoch, M., Ram, G. ve Ahuja, A. (2010) Genetic diversity in *Acorus calamus* L. as revealed by RAPD markers and its relationship with b-asarone content and ploidy level, *ScientiaHorticulturae*, 124: 294-297.
- Ahmad, M.A., Gaur, R. ve Gupta, M. (2012) Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers, *Journal of Hazardous Materials*, 217-218: 141-148.
- Akgöl, M. ve Rencüzoğulları, E. (2013) Sabinene'in genotoksik etkisinin RAPD-pcr ile saptanması, *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 29-2: 1-12.
- Aksakal Ö., Aygün Ertürk F., Sunar S., Bozari S. ve Agar G. (2012) Assessment of genotoxic effects of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis, *Industrial Crops and Products*, 42: 552- 557.
- Anna J., Wladyslaw F., Jolanta B., Izabela M. ve Zbigniew J. (2003) The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24- epibrassinolide, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 147-151.
- Anuradha S. ve 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: 151- 153.
- Aydın A., Kant C. ve Ataoğlu N. (2003) Erzurum ve Rize Yöresi Toprak Örneklerine Uygulanan Farklı Dozlardaki Bor ve Fosforun Mısır (*Zea mays*)'ın Kuru Madde Miktarı ve Mineral İçeriğine Etkisi, *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 36(2): 125-129.
- Aydın, S.Ö. (2004) RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematigi, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6: 113-130.
- Arora N., Bhardwaj R., Sharma P. ve Arora H.K. (2008) Effects of 28-homobrassinolide on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in seedlings of *Zea mays* L. under salinity stress, *ActaPhysiol. Plant*, 30: 833-839.

- Ashaf, M., Akram, N.A., Arteca, R.N. ve Foolad, M.R. (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance, *Critical Reviews in Plant Science*, 29:162-190.
- Atalay, E., Gezgin, S. ve Babaoğlu, M. (2003) Buğday (*Triticum durum* Desf.) ve Arpa (*Hordeum vulgare* L.) İn Vitro Fidelerinin Bor Alımının ICP-AES ile Tespiti, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(32): 47-52.
- Babaoğlu, M. (2005) Mısır ve tarımı (*Zea mays* L.), *Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*.
- Bagheri, A., Paull, J.G. ve Rathjen, A.J. (1996) Genetics of tolerance to high concentrations of soil boron in peas (*Pisum sativum* L.), *Euphytica*, 87: 69-75.
- Bagheri, A., Paull, J.G. ve Rathjen, A.J.. (1994) There sponse of *Pisum sativum* L. germplasm to high concentrations of soil boron, *Euphytica*, 75: 9-17.
- Bagheri, A., Paull, J.G., Rathjen, A.J., Ali, S.M. ve Moody, D.B. (1992) Genetic variation in the response of pea (*Pisum sativum* L.) to high soil concentrations of boron, *Plant and Soil*, 146: 261-269.
- Bastias E.I., Gonzalez- Moro M.B. ve Gonzalez- Muruo C. (2004) *Zea mays* L. Amylacea from the Lluta Valley /Arica- Chile) tolerates salinity stress when high levels of boron are available, *Plant and Soil*, 267: 73-84.
- Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz, F., ve Castano, A. (2001) DNA fingerprinting comparison of *Rainbow Trout* and RTG-2 line using random amplified polymorphic DNA, *Ecotoxicology*, 10: 115-124.
- Behnamnia, M., Kalantari, K.M. ve Rezanejad, F. (2009) Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L., *General and Applied Plant Physiology*, 35(1-2): 22-34.
- Bishop GJ (2003) Brassinosteroid mutant of crops, *J Plant Growth Regul*, 22: 325–335.
- Britten, R. J. (1996) DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9374–9377.
- Brown, P.H., Hu, H. (1996) Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species, *Annals of Botany*, 77 (5): 497.
- Buckler, E.S. ve Stevens, N.M. (2005) Maize origins, domestication, and selection, *Genetics and origins of crops*, 67-90.
- Campbell, T.A., Rathjen, A.J., Paull, J.G. ve Islam, A.K.M.R. (1998) Method for screening bread wheat for tolerance to boron, *Developments in Plant Breeding*, 6: 197-201.

- cenkci S., Yıldız M., Çiğerci İ. H., Konuk M. ve Bozdağ A. (2009) Toxic chemicals induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, *Chemosphere*, 76: 900-906.
- Devrim, A.K. ve Kaya, N. (2006) RAPD Tekniği ve biyokimya alanında kullanımı, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(1): 97-101.
- Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R. ve Chidambaram, A.L.A. (2011) Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker, *C. R. Biologies*, 334: 24-30.
- Divi, U.K. ve Krishna, P. (2009) Brassinosteroid: A biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance, *New Biotechnology*, 26: 131-136.
- Doğan, M. (2012) Farklı bor uygulamalarının *Capparis* L. spp. ve *Carthamus* L. spp. tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(2): 154-161.
- Doğru, A., Darçın, E. S., Tutar, A., Dizman, M. Ve Koç, Y. (2012) Potasyum Humatın Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinin Büyümesi Üzerine Etkileri, *Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Dergisi*, 1: 83-93.
- Doyle, J.J. ve Doyle, L.H. (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* 12, (1): 13-15.
- Ertürk F.A., Nardemir G., Ay H., Arslan E. ve Agar G. (2013) Determination of genotoxic effects of boron and zinc on *Zea mays* using protein and random amplification of polymorphic DNA analyses, *Toxicology and Industrial Health*.
- Esim, N., Tiryaki, D., Karadağoğlu, Ö. Ve Atıcı, Ö. (2012) Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots, *Toxicology and Industrial Health*, 29(9):800-805.
- Francois, L.E. ve Clark, R.A. (1979) Boron tolerance of twenty-five ornamental shrub species, *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 104: 319-322.
- Goldberg, S. (1997) Reactions of Boron with Soils, *Plant Soil*, 193: 35-48.
- Günelçin D. (2008) Gibberellik asit ve 24-epibrassinolid'in tuz stresi koşullarında çimlendirilen arpa (*Hordeum vulgare*) tohumlarında total dna ve protein içeriğine etkilerinin tespiti, Yüksek Lisans, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 62.
- Güneş A., Alpaslan M., Özcan H. ve Çıkılı Y. (2000) Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinin bor toksisitesine duyarlılıkları, *Türk J Agric. For*, 24: 277-282.
- Güneş, A., Çelik, H., Eraslan, F., Alpaslan, M., Yaşa, Z., Söylemezoğlu, G. ve Koç, Ö. (2003) Asmaların (*Vitis* spp.) bor toksisitesi ve tuzluluğa karşı toleransının

belirlenmesine yönelik olarak bor, sodyum ve klor alımlarının karşılaştırılması, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 9(4): 428-434.

- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N.B., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L. ve Cook, J.C. (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* polen, *Nature*, 281: 216–17.
- Haas, A. R. C. (1929) Toxic effect of boron on fruit trees, *Bot. Gaz.*, 88: 113–131.
- Hai-hua, W., Tao, F., Xi-xu, P., Ming-li, Y., Ping-lan, Z. ve Xin-ke, T. (2009) Ameliorative effects of brassinosteroid on excess manganese-induced oxidative stress in *Zea mays* L. leaves, *Agricultural Sciences in China*, 8(9): 1063-1074.
- Halloran. N. ve Kasım, M.U. (2002) Meyve ve sebzelerde büyüme düzenleyici madde kullanımı ve kalıntı düzeyleri, *Gıda*, 27(5): 351-359.
- Haubrick, L.L. ve Assmann S.M. (2006) Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles, *Plant Cell Environ*, 29: 446-457.
- Hoagland, D. R. ve Arnon, D. I. (1950) *The water-culture method for growing plants without soil*, 2.baskı, California Agricultural Experiment Station, California, 347.
- Hu, H. ve Brown, P.H. (1994) Localisation of boron in cell wals of squasand tobacco and its association with pectin, *Plant Physiol*, 105: 681-689.
- Hu, H., Brown, PH. ve Labavitch, JM. (1996) Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin, *Journal of Experimenatl Botany*, 47 (295), 227-232.
- Indu S.,Pratap K. M. ve Renu B. (2011) Effect of 24-epibrassinolide on oxidative stress markers induced by nickel-ion in *Raphanus sativus* L. , *Acta Physiol Plant* ,33:1723-1735.
- Inomata, N., K. Kanda, M. L. Cariou, H. Tachida ve T. Yamazaki (1995) Evolution of the response patterns todietary carbohydrates and the developmental differentiation of gene expression of a-amylase in *Drosophila*, *J. Mol. Evol.*, 41:1076–1084.
- Ismaili, J.,Boisvert, M., Longpré, F., Carange, J., Gall, C.L., Martinoli, M-G. ve Daoust, B. (2012) Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure–activity relationships, *Steroids*, 77: 91-99.
- Kaçar, B. ve İnal, A. (2008) 145-168, *Bitki analizleri*, 1. Basım, Nobel, Ankara, 892.
- Kaçar, B. Ve Katkat, A.V. (2007) Bor, 535-556, Kaçar, B. Ve Katkat, A.V., *Bitki besleme*, 3. Basım, Nobel, Ankara, 659.

- Kacar B. ve Katkat, A. V., (1998) Bitki besleme, *Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı*, Yayın No: 127, Vipaş Yayınları: 3, Bursa.
- Karadavut, U., Genç, A., Palta, Ç. (2011) Mısır bitkilerine ait büyüme modellerinin model parametreleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi, *Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2): 1-7.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y. (2005) The effects of drought on plants and tolerance mechanisms, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4): 723-740.
- Kartal, G., Temel, A., Arıcan, E. ve Gözükırmızı, N. (2009) Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. *Plant Growth Regulation*, 58:261-267.
- Kekeç, G., Sakçalı, M.S. ve Uzonur, I. (2010) Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis, *Bull Environ Contam Toxicol*, 84:759-764.
- Kızılgöz, İ. ve Özberk, İ. (2005) Sulanan koşullarda makarnalık ve ekmeklik buğdayın borla beslenme durumunun belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9-3.
- Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H. ve Yang, Y.S. (2005) DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis, *Chemosphere*, 61: 158-167.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J. ve Han, Y.P. (2009) Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices, *Journal of Hazardous Material*, 161: 878-883.
- Lordkaew S., Dell B., Jamjod S. ve Rerkasem B. (2011) Boron deficiency in maize, *Plant Soil*, 342: 207-220.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, İkinci baskı, Academic Press, New York, 889.
- Muğla Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü (2013)
- Nable, R.O., Banuelos, G.S. ve Paull, J.G. (1997) Boron toxicity, *Plant and Soil*, 198: 181-198.
- Nakajima, N., Shida, A. ve Toyama, S. (1996) Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Japanese Journal of Crop Science*, 65: 114-118.
- Nguyen, N.T., Moghaieb, R.E.A., Saneoka, H. ve Fujita, K. (2004) RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*, *Plant Science*, 167: 797-805.

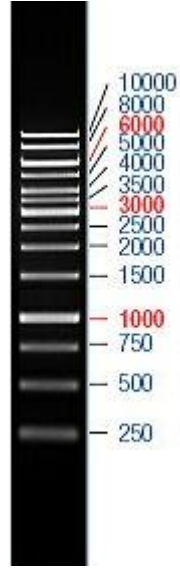
- N'úñez, M., Mazzafera, P., Mazonra, L.M., Siqueira, W.J. ve Zullo, M.A.T. (2003) Influence of a brassinosteroid analogue and antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl, *Biologia Plantarum*, 47(1):67-70.
- Oertli, J. ve JandRoth, J.A. (1969) Boron nutrition of sugar beet, cotton, and soybean, *Agron. J.*, 61:191-95.
- Oh, M.H. ve Clouse, S.D. (1998) Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*, *Plant Cell Reports*, 17: 921-924.
- Özcan, S. (2009) Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: Genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2): 1-34.
- Özdil, F. ve Başpınar, E. (2005) Keçi sütü somatik hücrelerinden genomik DNA izolasyonunda fenol-kloroform ve chelex® 100 ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(1): 16-20.
- Palta, Ç. ve Gezgin, S. (2011) Orta Anadolu koşullarında yaygın olarak yetiştirilen melez mısır çeşitlerinin bor toksitesine duyarlılığı, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(3): 1-8.
- Peleg, Z. ve Blumwald, E. (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 290-295.
- Paul J.G., Rathjen A.J. ve Cartwright B. (1991) Tolerance to high concentrations of boron for the amphiploid of *Triticum aestivum* x *Agropyron elongatum*, *Plant and Soil*, 133: 297-299.
- Rao, S.S.R., Vardhini, B.V., Sujatha, E. ve Anuradha, S. (2002) Brassinosteroids – A new class of phytohormones, *Current Science*, 82(10): 1239-1245.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn G. T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis V.E. ve Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239: 487-491.
- Sakcalı, M.S., Kekeç, G., Uzonur, İ., Alpsoy, L. ve Tombuloğlu H. (2013) Randomly amplified polymorphic DNA analysis for detecting genotoxic effects of boron on maize (*Zea mays* L.), *Toxicology and Industrial Health*.
- Sasse, J.M., Smith, R. ve Hudson, I. (1995) Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions, *Proceedings Plant Growth Regulation Society America*, 22: 136-141.

- Scarafani, A. ve Duranti, M. (2001) An approach to critical assesment of the experimental contitions in practical molecular biology: isolation of plant DNA, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29: 21-23.
- Shahbaz, M. ve Ashraf. M. (2007) Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Growth Regulation*, 55:51-64.
- Shelp B J (1993) *Physiology and biochemistry of boron in plants*, USA, 385.
- Soylu, S., Sade, B., Topal, A., Akgün, N., Gezgin, S., Hakkı, E.E. ve Babaoğlu, M. (2005) Responses of irrigated durum and bread wheat cultivars to boron application in a low boron calcareous soil, *Turk Journal of Agricultural Forestry*, 29: 275-286.
- Steber, C.M. ve McCourt, P. (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 125: 763-769.
- Subedi, K.D., Gregory, P.J. ve Gooding, M.J. (1999) Boron. accumulation and partitioning in wheat cultivars with. contrasting tolerance to boron deficiency, *Plant Soil*, 214, 141–152.
- Sunar S.,Aksakal Ö., Yıldırım N. ve Agar G. (2009) Determination of the genotoxic effects of *Verbascum speciosum* Schard. extracts on corn (*Zea mays* L.) seeds, *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6): 4820-4826.
- Surgun, Y., Yılmaz, E., Çöl, B. ve Bürün, B. (2012) Altıncı grup bitki hormonu: brassinosteroidler, *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 8.1: 27- 46.
- Swamy K.N. ve Rao S.S.R. (2009) Effect of 24- epibrassinolide on growth, photosynthesis, and essential oil content of *Pelargonium graveolens* (L.) herit, *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(5):682-687.
- Taban, S. ve Erdal, İ. (2000) Bor uygulamasının değişik buğday çeşitlerinde gelişme ve toprak üstü aksamda bor dağılımı üzerine etkisi, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 24: 255-262.
- Tabur, S. ve Demir, K. (2008) Tuz stresi (NaCl) altında çimlendirilen arpa tohumlarının mitotik indeks ve kromozom anormallikleri üzerine bazı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının etkileri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi (E- Dergi)*, 3 (2): 162- 173.
- Topal, A., Gezgin, S., Akgün, N., Dursun, N. ve Babaoğlu, M. (2002) Yield and yield attribute of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) as effected by boron application, *Boron in Plantand Animal Nutrition*, 401-406.
- Torun, A.A., Yazıcı, A., Erdem, H. ve Çakmak, İ. (2006) Genotypic variation in tolerance to boron toxicity in 70 durum wheat genotypes, *Turkish Journal of Agricultural Forestry*, 30: 49-58.

- Uygan, D. ve Çetin, Ö. (2004) Borun tarımsal ve çevresel etkileri: Seydisuyu toplama havzası, *Köy Hizmetleri Araştırma Enstitüsü, Su Yönetimi Bölümü*, Eskişehir.
- Vladimir, K., Vladimir Z. ve Aede de Groot (2000) Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century, *Annals of Botany*, 86: 441-447.
- Xu, F. S., Wang, Y. H. ve Meng, J. (2001) Mapping boron efficiency gene(s) in *Brassica napus* using RFLP and AFLP markers, *Plant Breeding*, 120: 319-324.
- Yang, C. J., Zhang, C., Lu, Y.N., Jin, J.Q. ve Wang, X.L. (2011) The mechanisms of brassinosteroids action: from signal transduction to plant development, *Mol. Plant*, 4(4): 588-600.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. (2001) Genetik markörler ve analiz metodları, sayfa 334-363, Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., *Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, 2. Baskı, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 456.
- Yıldız, M. ve Terzi, H. (2007) Bitkilerin yüksek sıcaklık stresine toleransının hücre canlılığı ve fotosentetik pigmentasyon testleri ile belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, (1-2): 47-60.
- Yılmaz, E., Tuna, A.L. ve Bürün, B. (2011) Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7.1: 47-66.
- Yokaş, İ., Tuna, A.L., Bürün, B., Altunlu, H., Altan, F. ve Kaya, C. (2008) Responses of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant to exposure to different salt forms and rates, *Turk J Agric For*, 32: 319-329.
- Yokota, T. (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends in Plant Science*, 2 (4): 137-143.
- Yorgancılar, M. ve Babaoğlu, M. (2005) Buğday çeşitlerinde borun çimlenme üzerine etkisinin in vitro ve saksı şartlarında araştırılması, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(35): 109-114.
- Yusuf, M., Fariddun Q. ve Ahmad A. (2011) 28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants, *Chemosphere*, 85: 1574-1584.
- Zurek, D.M., Rayle, D.L., McMorris, T.C. ve Clouse, S.D. (1994) Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation, *Plant Physiology*, 104: 505-513.

EKLER

Ek A.



RAPD bant profillerini belirlemede kullanılan 1 kb'lık DNA moleküler ağırlık markörü

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Ad Soyad : Gizem ALDEMİR
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 06.04.1988
Medeni Hali : Bekar
E-posta : gizemm.aldemir88@gmail.com

Eğitim:

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Ayrancı Lisesi	2005
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Ünivesitesi	2011
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Ünivesitesi	2015

Yabancı Dil(ler):

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