



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YABANI BUĞDAYDA (*Triticum boeoticum* L.)
FARKLI BOR UYGULAMALARI İLE
MEYDANA GELEN TEPKİLERİN
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Songül UYĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Nisan-2014
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Songül UYĞAN tarafından hazırlanan “Yabani Buğdayda (*Triticum boeoticum* L.) Farklı Bor Uygulamaları ile Meydana Gelen Tepkilerin Fizyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” adlı tez çalışması 17/04/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ali TOPAL

Danışman

Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Üye

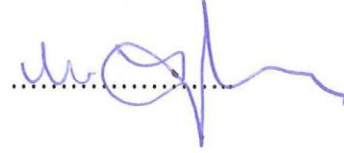
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

İmza



.....

.....



.....

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Aşır GENÇ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 11201028 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Songül UYĞAN



17.04.2014

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YABANI BUĞDAYDA (*Triticum boeoticum* L.) FARKLI BOR UYGULAMALARI İLE MEYDANA GELEN TEPKİLERİN FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Songül UYĞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2014, 50 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Ali TOPAL

Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

Bu çalışmada, bor (B) stresine karşı tolerans düzeyi kültür buğdaylarından farklılık gösteren, yabancı bir buğday türü olan *Triticum boeoticum* L. kullanılmıştır. Çalışmada kontrollü şartlarda perlit ortamında farklı B dozları (toksik ve ileri derecede toksit düzeyler dahil), borik asit formunda, uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece *Half Hoagland* besin çözeltisi, diğer serilere ise 25, 250 ve 500 mg kg⁻¹ bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulanmış ve bitkiler bu uygulama dozlarında 2-3 yapraklı döneme kadar yetiştirilmiştir. Bor uygulamasındaki bitkilerden alınan örneklerde, büyüme parametreleri (kök ve gövde), bağıl su içeriği, bor konsantrasyonları, prolin (PRO) ve lipid peroksidasyon (MDA) antioksidant enzim aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmada ayrıca, kullanılan *T. boeoticum* L. genotipine ait farklı B dozlarındaki örneklerde, kültür buğdayında B dışlama mekanizmasında rol aldığı varsayılan *TaBOR2* genine ait ekspresyon düzeyleri de gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile araştırılmıştır.

Yabancı buğday genotiplerinde bor toksisitesi sonucu kök ve gövde gelişiminin etkilendiği ve gerilediği görülmüştür. Araştırmada kullanılan bitkilerin bor konsantrasyonları bor uygulamasına bağlı olarak artış göstermiştir. Prolin ve lipid peroksidasyon miktarları da benzer bir şekilde yabancı buğday genotipinde artmıştır.

Farklı B uygulama gruplarından uygulamadan 1 gün sonra (1. zaman), 1 hafta sonra (2. zaman) ve 2 hafta sonra (3. zaman) örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Her bir ortama ait ayrı ayrı alınan kök ve gövde örneklerinden total RNA'lar izole edilerek bu RNA örnekler önce ilk zincir komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmüştür. Daha sonra farklı dozlara ait örnekler kullanılarak B uygulamasından en az etkilenen bir referans gen (*Puroindolin b* geni) tespit edilmiştir. *TaBOR2* geninin aktivitesi bu referans gen ile normalizasyonu neticesinde zamana bağlı olarak qRT-PCR ile tespit edilmiştir. *TaBOR2/Puroindolin b* kök ve gövde ekspresyonlarına bakıldığında 1. zaman diliminde kökteki ekspresyonlar tüm dozlarda artış gösterirken diğer zamanlarda (2. ve 3. zaman) azalmış, gövde örneklerinde ise 1. ve 2. zaman diliminde ekspresyon düşük seviyede iken 3. zaman diliminde tüm dozlarda artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar B'un ortamda yüksek dozlarda bulunması durumunda bitki bünyesinde de artış gösteren bor içeriğinin etkilerinden korunmak isteyen dokularda boru dışlama mekanizmasının dokuya bağlı olarak bor içeriği ile orantılı bir şekilde dışlamada görev alan *TaBOR2* proteininin devreye girdiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bor toksitesi, Bitki fizyolojik analizleri, Real-Time kantitatif PCR, qRT-PCR, *Triticum boeoticum* L., Yabancı buğday.

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF THE REACTIONS OF WILD WHEAT (*Triticum boeoticum* L.) AGAINST DIFFERENT BORON APPLICATIONS VIA PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Songül UYĞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN AGRICULTURAL ENGINEERING

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Jury

Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Ali TOPAL

Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

In this study, a wild wheat species, *Triticum boeoticum* L., which differs from cultivars in terms of its tolerance level against boron (B) stress was utilized. Different levels of B (including toxic and highly toxic levels) was applied, in the form of boric acid, in controlled growth environment to the plants grown in perlite. *Half Hoagland* solution was used in control group, while the remaining series contained 25, 250 and 500 mg kg⁻¹ of boron and the plants were grown until 2-3 leaf stage. Comparisons have been performed for the B treatment groups measuring plant growth parameters (root and stem), relative water content, boron concentrations, proline (PRO) contents and MDA activities of antioxidant enzymes. *TaBOR2* is known to be involved in the B extrusion mechanism of wheat cultivars. In our study, *TaBOR2* gene expression levels of the samples of *T. boeoticum* L. genotype were analysed using Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).

It was determined that the root and stem development of wild wheat genotype used was decreased as a result of B toxicity. An increment in the B concentrations of the plants were observed with an increase in the B concentration of the medium. Similarly, proline contents and lipid peroxidation levels were also increased.

For different B treatment groups samples were collected after 1 day (time zone 1), 7 days (time zone 2) and 14 days (time zone 3) of treatment. Total RNA extraction of each sample were conducted and the samples were used to obtain the first strand complementary DNAs (cDNAs) for further analyses. Firstly, different target cDNAs obtained from differing B treatment groups were tested for the determination of best performing house keeping genes. *Puroindolin b* was found to be the best suited reference gene which was further used for the normalization and time dependent *TaBOR2* gene expression. Considering *TaBOR2/Puroindolin b* levels of root and shoot samples, it can be concluded that at time zone 1, expressions of the root samples were increased in all the samples while in remaining time zones (2nd and 3th) expressions were decreased. That was in contrary with the samples collected from stem tissues. These results indicated that *TaBOR2* protein is involved in protecting the plants and the transport organs (root and shoot) from the negative effects of high B levels in the growth environment.

Keywords: Boron toxicity, Plant physiological analyses, Real-Time quantitative PCR, qRT-PCR, *Triticum boeoticum* L., Wild Wheat.

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca bilgileri ile yoluma ışık tutan, deneyimlerini aktararak çalışmalarımı yönlendirmeme yardımcı olan manevi desteğini esirgemeyen, tanımaktan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI' ya teşekkürü bir borç bilirim

İhtiyaç duyduğum her an yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocalarım, Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ, Yrd. Doç. Dr. Mehmet HAMURCU, Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR, Dr. Emine ATALAY, Arş. Gör. İbrahim AYTEKİN, Arş. Gör. Selçuk KAPLAN ve Arş. Gör. Evren YILDIZTUGAY'a teşekkürlerimi bildiririm.

Tez çalışmalarım süresince kullanılan laboratuvar, ekipman ve sarf malzeme destekleri için TÜBİTAK, DPT ve Selçuk Üniversitesi BAP'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Zeynep TIRAŞ, Zeynep ÖNCEL, Ş. Buket BOZKURT ve laboratuvarında çalışan diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tüm öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olarak sayısız fedakârlıklar gösteren maddi ve manevi her konuda ilgi ve desteklerini benden esirgemeyip beni bugünlere taşıyan ve başarılarımda büyük katkıda bulunan değerli Ailem'e en içten sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Songül UYĞAN
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	21
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	38
EKLER	43
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

APX	:	Askorbat peroksidaz
Atm	:	Atmosfer basıncı (Basınç Birimi)
ATP	:	Adenin Three Phosphat
B	:	Bor
Bç	:	Baz çifti
BSA	:	Bovine serum albümini
°C	:	Santigrad derece
CAT	:	Katalaz
cDNA	:	Komplementer Deoksi Ribo Nükleik Asit
cm	:	Santimetre
da	:	Dekar
ddH ₂ O	:	Distile-Deiyonize Su
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksi Ribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotidtrifosfat
dsDNA	:	Double-stranded Deoksi Ribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAO	:	Food and Agricultural Organiztion
FRET	:	Förster Resonance Energy Transfer
g	:	Gram
GB	:	Glycine-betaine
GR	:	Glutasyon redüktaz
GSH	:	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	:	Okside glutasyon
GST	:	glutasyon s-transferaz
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
ha	:	Hektar
IAA	:	Indol asetik asit
ICP-AES	:	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
KA	:	Kuru Ağırlık
kg	:	Kilogram
l	:	Litre
LOX	:	Lipoksigenaz aktivitesi
m	:	Metre
Mg	:	Miligram
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
MP	:	Membran permeabilitesi
mRNA	:	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NBT	:	Nitrobluetetrazolium
nm	:	Nanometre

NNİ	:	Nispi nem içeriği
O ₂	:	Süperoksit radikali
OH	:	Hidroksil radikali
OOH	:	Perhidroksil radikali
PCR	:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PEG	:	Polyethylene glycol
Pmol	:	Pikomol
POD	:	peroksidaz
PRO	:	Prolin içeriği
PVPP	:	Polyvinylpyrrolidone
qRT-PCR	:	Real Time Polymerase Chain Reaction
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
RNase	:	Ribo Nükleaz
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
s	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit Dismütaz
TA	:	Turgorlu Ağırlık
TCA	:	Trikloroasetik asit
Tm	:	Erime sıcaklığı
UV	:	Ultra Viyole
V	:	Volt
w/v	:	Weight/volume (ağırlık/hacim)
YA	:	Yaş Ağırlık
Mg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µmol	:	Mikromol
2n	:	Kromozom sayısı

1. GİRİŞ

Buğday grubu olarak adlandırılan *Triticum* ve *Aegilops*, Gramineae familyasının *Triticeae* oymağına girmektedir. *Triticum* kromozom sayısına göre diploid ($2n=14$), tetraploid ($2n=28$) ve hekzaploid ($2n=42$) olmak üzere üç gruba ayrılır (Feldman ve ark., 1988).

Kullanım alanlarına göre bu türler farklı şekilde sınıflandırılabilirler. Hekzaploid buğdaylar ekmek ve pasta yapımında, tetraploid buğdaylar ise makarna yapımında yoğun olarak kullanılmaktadır. Diploid buğdayların ise günümüzde yaygın kullanım alanı bulunmamaktadır. Buğday insan beslenmesi için gerekli olan kalori ve proteinin önemli bir kısmını karşılamakta olup, dünya nüfusunun % 35'ini oluşturan yaklaşık 40 ülkenin temel gıda maddesidir. İnsanların değişen tüketim alışkanlıkları ve gelişen teknolojiye bağlı olarak, buğday ürünleri çeşitlenmiş ve tüketici istekleri de değişmiştir. Buğdayın en yaygın tüketim şekilleri un, ekmek, makarna, irmik, bisküvi, bulgur ve eriştedir. Dünya'da ve Türkiye'de bu ürünlerin dışında geleneksel ürünler, tatlılar, nişasta vb. amaçla da tüketimi yapılmaktadır (Atlı, 1999).

Tahıllar, Dünyada ekiliş ve üretimi en fazla olan ürün grubudur. Yeryüzünün 1.4 milyar hektar olan işlenen topraklarının yaklaşık yarısında tahıl ekimi yapılmaktadır (Taslak ve ark., 2007). Tahılların bu kadar çok ekilmesinin sebebi, özellikle serin iklim tahıllarının adaptasyon yeteneklerinin yüksek olması nedeniyle ekstrem ekolojik koşullarda yetiştirilebilme üstünlüğüne sahip olmalarıdır. Buğday, ülkemizde 7.5 milyon hektar ekim alanı ve 20 milyon ton üretimiyle tüm ürünler içerisinde ilk sırayı almasına karşın, 267 kg/da olan ortalama verimiyle dünya ortalamasının (321 kg/da) altındadır (Anonim, 2013). İnsan beslenmesinde geçmişten günümüze kadar vazgeçilmez bir gıda maddesi olan ve ülkemizde ekim alanlarının % 52'sini oluşturan buğdayın, veriminde sağlanacak küçük artış bile, ülkemiz ekonomisine önemli katkılar sağlayabilir. Buğdayda verimin düşmesine neden olan stres etmenleri; hastalık oluşturanlar ve zararlılar gibi biyotik kökenli olabilmesinin yanında; tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklıklar, besin elementlerinin eksik veya fazlalıklar gibi abiyotik kökenli de olabilmektedir (Serrano ve Gaxiola, 1994).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Triticum boeoticum* L.

Kaplıca buğdayı olarak bilinen *Triticum boeoticum* L. üzerinde son yıllarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle diploid özelliğe sahip olması ve elde edilecek bilgilerin rahatlıkla makarnalık ve ekmeklik buğday ıslahına uygulanabilirliği, araştırmacılar gözünde Kaplıca buğdayını çok cazip hale getirmiştir. Kaplıca buğdayının ilk defa nerede kültüre alındığı sorusuna cevap vermek için Heun ve ark. (1997a) tarafından yaklaşık 1400 yabancı kaplıca (*T. monococcum* L. ssp. *boeoticum*) buğdayı ile kültür kaplıca (*T. monococcum* L. ssp. *monococcum*) buğdayı arasında karşılaştırmalı DNA analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kültür formuna en yakın populasyonun Karacadağ/Diyarbakır bölgesinden toplanan populasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan morfolojik analizlerde Kaplıca buğdayının biyotik ve abiyotik stress koşullarına dayanıklı olduğu ve bunların buğday ıslahında kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Vallage, 1979,; Waines., 1983).

Kaplıca buğdayı hem makarnalık hem de ekmeklik buğdayın yapısında bulunan A genomunu taşımaktadır. Bundan dolayı makarnalık ve ekmeklik buğday ıslahında genetik çeşitliliği arttıracak yeni bir gen kaynağı olarak görülmektedir (Vallage, 1978).

Güneydoğu Anadolu bölgesi buğday gen kaynakları bakımından oldukça önemli bir bölgedir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla, kaplıca (*T. monococcum*) ve makarnalık buğdayın (*T. durum*) Karacadağ/Diyarbakır da ilk kültüre alınmış olduğunun gösterilmesi, bu konu ile uğraşan bilim adamlarının ilgisini bu bölgeye çekmiştir (Heun ve ark., 1997b; Ozkan ve ark., 2002). Özellikle Şanlıurfa, Adıyaman, Gaziantep, Diyarbakır ve Mardin ileri çevresinde bulunan yabancı buğday gen kaynaklarının toplanması ve bunların karakterizasyonunun yapılması oldukça önemlidir. Özkan ve ark. (2002) son yıllarda yapmış oldukları bitki toplama gezilerinde *Triticum* ve *Aegilops* türlerini toplamış ve kayda geçirmişlerdir. Özellikle ileriye dönük buğday ıslahı çalışmalarında abiyotik ve biyotik gen kaynakları olarak kullanılması için toplanan bu materyal üzerinde gerekli çalışmaların yapılması gerekmektedir (Aktaş, 2007).

2.2. Bitkiler ve Bor

Bor oldukça ilginç bir element olup doğada tek başına bulunmaz. Oksijenle bağ yapmaya yatkın olduğundan pek çok değişik oksijen bileşimi oluşturur. Basitten karmaşığa, sonsuz sayıda değişik molekül yapılarına sahip olabilen bor-oksijen bileşimlerine “borat” denilmektedir. Borun bu özelliğinden dolayı doğada yaklaşık olarak 230 değişik B minerali bulunduğu bilinmektedir (Ediz ve Özdağ 2001.; Yılmaz 2002).

Dünyada en büyük borat yatakları, kimyasal çökelme sonucu gölsel ortamlarda meydana gelmiştir. Borat oluşumlarına, gölsel ortamlar dışında deniz ortamında oluşan tuz yatakları içinde de rastlanır. Bundan başka B mineralleri, yeraltındaki magmanın yeryüzüne doğru yükselirken kristalleşmesi sonucu da oluşabilir. Kirletilmiş sular, B madenlerinden çıkan artıklar ve kimyasal atıklar da topraktaki B’ un en yaygın kaynakları arasındadır (Yılmaz 2002).

Günümüzde B’ un çok değişik kullanım alanları vardır. Bunlardan bazıları, cam sanayi, seramik sanayi, temizleme ve beyazlatma sanayi, metalurji, nükleer uygulamalar, fotoğrafçılık, boya ve kağıt endüstrisi, tekstil kimyasalları, deri giysiler, kozmetik sanayi, böcek öldürücüler ve tarımdır (Yılmaz 2002, Shorrocks 1997). Tarımda inorganik gübre olarak kullanılacak B formlarına örnekler Çizelge 2.1. de verilmiş olup bunlardan borik asit ve boraks toprakta en kolay çözünebilen ve bitkiler tarafından kolaylıkla alınabilen formlardır. Bununla beraber suda borik asit ve boraks’tan çok daha hızlı çözünebilen sulu bor ise genellikle B ‘un direk olarak bitki yapraklarına uygulanan formudur (Perica ve ark. 2001) .

Çizelge 1.1. Tarımda Yaygın Olarak Kullanılan Boratlar (Shorrocks 1997)

			B (%)
Rafine Ürünler	$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sodyum tetraborat pentahidrat	14.9
	$\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Solubor	20.8
	$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Sodyum tetraborat dekahidrat	11.3
	NaB_4O_7	Sodyum tetraborat	21.4
	H_3BO_3	Borik asit	17.5
Maden Cevheri	$2\text{CaO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Kolemanit	Değişken
	$\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{CaO} \cdot 5\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	Üleksit	Değişken
	$2\text{CaO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Datolit	Değişken
	$\text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 3\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Hidroborasit	Değişken
	$2\text{MgO} \cdot \text{B}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Askarit	Değişken

Bor, tohumlu bitkiler, diatomeler ve bazı yeşil alg türleri için gerekli bir mikro element olmasına karşın fungi ve bakteriler tarafından ihtiyaç duyulmayan bir mikro elementtir ve bitkilerin B ihtiyacı molar konsantrasyon temel alındığında diğer mikro elementlerden en fazla olanıdır (Brown ve ark. 1999).

Bitkiler arasında B isteği açısından oldukça büyük farklılıklar vardır. Bitkiler B ihtiyaçları temel alınarak gruplandırıldığında; 1) Gramineler; B ihtiyacı en az, 2) Diğer monokotiledon ve dikotiledon bitkiler; orta derecede; 3) Lateks üreten bitkiler; en yüksek B ihtiyacı olan bitkiler olarak 3 gruba ayrılabilir. Bu gruplara ait bazı bitki örnekleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir. Diğer bir sınıflandırmada ise, dikotiledon ve monokotiledonlar büyüme evreleri ve B eksikliği semptomlarının görüldüğü yerler temel alınarak gruplandırılmıştır. Bor eksikliğinde bazı dikotiledonlarda (ayçiçeği, domates, bal kabağı, yonca) kök büyümesinin inhibisyonu ve meristematik bölgenin dejenerasyonu ilk görülen etkiler olmasına rağmen diğer bazı dikotiledonlarda (bezelye, soya fasulyesi, acı bakla) ise büyüme noktalarında görülen bu dejenerasyon daha sonra ortaya çıkar. Ortamda B' un bulunmadığı koşullarda bazı monokotiledonlar (mısır, sorgum, darı, soğan) dikotiledonlara göre normal kök büyümesi ve vejetatif büyümeyi daha uzun bir süre devam ettirebilirler. Buğday, arpa, yulaf ve çavdar gibi monokotiledonlar B eksikliği semptomlarını sadece reproduktif organların gelişimi sırasında gösterirler (Blevins ve Lukaszewski 1998, Mengel ve Kirby 1979).

Çizelge 2.2. Çeşitli bitki gruplarında bor içeriği (B, ppm kuru ağırlık) (Mengel ve Kirby 1979)

Monokotiller	Dikotiller	Latekse sahip Dikotiller
Arpa	2.3	Bezelye 22 Karahindiba 80
Buğday	3.3	Pancar 49 Sütleğen 93
Mısır	5.0	Marul 70 Haşhaş 94

Dikotiledonlar arasında B eksikliğine en duyarlı familyaların Cruciferae ve Chenopodiaceae olduğu bildirilmiştir. Örneğin Cruciferae'den *Brassica sp.* ve *Raphanus sp.* ile Chenopodiaceae'den *Beta sp.*'nin B eksikliğine en duyarlı türler olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Bor eksikliğine en hassas ve B uygulamasına en iyi cevabı veren türler Çizelge 2.3. de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bor eksikliğine en hassas ve B uygulamasına en iyi cevap veren türler (Shorrocks 1997)

Bitki Türü	Bitki Türü	Bitki Türü	Bitki Türü
<i>Apium graveolens var. Dulce</i>	Kereviz	<i>Eucalyptus sp.</i>	Ökalyptus
<i>Arachis hypogaea</i>	Yerfıstığı	<i>Gossypium sp.</i>	Pamuk
<i>Beta vulgaris</i>	Şeker pancarı	<i>Helianthus annuus</i>	Ayçiçeği
<i>Brassica sp.</i>	Brasica	<i>Malus domestica</i>	Elma
<i>Brassica rutabaga</i>	Turp	<i>Medicago sativa</i>	Yonca
<i>Coffea sp.</i>	Kahve	<i>Olea europaea</i>	Zeytin
<i>Daucus carota</i>	Havuç	<i>Pinus sp.</i>	Çam
<i>Elaeis guineensis</i>	Hurma	<i>Vitis vinifera</i>	Asma

Çağımızda oldukça fazla kullanım alanına sahip olan bor stratejik öneminin yanında, tarımsal açıdan değerlendirildiğinde alıcı ortama, dolayısıyla bitkilere ve canlılara şiddetli zarar verecek özelliklere sahiptir (Demirtaş 2004). Bor zehirliliğine duyarlılık bakımından bitki çeşitleri arasında genetik olarak önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bor zehirlenmesine duyarlılığı yüksek olan çeşitler hassas çeşitlere göre bünyelerinde daha az miktarlarda B biriktirerek yüksek B konsantrasyonlarına adapte olabilmektedirler (Nable 1988,; Paul ve ark. 1992).

Bor bitkiler için gerekli olan esas mikro besin elementlerinden birisidir. Pek çok vasküler bitki için gerekli bir mikro besin elementi olduğu da kanıtlanmıştır. Borun, birçok bitki çeşidinde yapısal, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda yer aldığı bilinmektedir. Borun şeker taşınımı, hücre çeperi sentezi, ligninleşme, hücre çeperi yapısı, karbonhidrat metabolizması, RNA metabolizması, solunum, IAA metabolizması, fenol metabolizması gibi pek çok metabolik olayda rol aldığı ileri sürülmektedir. Ancak yüksek B konsantrasyonlarında B toksite ve toleransının fizyolojik metabolizmasının çok iyi anlaşamadığı da ifade edilmektedir (Marshner, 1997).

Borun diol ve polioller ile kompleks oluşturma kapasitesi yüksektir. Bu kompleksler şeker ve şeker türevleri (şeker alkoller ve üronik asitler gibi) özellikle de manitol, mannan ve polimannurik asit bileşiklerinin oluşumu için gerekmektedir. Bu bileşikler hücre çeperindeki hemiselülozun bileşenleridir. Çift çeneklilerde; lignin biyosentezinin önemli yapıtaşlarından olan kafeik asit ve hidroksiferulik asit gibi bazı *o*-difenollerde cis-diol komplekslerini oluşturabilmektedir (Marshner, 1997).

Plazma membranının dayanıklılığı ve fonksiyonunda B' un önemli rollere sahip olduğu fakat tonoplast veya kloroplast zarı gibi membranları etkilemediği hususunda fazla miktarda literatür bulunmaktadır. Membran potansiyelinin oluşumu ve kurulması

için ortamda B'un bulunmasının gerekli olduğu belirtilmektedir (Shorrocks 1997). Bor, hücre bölünmesinden çok hücre büyümesi için gereklidir. Kök uzaması, hücre çeperindeki karşılıklı bağları yeniden şekillenmesi sonucu hücre büyümesi ve bölünmesi gibi olaylar sonucunda gerçekleşmektedir (Marshner, 1997).

Bitkilerde ligninleşme ve ksilem farklılaşması için B' a ihtiyaç duyulması nedeniyle B' un IAA metabolizması, lignin biyosentezinin düzenlenmesi ve ksilem farklılaşmasında anahtar rol oynadığı belirtilmektedir (Nable ve ark. 1997).

Bitki organlarında hareketi sınırlı olan B, genelde immobil olarak nitelendirilir. Bitkide transpirasyonla buhar halinde su kaybı sürdükçe, B da üst kısımlara doğru taşınmakta ve bitkinin tepe organlarında immobiliteden dolayı birikmektedir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu, bitkilerde B taşınımına ilişkin çok farklı sonuçlar verilmiştir. Bu yönüyle, primer fotosentetik şeker ürünleri sorbitol, mannitol, duleitol olan türlerde, B'un floemde taşınımının mobil olduğu bulunmuştur. Bu fotosentatların B elementiyle poliol bağlarıyla birleştikleri ve B'un mobil hale geçtiği gösterilmiştir. Ayrıca, poliol oluşumunda çevresel faktörlerin göz önünde tutulması gerektiği vurgulanmıştır (Brown ve Shelp 1997).

Borun bitkiler tarafından alım mekanizması henüz netlik kazanmamış bir konu olup, hem aktif hem de pasif taşınmayı destekler nitelikte kanıtlar bildirilmektedir (Dordas ve ark. 2000). Ancak, çoğunlukla kabul gören mekanizma, B'un bitki kökleri tarafından pasif absorpsiyon yoluyla ve iyonlaşmamış borik asit $[B(OH)_3]$ olarak alındığı ve sitoplazmada borat anyonu $[B(OH)_4]$ olarak biriktirildiği (Roessner ve ark. 2006) ve az da olsa $B(OH)_4$ iyonları olarak da alındığı şeklindedir (Hu ve Brown 1997). Toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör, B'un bitkiler tarafından alınabilirliğini etkilemektedir (Goldberg 1997). Genelde toprak pH'sı 6.3-6.5 olduğunda, bitkiler tarafından en yüksek düzeyde B alımı gerçekleşmekte, daha yüksek pH'larda ise alım keskin bir şekilde düşüş göstermektedir (Nable ve ark. 1997).

Yapılan deneysel çalışmalar, benzer çevresel koşullar altında yetiştirilen bitkilerde bile B alımının bitki türlerine göre büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Köklerden pasif alımda, transpirasyona bağlı olarak alınan B, ksilem iletim boruları içerisinde bitkinin tepe noktalarına doğru taşınmaktadır. Bu durumda B'un alınması ve iletim borularında taşınması bitkinin transpirasyona bağlı su alımı ile yakından ilişkilidir (Hu ve Brown 1997).

Genel olarak B absorpsiyonunun pasif bir şekilde olduğu ve B'un bitki hücrelerine borik asit (H_3BO_3) formunda alındığı düşünülmektedir. Söz konusu alım sonucunda hücre duvarlarında ve sitoplazma içerisinde son derece hızlı bir B kompleksi oluşumunun olduğu tahmin edilmektedir. Bitki içerisinde B komplekslerinin oluşumu hücrelerdeki serbest borik asit konsantrasyonunu azaltırken, bunun da dış çözeltiden bitkiye B alımına yol açtığı ve sonuçta bitki dokularındaki B konsantrasyonlarının çözeltiden alınan serbest H_3BO_3 konsantrasyonlarından dolayı aşırı şekilde artabildiği belirtilmektedir (Hu ve Brown 1997).

Bitkiler tarafından B alınmasının ve farklı organlara taşınmasının bitkinin su alımı ve ksilemdeki hareketi ile yakından ilişkili olduğu ve ayrıca bu taşınmanın bitki türleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum B'un esas itibariyle ksilemde taşındığını göstermektedir. B taşınmasının daha çok transpirasyona bağlı olması, yaprak uçları ve kenarlarında B birikiminin nedenini de açıklamaktadır. B'un yapraklarda bu şekilde akümüle olması kimi hallerde toksik etkilere neden olabilmektedir. Bazı bitkiler B akümülyasyonunun neden olacağı toksik etkilerden korunmak için ve tuzlu ortamlarda tuzun bitkilerden atılmasında da kullanılan gutasyon damlaları içinde B'u dışarı atma mekanizmasını geliştirmişlerdir (Taban ve Erdal 2000).

Bitkilerde B'un toksisite oluşturmaya ilişkin olarak, yukarıda ele alınan kimyasına dayanılarak, temelde üç mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlar; 1) Hücre duvarı gelişiminin engellenmesi, 2) ATP, NADH veya NADPH gibi ribozlu yapılara bağlanarak önemli metabolik aktivitelerin engellenmesi ve 3) Serbest şekerlerdeki veya RNA'daki ribozlara bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişmesinin engellenmesidir. Ayrıca, yapraklarda transpirasyon yolunun sonunda yüksek konsantrasyonlarda B'un birikmesiyle ozmotik dengesizliklerin ortaya çıkması da bu üç temel mekanizmaya ek olarak ileri sürülen bir diğer olası mekanizma olarak ele alınmaktadır (Stangoulis ve Reid 2002).

Bor toksisitesi gibi abiyotik stres koşulları bitkilerde gelişimi ve verimliliği kısıtlayan en önemli etmenlerin başında gelmektedir. Giderek azalan tarım alanlarında, strese yol açan olumsuz çevre koşullarına karşı bitkisel üretimde verimliliği artırmak önemlidir. Bunun da yolu, stres koşullarına dayanıklı bireylerin seçilmesi veya ıslahıdır. Bunun için de bitkilerin strese tolerans mekanizmalarının bilinmesi gereklidir. Stres koşullarında bütün bitkilerde oksidatif zararlanmalar meydana gelmekte ve stres koşullarına dayanmak veya stresten kaçmak için bitki türlerinin ve çeşitlerinin geliştirmiş oldukları mekanizmalar, birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Bu

nedenle kimi bitkiler abiyotik stres koşullarından daha şiddetli etkilenirken kimileri de direnç göstermektedir. Bu farklılıklar bitki türleri arasında görülebileceği gibi, aynı bitkinin farklı çeşitleri arasında da görülebilmektedir (Güneş ve ark. 2002).

Dünya genelinde her ne kadar azlığı kadar sorun olmasa da fazlalığının önemli bir abiyotik stres faktörü olarak karşımıza çıktığı, özellikle ülkemiz gibi B bakımından zengin, bölgelerde tarımsal ürünlerdeki verim kayıplarını en aza indirmek için, B toksisitesi ile mücadele öncelikli olarak ele alınması gereken önemli bir konudur. Bu konuda etkin bir ilerleme kaydedilebilmesi için ise iki temel unsurun açıklığa kavuşturulması önemlidir. Bunlar; 1) Bitkilerde B'un toksisite oluşturma mekanizmaları ve 2) Bitkilerin B toksisitesine karşı geliştirdikleri tolerans mekanizmalarıdır (Reid ve ark. 2004).

2.3. Stres

Bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir ve bitki toleransı ile yakından ilişkilidir (Özcan ve ark. 2001). Kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk, metal, pestisid ve toprak pH'sı gibi stres faktörleri bitkilerdeki tüm metabolizmayı olumsuz etkileyerek, ürün verimini, büyüme ve gelişmeyi sınırlandırmakta, hatta bitkiye öldürücü zararlar da verebilmektedir. Bitkiler bu durumda hayatta kalmayı sağlamak için çeşitli stratejilerle tepkiler oluşturmaktadır. Tüm bitki seviyelerinde stresin etkisinin genellikle reaktif oksijen üretimi, büyüme ve fotosentezdeki azalma arasında bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Özcan ve ark. 2001, Raza ve ark. 2006). Stres faktörleri nedeniyle hücrede meydana gelen oksidatif stres; Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) superoksid radikalleri (O_2^-), hidrojenperoksid (H_2O_2), singlet oksijen ve hidroksil radikalleri (OH^\cdot) gibi oluşmasına neden olur. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin sebep olduğu ROS'lar, lipid peroksidasyonu ve membran zararlarında önemli bir role sahiptir. Bitkilerde ROS'ların temizlenmesinde antioksidan maddeler ve enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon s-transferaz (GST)) görev yapmaktadırlar (Morsy ve ark. 2007, Gong ve ark. 2005, Lichtenhaler 1996).

2.3.1. Stres Faktörleri (Stresörler)

Bitkiler yaşamları sürecince birçok stres faktörü ile karşılaşılırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, kimyasal maddeler, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler ekonomik önemi olan tahıllar dâhil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir (Lichtenhaler 1996, Mahajan ve Tuteja 2005).

Dünya üzerinde 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 stresleri takip etmektedir. Bunların dışında kalan tüm diğer stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum 1986). Bu durumda, kuraklık ve tuz stresleri büyümeyi ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden olup bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı indüklemekte ve buna bağlı olarak bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak tolerans mekanizmaları geliştirebilmektedirler (Gong ve ark. 2005, Arora ve ark. 2002).

2.3.2. Metabolik Etki

Strese bağlı olarak bitkilerde bir takım morfolojik ve fizyolojik değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimlerin anlaşılması stres koşullarına daha dayanıklı bitkiler yetiştirmemizde bize yardımcı olacaktır. Abiyotik stres koşullarında, bitkilerde yaprakların nispi nem içeriğinin (NNİ) ve yaprak su potansiyelinin düşmesi fotosentez oranının azalmasına sebep olmaktadır (Lawlor 2001). Bununla birlikte tuzluluk koşullarında fotosentez oranının azalmasının temel sebebinin stomatal sınırlanmadan kaynaklandığı genellikle kabul edilmektedir (Cornic 1996). Stomaların kapanması ile fotosentez oranı ve içsel CO₂ konsantrasyonu azalmakta, bu da sonuç olarak fotosentez metabolizmasını engellemektedir.

Abiyotik stres altında yaprakların absorbe ettiği ışık miktarı ve yararlanılan ışık arasındaki dengenin bozulması nedeniyle fotosentez aktivitesinin gerilediği

bilinmektedir (Foyer ve Noctor 2000). Bu koşullarda fotosistem II'de elektronların oluşması ve kullanımı arasındaki denge bozulur. Kuraklık stresi altındaki bitkilerin kloroplastlarındaki bu fotokimyasal değişiklikler sonucu fotosistem II'de aşırı miktarda biriken ve kullanılmayan ışık enerjisi dokularda aktif oksijen türevlerinin (O_2 , H_2O_2 , OH) oluşumuna neden olmaktadır (Peltzer ve ark. 2002). Stres altında stomaların kapanmasına bağlı olarak yaprakların mezofil dokularında CO_2 seviyesinin hızla düşmesi ve süperoksit radikallerinin (O_2) artması ile bitki dokularında moleküler oksijen ile rekabet eden NADP'ler indirgenerek NADPH birikir. Bu koşullarda bitki dokularında NADP miktarı azalır ve oksijen alternatif elektron alıcısı olarak görev yapar. Bu durumda bitki dokularında indirgenmiş oksijen türevleri olan süperoksit radikalleri (O_2) ve bunun indirgenmiş formu olan H_2O_2 ve hidroksil (OH) radikalleri Haber-Weiss adı verilen reaksiyon ile oluşur (Cadenas 1989, Sairam ve Saxena 2000). Aktif oksijen çeşitleri olarak adlandırılan süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksit radikalleri, lipid peroksidasyonuna ve sonuçta membran zararlanmasına, proteinlerin degradasyonuna, enzimlerin inaktivasyonuna, pigmentlerin azalmasına ve DNA zincirlerinin bozulmasına yol açmaktadır (Fridovich 1986, Liebler ve ark. 1986, Davies 1987, Imlay ve Linn 1988). Antioksidan enzimler bitkilerin, süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin toksisitesini önleyebilmeleri ve oksitadif strese karşı dayanımlarında önemli bir savunma mekanizmasıdır. Bitkiler hücrelerini bu toksik oksijenlerden süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutathion reduktaz, katalaz enzimleri ve bunların metabolitleri olan glutathion, askorbik asit, α -tokoferol ve karoteinoidler ile korurlar. Süperoksit radikalleri (O_2) bitki dokularında SOD tarafından H_2O_2 'e dönüştürülürler, H_2O_2 'de bitki dokuları için toksik özellik taşır ve bu aşamadan sonra CAT ve APX tarafından toksik H_2O_2 dokular için zararlı olmayan O_2 ve H_2O 'ya dönüştürülürler (Liebler ve ark. 1986, Sairam ve ark. 1998, Sairam ve Saxena 2000). Bu durum antioksidan enzim sistemleri güçlü olan bireylerin stres koşullarına toleranslarını artırır.

2.4. SYBR Green yöntemi ile Real Time PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda görülen floresan ışık teknikleriyle beraber gelişmeler kantitatif yada gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR; (qRT-PCR)) imkanlarını ortaya çıkarmış ve geniş kullanım alanlarının doğmasına yol açmıştır. Hâlihazırda kullanılan qRT-PCR teknolojileri *TaqMan*, *Molecular Beacons*, *Scorpions*

ve *SYBR Green* yöntemleridir. Bu tekniklerin her birinde ortak olan oluşturulan PCR ürünlerinin floresan sinyal üretimi ile belirlenmesidir.

SYBR Green yönteminde kullanılan florojenik boya solusyon halinde çok az floresan ışığa yaparken, çift zincirli DNA (dsDNA)'ya bağlandığında çok güçlü bir ışığa yol açar. Diğer yöntemler ise *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) sistemine dayalı olup bir florojenik boya ile bir *quencher* biriminin aynı veya farklı oligonükleotidlerdeki birlikteliğine bağlı floresan sinyal üretmeleri ile belirlenir (Pınarkara ve ark., 2010).

Sonuçta bu yöntemlerde, 100-600 kadar baz çiftinden oluşan kısa DNA dizilerinin eksponansiyel (üstel) olarak çoğaltılması sağlanmış olup, genlerin ekspresyonları sonucu ortaya çıkan nispi RNA miktarı tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Real Time PCR çalışmalarında tamamlayıcı DNA (cDNA) kullanılmakta ve cDNA yoğunluğu her bir PCR döngüsünde ortaya çıkan floresan ışığı yoğunluğundaki artışa bağlı olarak belirlenmektedir.

Bu çalışmada Gen merkezi Anadolu olan *Triticum boeoticum* L.(AA genomu) yabani buğday genotipinin Bor (B) toksisitesine tolerans mekanizmalarının oksidatif stres ile ilgili fizyolojik parametrelerinin bor uygulamalarına bağlı olarak bitkilerin yaş ve kuru ağırlıklarındaki azalmalar, Bağlı su içeriği ve Bor konsantrasyonları bakımından genotipteki farklılıklar belirlenmiştir. Yabani buğday genotipinin bor stresine tolerans düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin toleranstaki etkisi belirlenmiştir.

Kültür buğdaylarında daha önce belirlenmiş bir bor taşıyıcı proteine (transporter) ait buğdayda borun taşınmasında rol alan genin, *T. boeoticum* L. da belirlenerek, bu gene ait ekspresyonların abiyotik stres koşullarında farklı bor dozlarına bağlı olarak değişimlerinin Real-Time PCR metodu ile incelenerek bitkilerin bora karşı olan tepkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Gramineae (buğdaygiller) familyasında yer alan *Triticum* L. cinsine ait *Triticum boeiticum* L. yabani buğday genotipi materyal olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan yabani buğday genotipi, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

Laboratuar çalışmaları S.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik Araştırma Laboratuvarı ile Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarları'nda yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Bitki Biyoteknolojisi ve Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarları

3.1. Deneme serilerinin hazırlanması

Araştırmada kullanılan *T. boeiticum* L. genotipi iklim odasında kontrollü koşullarda yetiştirilmiştir. İklim odası; bitkilerin tohum çimlenmesi ve çimlenme sonrası genç fidecikleri, büyüme ve gelişme süresince % 45-55 nem, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyod, 21 ± 1 °C sıcaklık ile 10000 Lüks/Gün ışık intensitesi olacak şekilde ayarlanmıştır.

Denemede kullanılan tohumlar önce %5'lik sodyum hipoklorid ile 10'ar dakika muamele edildikten sonra de-iyonize su (dI -H₂O) ile 3 kez yıkanarak sterilize edilmişlerdir. Daha sonra saksılar saf su ile yıkandıktan sonra içlerine süper iri perlit

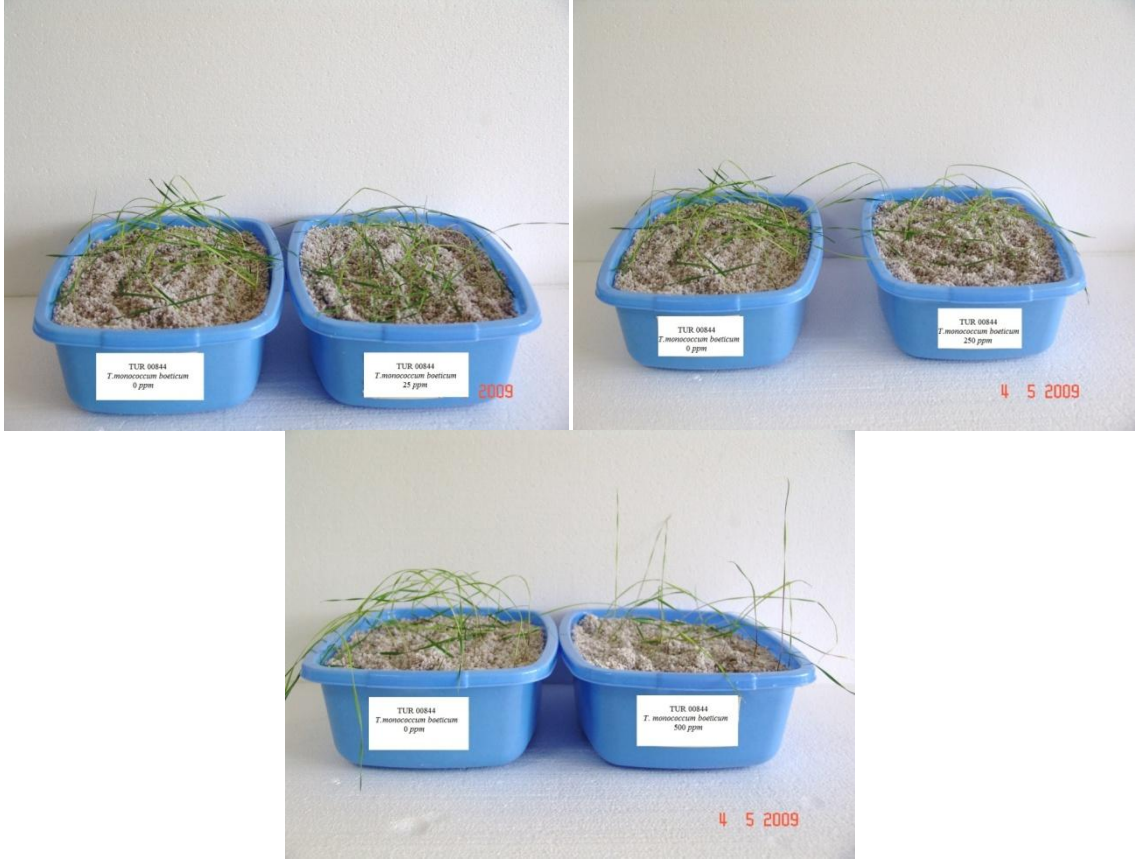
(0,0-5 mm.) konulmuş ve her saksıya her uygulama için 20 adet tohum ekilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2 Tohumların perlit ortamına ekilmesi

Tüm serilerde sulama iki günde bir ve eşit miktarda *Half Hoagland* besin çözeltisi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna sadece *Half Hoagland* besin çözeltisi, diğer serilere ise 25, 250 ve 500 mg kg⁻¹ bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulanmıştır.

Bitkilerin ilk üç yapraklı evresi denemenin ilk başlangıç günü, 0. gün, diğer bir deyişle ilk kronik doz 25 mg kg⁻¹ ve akut dozlar olan 250 ve 500 mg kg⁻¹ bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi ile sulamanın yapıldığı gün olarak kabul edilmiştir. Denemede kullanılan Yabani buğday çeşidi *T. boeiticum* L. için 0. Gün olarak 19.03.2010 tarihi tespit edilmiş ve bor dozları uygulanmasına başlanmıştır. Denemede bor uygulamasını takip eden günden itibaren ilk tepkilerin görülmeye başlandığı gün (Şekil 3.3) ilk örnekleme yapılmıştır.



Şekil 3.3 İlk tepkilerin görülmesiyle birlikte örnek alım zamanı

Bitkiler bor uygulamasının sonrasında ilk tepkinin görüldüğü gün (7. Gün) ve ölüm evresine (14. Gün) yaklaşıma günlerinde hasat edilmişler ve örnekler enzim analizlerinde kullanılmak üzere -80°C ' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

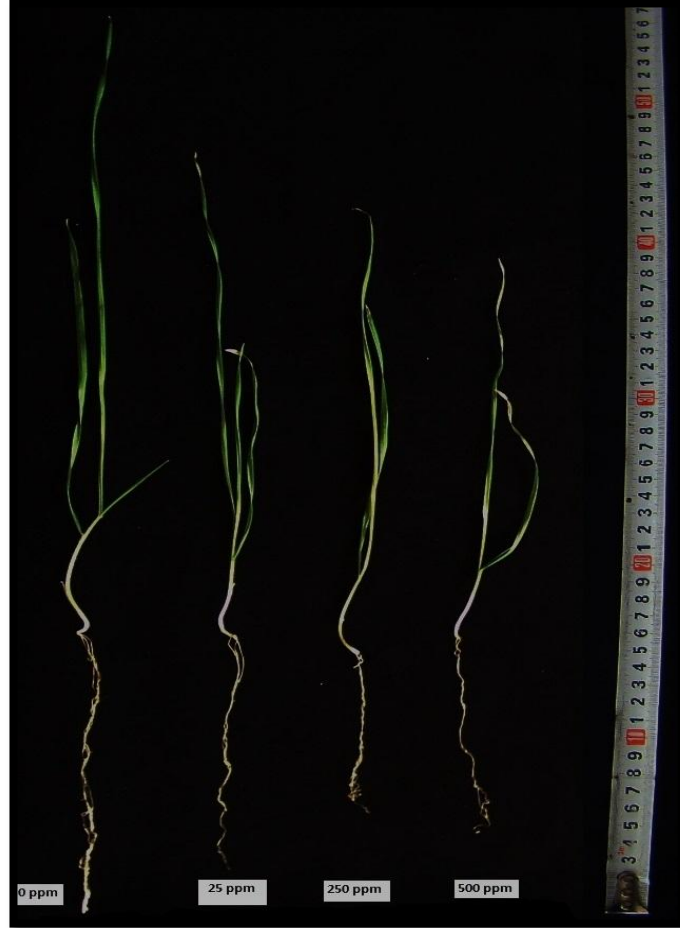
Moleküler analizler için 3 farklı dönemde (Bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulandıktan bir gün sonra, Bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulandıktan bir hafta sonra ve hasat öncesi) her bir bireyden ayrı ayrı yaprak ve kök örnekleri alınmıştır. Özellikle RNA analiz örnekleri alınırken bitki RNA'sının dış etkenlerden korunması için RNase off ile muamele edilmiş eldivenler ve önceden hazırlanmış temiz poşetler kullanılmıştır. RNA analiz örnekleri sıvı azotta ani şoklama ile dondurularak -80°C derin dondurucuda RNA izolasyonuna kadar muhafaza edilmiştir.

3.2. Uygulanan Analiz Yöntemleri

Bor elementinin bitki türlerindeki fizyolojik etkileşimini belirlemek ve amaçta belirtilen hedeflere ulaşabilmek için bitkilerde aşağıda belirtilen çalışmalar yapılmıştır;

3.2.1. Büyüme parametreleri

Kontrol ve bor uygulanmış gruplardan; ilk tepkinin görüldüğü gün ve ölüm evresinde bitki örnekleri alınarak kökleri ve gövdeleri birbirinden ayrılmıştır. Kök ve gövdenin uzunlukları ölçülmüş (Şekil 3.4), yaş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır. Örnekler 70 °C de 72 saat etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Bitkilerde Kök ve Gövde Uzunluklarının Ölçülmesi

3.2.2. Bağlı su içeriği

Bor uygulamasının ilk tepkinin görüldüğü gün ve ölüm evresinde her bir gruptaki bitkilerden en genç sürgünlerden sonra gelen lateral yaprakların uç kısımlarından seçilen dört adet yaprak örneği alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Altı saat boyunca dI-H₂O içinde petri kaplarında bekletilerek turgor haline gelmeleri sağlanmıştır. 70 °C' de 72 saat etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıklar saptanmıştır.

Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır;

$$\text{Bağıl Su İçeriği (\%)} = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

YA=Yaş Ağırlık

KA=Kuru Ağırlık

TA=Turgorlu Ağırlık

3.2.3. Bitkilerde bor analizi

Hasat sonrası kese kağıtları içerisinde laboratuara getirilen bitkilerin vejetatif aksamı ve kök aksamı tamamen temizleninceye kadar musluk suyu ile yıkandıktan sonra sırasıyla bir kez saf su, 0.2 N HCl çözeltisi, iki kez saf su ve bir kez de deiyonize su ile yıkanıp, kaba filtre kağıdı üzerinde fazla suları alınmıştır. Daha sonra kese kâğıdına ayrı ayrı konulan bitki kısımları hava sirkülasyonlu kurutma dolabında 70 °C’ de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuşlardır. Kuruyan bitki örneklerinin ağırlıkları belirlendikten sonra tungsten kaplı bitki öğütme değirmeninde öğütülmüşlerdir. Polietilen kavanozlara konulan öğütülmüş bitki örnekleri analizde kullanılmadan önce 70°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutma dolabında bırakılmış ve kavanozların kapakları sıkıca kapatılmıştır.

Kurutulan ve öğütülen bitki örneklerinden 0.3 g tartılmış, 5 ml HNO₃ ile yüksek sıcaklık (210 °C) ve yüksek basınç (200 PSI) altında mikrodalga cihazında (CEM Mars 5) çözündürülmüştür. Daha sonra örnekler 25 ml’ lik balonjoje’ye aktararak soğutulmuş, deiyonize su ile derecesine tamamlanmıştır. Bu süzükler hemen ince gözenekli (Whatman No:42 veya mavibant) filtre kağıdı ile süzülerek 25 ml’lik polietilen şişelere aktarılmış ve süzükte bor içerikleri ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer) (Varian- Vista, axiel) cihazı ile Elementel Analiz Laboratuarlarımızda belirlenmiştir (Soil Survey Laboratory Methods Manual, 2004).

3.2.4. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Antioksidan enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda saklanmış olan yapraklar, soğutulmuş havanda 0,5 g yaprak örnekleri sıvı azotta %2 w/v polyvinylpolyprrolidone (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren pH 7,8’de 50 mM Na-fosfat

tamponuyla homojenize edilmiştir. Filtrasyon sonrası +4 °C'de, 14 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, enzim aktivitesi analizlerinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Prolin Analizi

Serbest prolin içeriğinin belirlenmesi Bates ve ark. 'na (1973) göre yapılmıştır. Sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometreden okunmuştur. Prolin konsantrasyonu, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve $\mu\text{mol prolin g}^{-1}$ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi TBAR reaksiyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) miktarının belirlendiği Madhava ve Sresty'nin (2000) tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. Aktivite için 532-600 nm aralığında absorbans değişimlerine bakılmıştır.

3.2.7. RNA İzolasyonu

Bitki için olumlu sonuç veren özel amaçlı RNA kitleri kullanılarak hassas analizlerde kullanılabilecek kalite ve miktarlarda RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA analizleri için 3 farklı dönemde (Bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulandıktan bir gün sonra, Bor içeren *Half Hoagland* çözeltisi uygulandıktan bir hafta sonra ve hasat öncesi) örnek alınarak yaprak ve kök örnekleri ayrı ayrı sıvı azotta toz haline getirilip (EZ-RNA Total RNA Isolation Kit), RNA izolasyonları yapılmıştır.

- Örnekler steril havan içinde, sıvı azotta toz haline gelinceye kadar ezilmiştir.
- Ezilen örnek, steril 2 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine kullanmış olduğumuz RNA izolasyon kitinin bileşenlerinden olan A solusyonu 500 μl olarak ilave edilmiştir.
- Bu işlemin ardından tüplere izolasyon kitinin diğer bileşeni olan B solusyonundan 500 μl ilave edilmiştir.

- Tüplerin aynı süre vortekslenmesiyle elde edilen homojen karışımı içeren tüpler, 4 °C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek tüpler içerisindeki karışımın altta protein ortada DNA en üstte RNA olmak üzere 3 faza ayrılması sağlanmıştır.
- Bunlardan RNA fazları diğerleriyle karıştırılmadan dikkatli bir şekilde başka tüplere toplanarak, tüplerin üzerlerine 500 µl izopropanol ilave edilip vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Ardından tüpler tekrar 4 °C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, tüplerin tabanında RNA peleti olduğu gözlemlenmiştir.
- RNA'ların üzerindeki izopropanol dökülerek yerine -20 °C'de muhafaza ettiğimiz % 75 EtOH % 25 DEPC ddH₂O'dan oluşan karışımın 250 µl'si ilave edilerek, 4 °C 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra etanol uzaklaştırılmıştır.
- Ardından tüpler 5 dakika boyunca 65 °C 'de bekletilerek etanol tamamen uzaklaştırılmıştır.
- Tüplerin içine 25 µl DEPC ddH₂O ilave edilerek 3 dakika boyunca 65 °C 'de bekletilerek RNA pelletinin tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
- RNA okumaları, DNA ve protein bulaşması olup olmadığı gibi kalite belirleyici çalışmalar Nanodrop Biyofotometre kullanılarak, RNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda Nükleik Asitler, 280 nm'de protein, 230 nm'de içeriğe karışan diğer bileşiklerin miktarları belirlenmiştir (Ek 1, Ek 2, Ek 3, Ek 4, Ek 5, Ek 6).
- Konsantrasyonu belirlenen RNA örneklerinin 1 µg olacak şekilde konsantrasyonları eşitlendikten sonra Reverse transcriptase enzimi ile RNA zincirinin DNA zincirine dönüştürülmesi sonucu oluşan ilk zincir komplementer DNA materyali olan cDNA sentezi yapılmıştır.

3.2.8. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, cDNA sentez kitinin (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Litvanya) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

- RNA örneklerinin her birinden, içerisinde 1 µg RNA bulunacak şekilde konsantrasyonları eşitlendikten sonra, tüplerin içine 1 µl *Random Hexamer* ilave edilerek 12 µl'ye tamamlanmıştır.
- Elde edilen karışım 65 °C de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Ardından örnekler buz üzerine alınarak, Polipropilen tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon karışımı her bir örnek için; 4 µl 5x *Reaction Buffer*, 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20u/ µl), 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl), enzim bileşenlerinden oluşturulan bu reaksiyon karışımı tüplere 8'er µl olarak ilave edilmiştir.
- Örnekler *Polymerase chain reaction* (PCR) cihazında 25 °C de 5 dakika, 42 °C de 60 dakika, 70 °C de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- İşlem sonunda elde edilen cDNA'lar kantitatif PCR (Q-PCR) deneylerinde kullanılacakları zamana kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Reid (2007)' ye göre izole edilen potansiyel bor taşıyıcısı genin mRNA dizileri baz alınarak tasarlanan çift taraflı primerler kullanılarak bu genin farklı bor konsantrasyonlarında elde edilen mRNA' ların ekspresyon düzeyleri kantitatif PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Yabani buğdaylarda belirlenen bu gene ait ekspresyonların farklı bor dozlarına bağlı olarak varsa değişimleri Real Time PCR metoduyla belirlenmiştir. Real Time PCR çalışmalarında *Puroindolin b* housekeeping geni normalizasyonda kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. SYBR Green Miks ile Çalışılan Primerler

Primerler	Sekansları	Uzunluk (mer)	Son Ürün (Basepair)
TABOR2REID07RT	F 5`- GATGGGTCTGCATTTGGACT -3`	20	103
	R 5`- CCAAAAAGCTCTCCTGCAAC -3`	20	
<i>Puroindolin b</i>	F 5`- ATTTTCCATTCACTTGGCCC -3`	20	92
	R 5`- TGCTATCTGGCTCAGCTGC -3`	19	

Deneilerimizde *TABOR2REID07RT* ekspresyonları SYBR Green Q-PCR Master Mix ile çalışıldı. Bu miks, PCR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde bulundurmakta ve SYBR Green boyası için FAM filtresi kullanılmaktadır. Deneilerde

ekspresyonuna bakılacak primerlerin (Çizelge 3.1.) Çizelge 3.2.'deki reaksiyon bileşenlerine eklenmesiyle, reaksiyon hacmi her bir örnek için 25 µl olarak hazırlandı.

Çizelge 3.2. SYBR Green Miksle Hazırlanan 25 µl Reaksiyon Hacmi Bileşenleri

Ekspresyonuna bakılacak forward primer (10 pmol /µl)	1.5 µl
Ekspresyonuna bakılacak reverse primer (10 pmol /µl)	1.5 µl
SYBR Green Master Miks	12.5 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	8.5 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan örnekler optik kapaklı tüpler içerisinde Q-PCR (Stratagene MX3000 P, USA) cihazına yerleştirildi. Deneylerin amplifikasyon koşulları, her bir primer için Fermantas SYBR Green Q-PCR Master Mixi kullanılarak optimize edildi. *TABOR2REID07RT* primeri için çizelge 3.3.'deki Q-PCR koşulları uygulandı.

Çizelge 3.3. SYBR Green ile çalışılan *TABOR2REID07RT* Q-PCR Amplifikasyon Koşulları

94 °C	3 dakika	} 40 Döngü
94 °C	45 saniye	
59 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	5 dakika	

SYBR Green yöntemiyle yapılan Q-PCR'ın başlangıcında ortamda tek zincirli cDNA molekülü, primerler ve reaksiyon tampon çözeltisi içinde SYBR Green boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest cDNA molekülü tek zincirli olduğu için çok az bir floresan ışımaya yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında ise SYBR Green, çift zincirli cDNA'nın arasına girerek floresan yayılımı başlatmaktadır. Başlangıçtaki döngülerde zayıf olan floresan sinyal; oluşan ekspresyona bağlı olarak belirli sayıda çoğaltım sonrasında ilerleyen döngülerde hızla artmaya başlamaktadır.

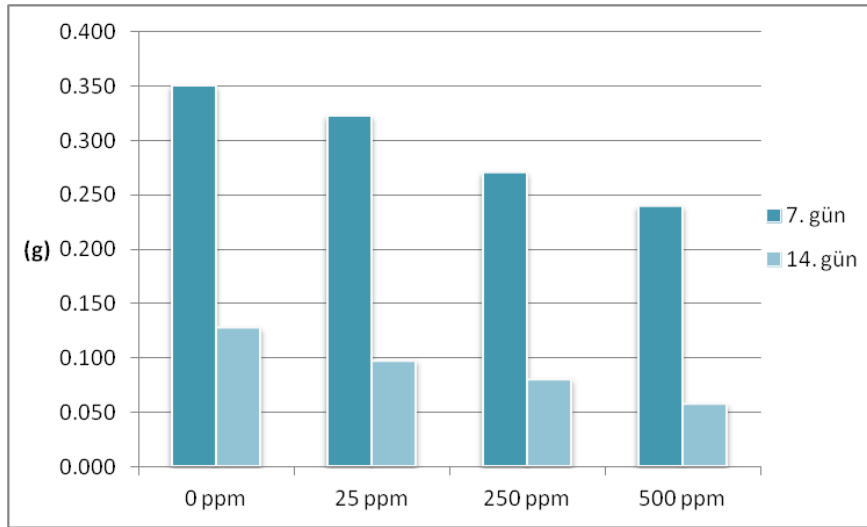
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Parametreleri

Araştırmada, *Triticum boeoticum* L. genotipine toksik seviyede uygulanan borun bitkinin yaş ve kuru ağırlık ile kök ve gövde uzunluğu değerlerine ait veriler ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

4.1.1. Gövde yaş ağırlığı

T. boeoticum L. genotipine toksik seviyede B uygulamasının 7. ve 14. gününde ölçülen gövde yaş ağırlıklarına (g) ait grafikler Şekil 4.1’ de verilmiştir. Yapılan analizlerde, kullanılan genotip ve uygulamalar arası farklılık, gövde yaş ağırlığı bakımından uygulamanın 7. ve 14. gününde alınan örneklerde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.1. *T. boeoticum* L. genotipinin B toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen gövde yaş ağırlıkları

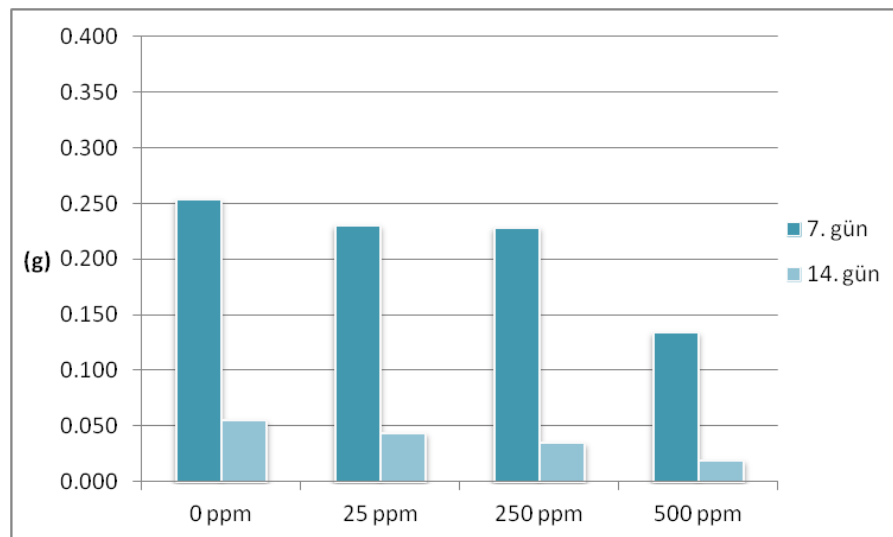
Grafikte görüldüğü gibi B dozunun artması ile gövde yaş ağırlıklarında genel olarak hem 7. hem de 14. günde azalma meydana gelmiştir. *T. boeoticum* L. genotipinin gövde yaş ağırlığı 7. günde 0 mg kg⁻¹ dozuna göre kıyaslandığında 25 mg kg⁻¹ ‘de % 7.90, 250 mg kg⁻¹ de % 22.81, 500 mg kg⁻¹ de % 31.67 oranında azalma görülmüştür. 14. günde 0 mg kg⁻¹ göre kıyaslandığında 25 mg kg⁻¹ ‘de % 23.58, 250 mg kg⁻¹ de %

37.14, 500 mg kg⁻¹ de % 55.25 oranında azalma meydana gelmiştir(Şekil 4.1). Bu azalmalar, hem 7. günde, hem 14. günde kontrole kıyasla 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde olduğu görülmüştür.

Tahıllarda bora hassasiyet bakımından tür ve çeşit seviyesinde benzer tepki farklılıkları Brezilya, Çin, Hindistan, Nepal, Tayland ve Türkiye gibi değişik ülkelerde yapılan tarla denemelerinde belirgin olarak ortaya konulmuştur (Silva ve Andrade 1983, Tandan ve Nagvi 1992, Subedi ve ark. 1993, Rerkasem ve Jamjod 2004, Torun ve ark. 1999, Topal ve ark., 2002, Soylu ve ark., 2004). Bu nedenle buğday çeşitlerinin bora dayanıklı veya hassasiyetlerinin belirlenmesinde yaş gövde ağırlıklarına etkisi ortaya konularak genotip için bir genelleme yapıldığında, *T. boeiticum* L. genotipinin B toksitesine hassas olduğu söylenebilir. Benzer şekilde Rerkasem ve Jamjod (1997), buğdayda bora hassasiyet bakımından türler arasında farklılıklar görüldüğünü, bazen de tür içerisinde bile geniş bir genotipik varyasyon olabileceğini bildirmiştir.

4.1.2. Gövde kuru ağırlığı

T. boeiticum L. genotipine toksik seviyede B uygulamasının 7. ve 14. günde ölçülen ortalama gövde kuru ağırlıkları (g) Şekil 4.2.'te verilmiştir.

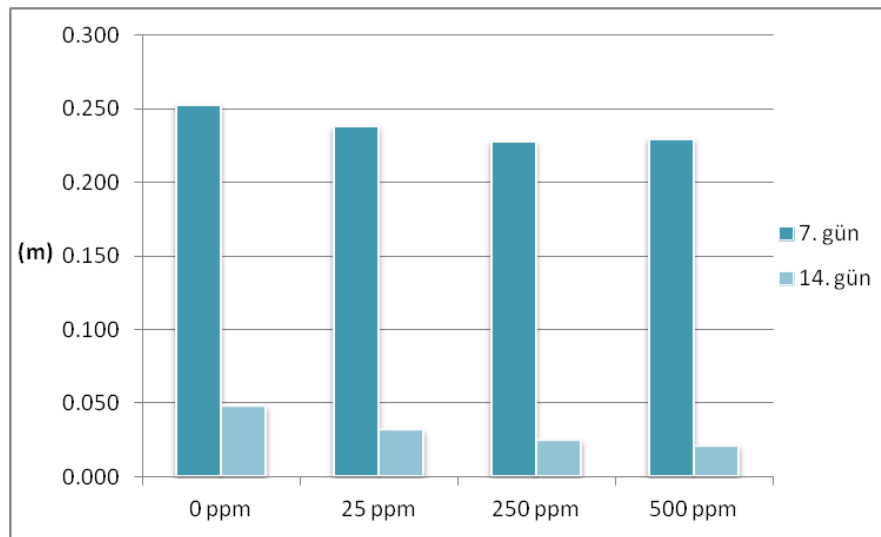


Şekil 4.2 *T. boeiticum* L. genotipinin B toksitesisi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen gövde kuru ağırlıkları

T. boeticum L. genotipinin 7. günde toksik seviyede B uygulamasının gövde kuru ağırlık etkisine bakıldığında 0 mg kg^{-1} dozuna göre gövde kuru ağırlıkları 25 mg kg^{-1} 'de % 9.21, 250 mg kg^{-1} 'de % 9.88, 500 mg kg^{-1} 'de % 47.02 oranında azalma görülmüştür. 14. günde 0 mg kg^{-1} göre kıyaslandığında 25 mg kg^{-1} 'de % 20.35, 250 mg kg^{-1} 'de % 37.08, 500 mg kg^{-1} 'de % 65.23 oranında azalmış ve bu azalma 7. ve 14. günde de 500 mg kg^{-1} B uygulamasında maksimum düzeyde olmuştur (Şekil 4.2).

4.1.3. Kök yaş ağırlığı

T. boeticum L. genotipinde toksik seviyede B uygulamalarının 7. ve 14. gününde ölçülen kök yaş ağırlıklarına (g) ait ortalama değerler Şekil 4.3'te verilmiştir.

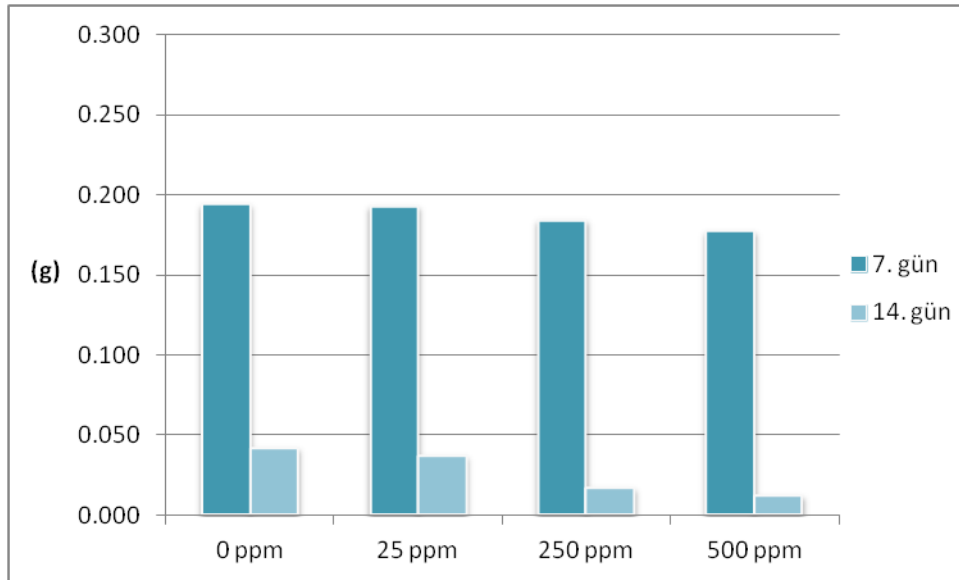


Şekil 4.3 *T. boeticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen kök yaş ağırlıkları

Farklı bor dozlarının uygulandığı *T. boeticum* L. genotipinde B dozlarının artması ile kök yaş ağırlıklarında hem 7. hem de 14. günde genel olarak azalma meydana gelmiştir. 0 mg kg^{-1} dozuna göre kök yaş ağırlıkları 25 mg kg^{-1} 'de % 5.80, 250 mg kg^{-1} 'de % 9.86, 500 mg kg^{-1} 'de % 9.22 oranında azalma meydana gelmiştir. 14. günde 0 mg kg^{-1} B dozuna göre kıyaslandığında 25 mg kg^{-1} B dozunda % 33.97, 250 mg kg^{-1} 'de % 48.84, 500 mg kg^{-1} 'de % 56.39 oranında azalmış ve bu azalma 7. ve 14. günde de 500 mg kg^{-1} B uygulamasında maksimum düzeyde olmuştur (Şekil 4.3).

4.1.4. Kök kuru ağırlığı

T. boeiticum L. genotipinde toksik seviyede B uygulamalarının 7. ve 14. günde ölçülen ortalama kök kuru ağırlıkları (g) şekil 4.4'te verilmiştir.

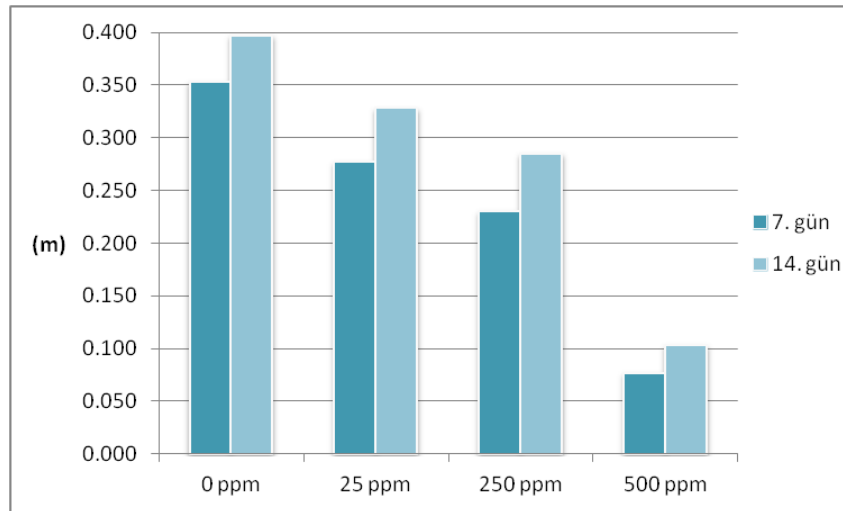


Şekil 4.4. *T. boeiticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen kök kuru ağırlıkları

Toksik seviyede Bor uygulamalarının 7. günde kök kuru ağırlıklarına etkisine bakıldığında, 0 mg kg⁻¹ dozuna göre 25 mg kg⁻¹ 'de % 0.52, 250 mg kg⁻¹ 'de % 5.01, 500 mg kg⁻¹ 'de % 8.65 oranında azalma meydana gelmiştir. 14. Günde kök kuru ağırlıkları 0 mg kg⁻¹ B dozuna göre kıyaslandığında 25 mg kg⁻¹ 'de % 11.88, 250 mg kg⁻¹ 'de % 60.49, 500 mg kg⁻¹ 'de % 71.72 oranında azalmış ve bu azalma 7. ve 14. günde de 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde olmuştur (şekil.4.4).

4.1.5. Gövde Boyu

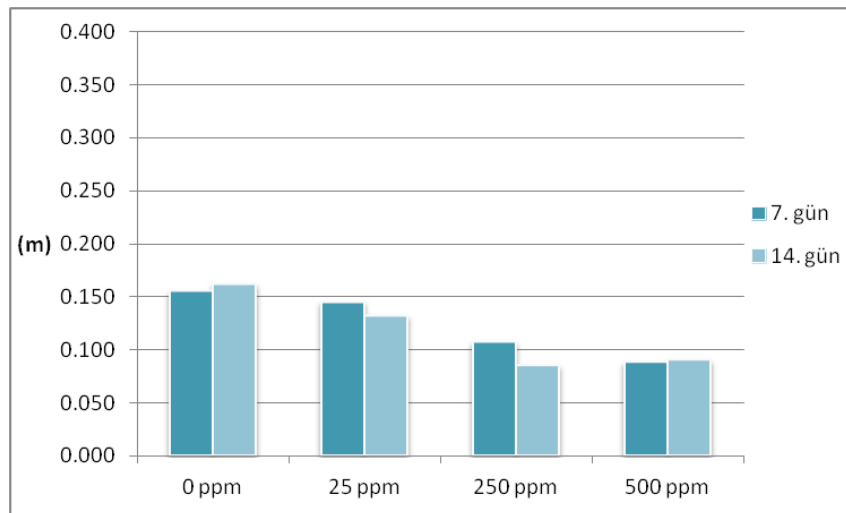
Farklı B dozlarına bağlı olarak *T. boeiticum* L. genotipine ait 7. gün ve 14. gün için ortalama gövde uzunlukları şekil 4.5. 'te verilmiştir. Yapılan analizde 0 mg kg⁻¹ dozuna göre gövde uzunluğu bakımından tüm dozlarda azalma görülmüş ve bu azalma 7. günde en fazla 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde (% 78.19) olurken, 14. günde 0 mg kg⁻¹ dozuna göre, en fazla 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde (% 74.06) gövde uzunluğunda azalma görülmüştür.



Şekil 4.5. *T. boeticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen gövde boyu değerleri

4.1.6. Kök Boyu

Farklı B dozlarına bağlı olarak *T. boeticum* L. genotipine ait ortalama kök uzunlukları (m) şekil 4.6 'da verilmiştir.

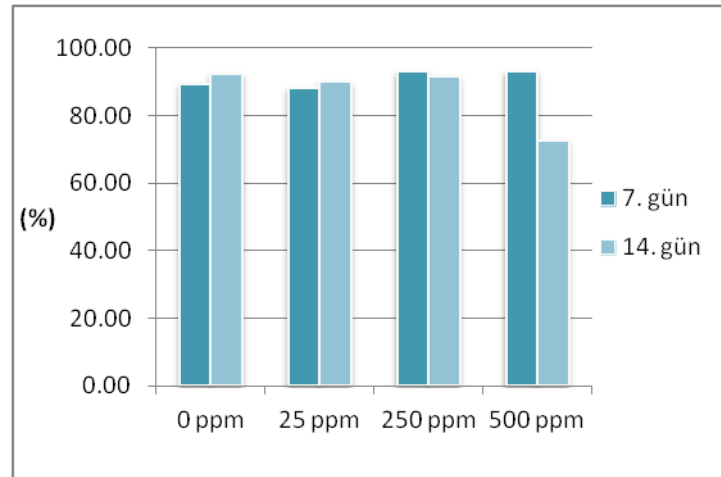


Tablo 4.6. *T. boeticum* L. genotipinin bor toksisitesi bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen kök boyu değerleri

Toksik seviyede Bor uygulamasının *T. boeticum* L. genotipinin kök uzunlukları üzerine etkisine bakıldığında B dozunun artırılması ile genotipte 7. ve 14. günde kök uzunlukları genel olarak azalmış ve bu azalma 0 mg kg⁻¹ dozuna göre kıyaslandığında 7. günde en fazla 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında (% 43.23) olurken, 14. günde de 500 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde azalma (% 44.44) olmuştur.

4.2. Bağlı su içeriği

T. boeiticum L. genotipinde toksik seviyede B uygulamalarının 7. ve 14. günde ölçülen, ortalama bağlı su içeriği (%) değerleri şekil 4.7.'de verilmiştir.



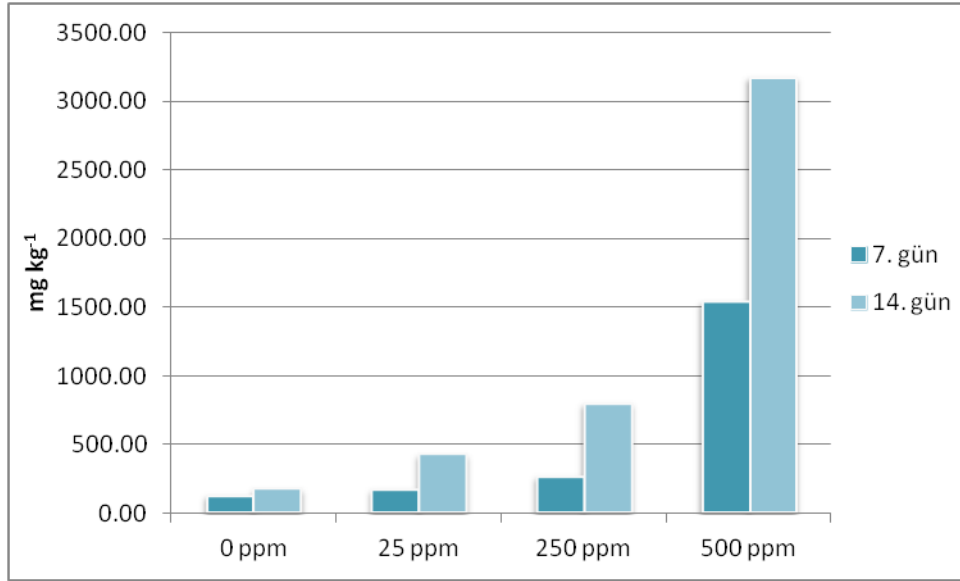
Şekil 4.7. *T. boeiticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen bağlı su içeriği (%) değerleri

Toksik seviyede B uygulamalarının yaprak bağlı su içeriği etkisine bakıldığında 7. günde, B uygulaması ile bağlı su içeriği değerleri genel olarak artmıştır. B dozu uygulamaları 0 mg kg⁻¹ B dozuna göre kıyaslandığında bu artış, 7.günde 250 mg kg⁻¹ B uygulamasında maksimum düzeyde (% 4.02) olurken ve 14.günde 0 mg kg⁻¹ B dozuna göre kıyaslandığında genel olarak azalmış ve bu azalma 500 mg kg⁻¹ B dozu uygulamasında (% 21.31) maksimum düzeyde olmuştur. (şekil 4.7).

4.3. Bor Konsantrasyonu Değerleri

4.3.1. Gövde bor konsantrasyonu

T. boeticum L. genotipinin gövde B içerikleri ICP-AES cihazı ile belirlendikten sonra 7. gün ve 14. gün 'e ait B miktarları mg kg^{-1} olarak hesaplanmış ve elde edilen ortalama değerler şekil 4.8.'de verilmiştir.

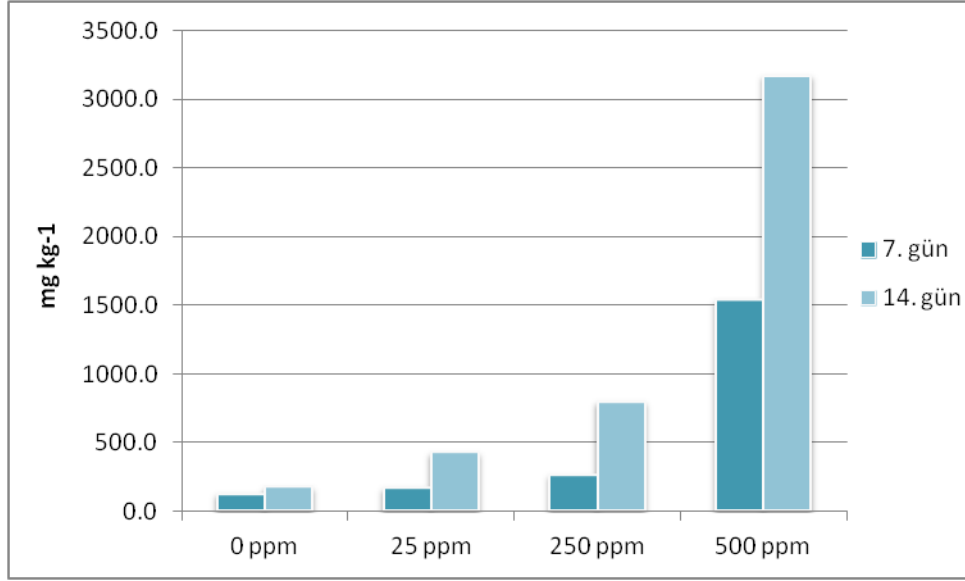


Şekil 4.8. *T. boeticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen gövde bor konsantrasyonu değerleri

7. ve 14. günde Genotip x B dozu interaksyonu incelendiğinde gövde B konsantrasyonları 60.55 ile $3205.82 \text{ mg kg}^{-1}$ arasında değişim göstermiştir. Bor dozu uygulamaları 0 mg kg^{-1} B dozuna göre kıyaslandığında 7. ve 14. günde de en fazla B konsantrasyonu, 500 mg kg^{-1} B dozunda tespit edilmiştir. (şekil 4.8.).

4.3.2 Kök bor konsantrasyonu

T. boeticum L. genotipinin kök B içerikleri ICP-AES cihazı ile belirlendikten sonra 7. gün ve 14. gün 'e ait B miktarları mg kg^{-1} olarak hesaplanmış ve elde edilen ortalama değerler şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *T. boeiticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. günde elde edilen kök bor konsantrasyonu değerleri

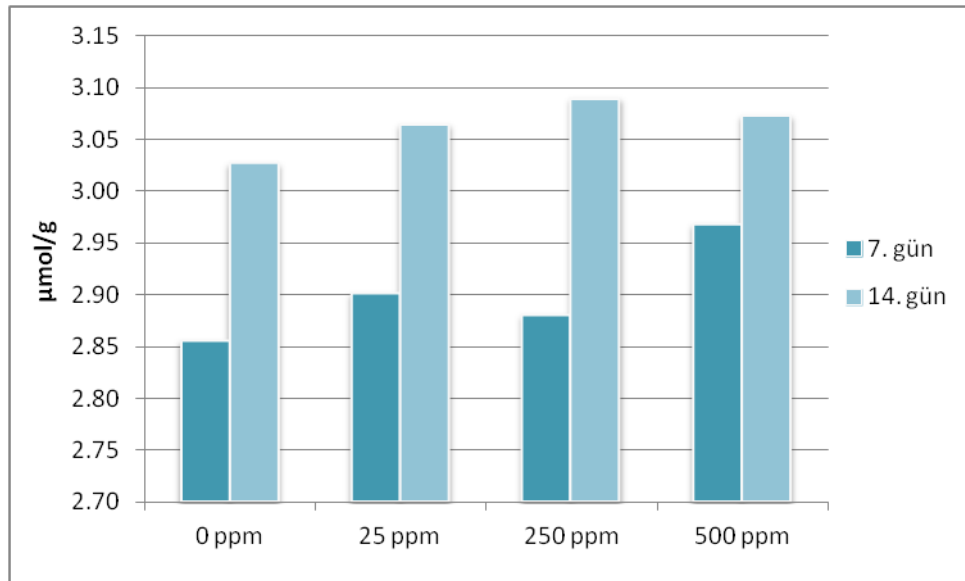
T. boeiticum L. genotipine toksik seviyede B uygulamasının 7. ve 14. günde Genotip x B dozu incelendiğinde kök B konsantrasyonları 122,07 ile 3176,59 mg kg⁻¹ arasında değişim göstermiştir. Farklı B dozu uygulamaları 0 mg kg⁻¹ B dozuna göre kıyaslandığında 7. ve 14. günde en fazla B konsantrasyonu, 500 mg kg⁻¹ dozunda tespit edilmiştir (şekil 4.9.).

4.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

T. boeiticum L. genotipine toksik seviyede bor uygulamalarının antioksidant enzim aktivitelerinin belirlenmesi için; prolin (PRO) ve lipid peroksidasyon (MDA) ölçümleri yapılmış, elde edilen veriler grafikler halinde şekil 4.11 ve 4.12 de verilmiştir.

4.4.1. Prolin bulguları

Araştırma sonucunda denemede kullanılan *T. boeiticum* L. genotipine ait prolin değerlerinin, farklı B dozu uygulamalarına göre değişimleri şekil 4.11' de verilmiştir.

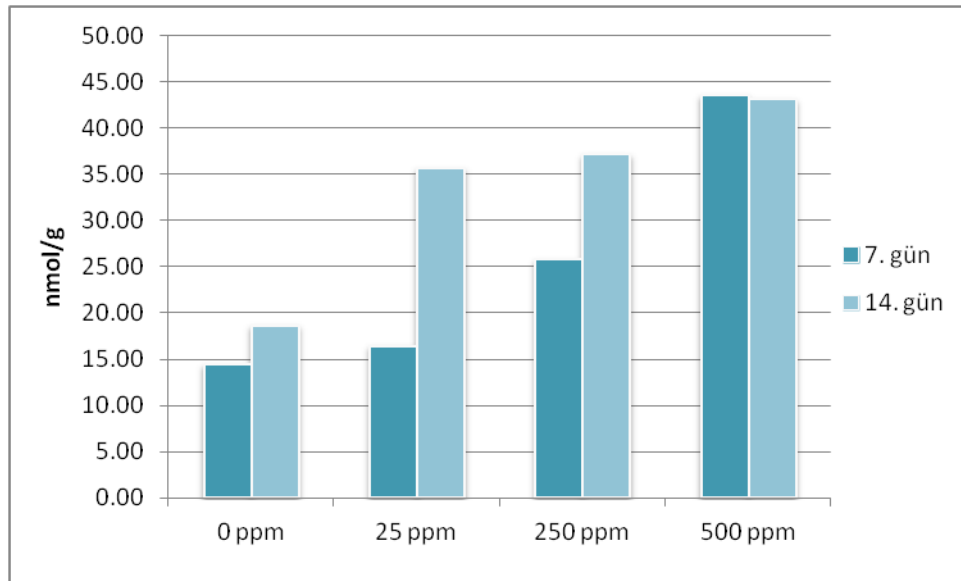


Şekil 4.11. *T. boeiticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. gün prolin değerleri

Denemede 7. gün örneklemelerinde kontrole kıyasla, 25 mg B kg⁻¹ dozunda %1.61, 250 mg B kg⁻¹ dozunda %0.88, 500 mg B kg⁻¹ B dozunda artış %3.96 oranında artış belirlenmiştir. Araştırma ile ilgili olarak 14. gün de yapılan örneklendirmelerde *T. boeiticum* L. genotipinin kontrole göre, 25 mg B kg⁻¹ dozunda %1.24 oranında, 250 mg B kg⁻¹ dozunda %2.07 oranında ve 500 mg B kg⁻¹ dozunda da %1.52 oranında artışlar olduğu belirlenmiştir (şekil 4.11).

4.4.2. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan *T. boeiticum* L. genotipine ait lipid peroksidasyon oranları, malondialdehit miktarında meydana gelen değişimlere göre belirlenmiş ve elde edilen değerlere ait grafikler şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12 *T. boeiticum* L. genotipinin bor toksisitesi koşullarında 7. ve 14. gün MDA değerleri

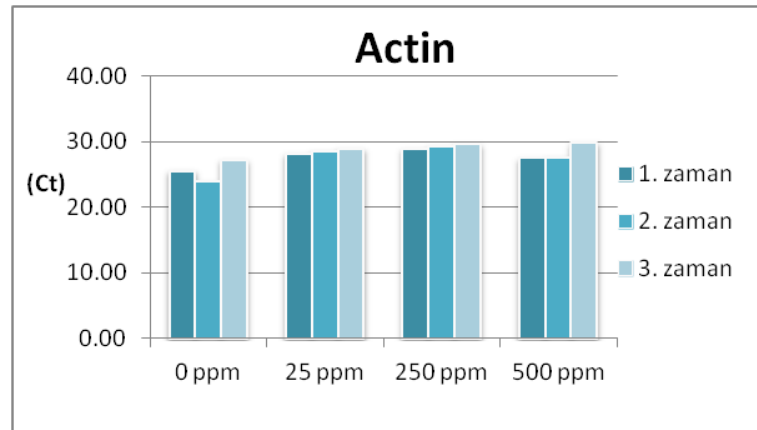
Toksik seviyede Bor uygulamalarına bağlı olarak bitkilerde meydana gelen stres sonucunda artan oksidatif stresin diğer önemli göstergesi membran lipidlerinin peroksidasyonudur ve ortamdaki malondialdehit (MDA) miktarına göre tayin edilmektedir (Eltner ve Osswald, 1994). Denemede kullanılan *T. boeiticum* L. genotipinin farklı b dozlarına göre MDA miktarları farklılık göstermektedir. 7. gün ve 14. gün de yapılan örnekleme MDA miktarları bor uygulamalarına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bor toksisitesinin genotipte yarattığı stresin 0 mg kg^{-1} B dozuna kıyasla 500 mg kg^{-1} B dozun da MDA miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir (şekil 4.12).

4.5. Moleküler genetik Çalışmalara Ait Sonuçlar

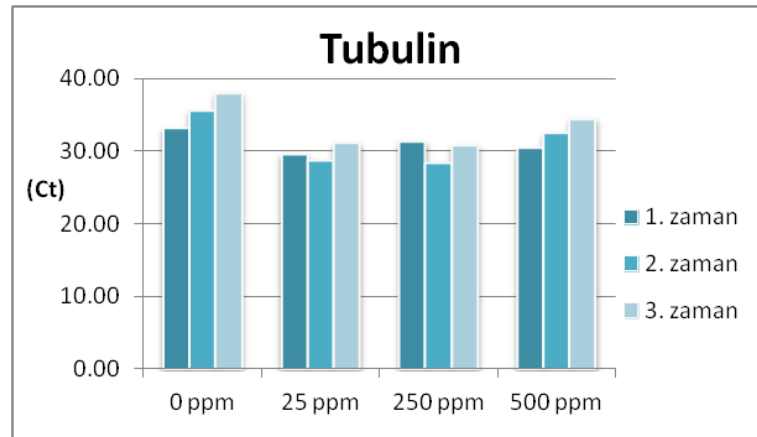
Triticum boeiticum L. (AA genomu), genotipinin farklı zaman dilimlerinde (1. Zaman: Bor (B) uygulamasından 1 gün sonra alınan örnekler, 2. Zaman: B uygulamasından 7 gün sonra alınan örnekler, 3. Zaman: B uygulamasından 14 gün sonra alınan örnekler) alınan kök ve gövde örneklerinden izole edilen RNA ürünlerinin konsantrasyon değerlerine (Ek 1, Ek 2, Ek 3, Ek 4, Ek 5, Ek 6) göre toplam RNA içerikleri belirlenmiş ve bu değerlere göre cDNA sentezleri yapılarak örnekler qRT-PCR işlemleri için uygun hale getirilmiştir. İlgilendiğimiz B taşıyıcı geni olan *TaBOR2'* un farklı B dozlarındaki ekspresyonunu izlemek için *TaBOR2REID07RT* F-R ve ekspresyonun güvenilirliğini kontrol etmek için *Puroindolin b* F-R primerleri kullanılarak

PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder uzunluk markörü ile birlikte yürütülmüştür.

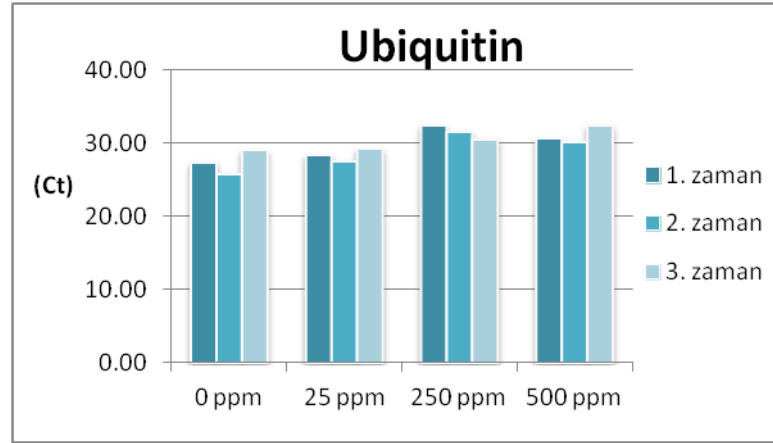
Reid (2007)' ye göre izole edilen bor taşıyıcısı genin *Tabor2REID07RT* mRNA dizileri baz alınarak tasarlanan çift taraflı primerler kullanılmıştır. Bu genin farklı bor konsantrasyonlarında ve farklı zamanlarda (1. Zaman, 2. Zaman, 3. Zaman) elde edilen mRNA ekspresyon düzeyleri kantitatif PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Yabani buğdaylarda belirlenen bu gene ait ekspresyonların farklı bor dozlarına ve farklı zamanlara bağlı olarak ortaya çıkan değişimleri qRT-PCR metoduyla belirlenmiştir. Real Time PCR, normalizasyon çalışmalarında *Actin* (Şekil 4.12.), *Tubulin* (Şekil 4.13.), *Ubiquitin* (Şekil 4.14.), *GAPDH* (Şekil 4.15.), ve *Puroindolin b* (Şekil 4.16.) gibi housekeeping genleri ile analizler yapılmış ve bu sonuçlara göre, *Puroindolin b* geni, referans genin özelliklerini en iyi yansıttığından normalizasyonda *Puroindolin b* geni kullanılmıştır.



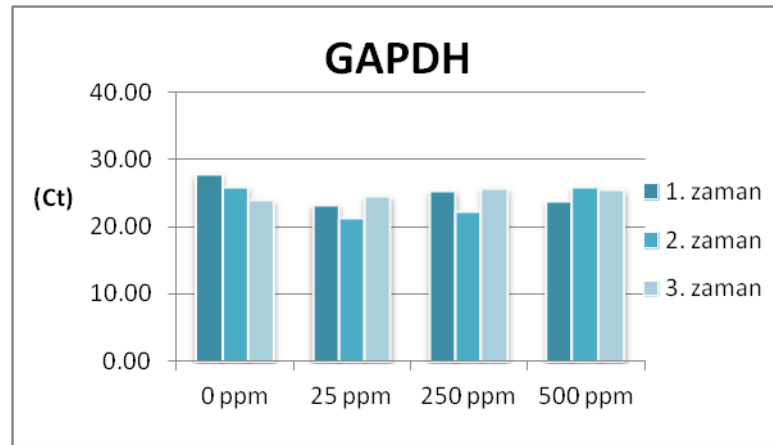
Şekil 4.12. *Actin* housekeeping geninin Ct değerleri



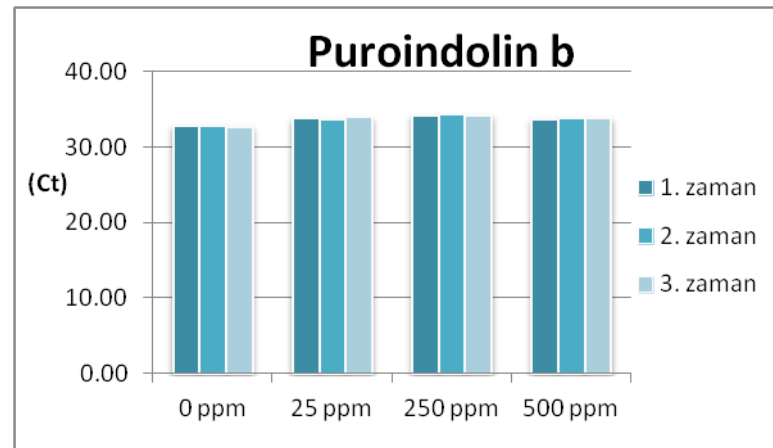
Şekil 4.13. *Tubulin* housekeeping geninin Ct değerleri



Şekil 4.14. *Ubiquitin* housekeeping geninin Ct değerleri



Şekil 4.15. *GAPDH* housekeeping geninin Ct değerleri



Şekil 4.16. *Puroindolin b* housekeeping geninin Ct değerleri

Bu çalışmalar sonucunda *T. boeiticum* L. genotipinin farklı zamanlarda ve farklı B dozlarında kök ve gövde örneklerinden *Tabor2REID07RT* primerleri ile elde edilen gen ekspresyon düzeyleri (Çizelge 4.17., Çizelge 4.18.) belirlenmiştir.

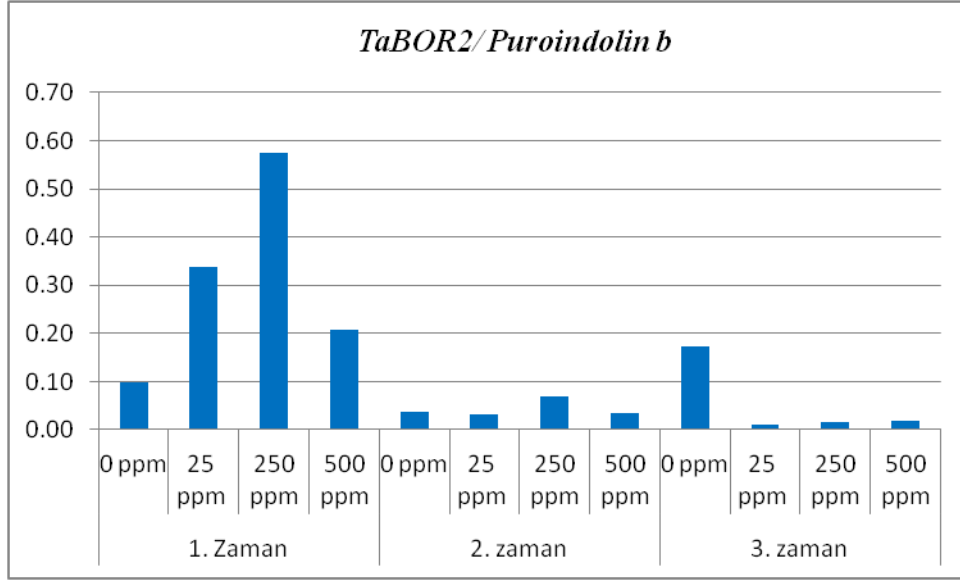
Çizelge 4.17. *T. boeticum* L. genotipinin *TaBOR2* genine ait kök ekspresyon (Ct) değerleri

	1.zaman	2. zaman.	3. zaman
0 ppm	38.46	35.38	40.11
25 ppm	36.24	34.61	38.86
250 ppm	35.40	34.56	37.93
500 ppm	38.37	34.53	39.26

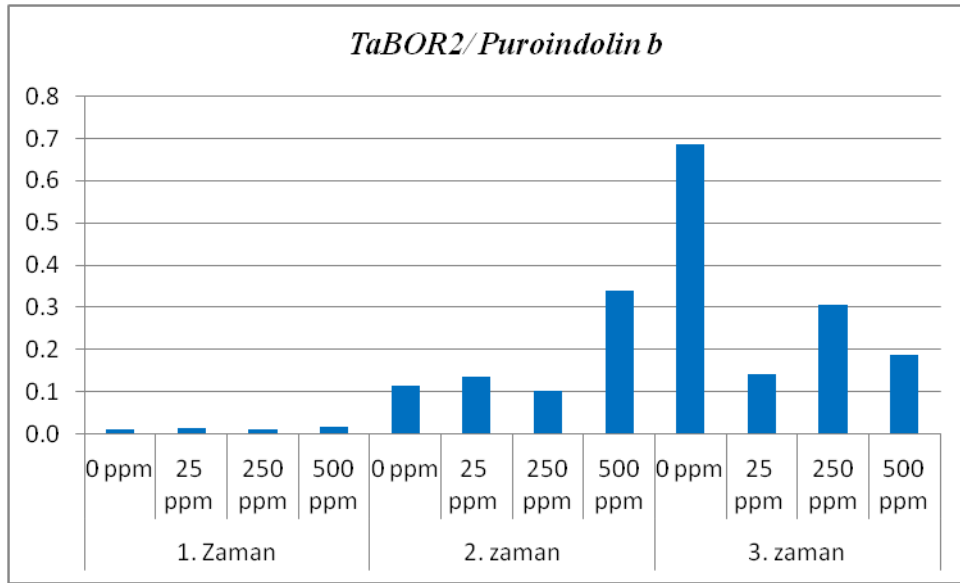
Çizelge 4.18. *T. boeticum* L. genotipinin *TaBOR2* genine ait gövde ekspresyon (Ct) değerleri

	1.zaman	2. zaman	3. zaman
0 ppm	36.47	36.51	35.35
25 ppm	35.40	38.35	36.72
250 ppm	35.02	40.14	36.36
500 ppm	35.62	41.61	36.03

T. boeticum L. genotipine ait kök ve gövde düzeyinde *TaBOR2/puroindolin b* ekspresyon sonuçları (Şekil 4.17., Şekil 4.18.) verilmiştir. Buna göre 1. zamanda diliminde kök örneklerinde yapılan analizler sonucunda kontrole göre 250 mg kg⁻¹ dozunda ekspresyonda yüksek düzeyde bir artış görülmektedir 2. ve 3. zamanlarda ekspresyonun gittikçe azaldığı tespit edilmiştir. Gövde örneklerinde ise bunun tam tersi olmuştur 1. zamanda *TaBOR2/puroindolin b* ekspresyonu oldukça düşükken ilerleyen zamanlarda ve dozlarda ekspresyonda artış olduğu tespit edilmiştir. 3. zaman diliminde kontrol örneklerinde yüksek çıkan ekspresyon verileri ise daha fazla çalışma ile açıklanmaya muhtaçtır.



Şekil 4.17 *T. boeiticum* L. genotipine ait kök *TaBOR2/Puroindolin b* ekspresyonu



Şekil 4.18. *T. boeiticum* L. genotipine ait gövde *TaBOR2/Puroindolin b* ekspresyonu

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İklim odası uygulamaları, kontrollü şartlarda gerçekleştirilen sera-saksı çalışmalarına göre, özellikle de tarla çalışmalarına göre, moleküler yöntemler ve fizyolojik yöntemler açısından daha uygun çalışmalardır. Element alımı gibi içerikteki çok küçük farklılıkların dahi bitkideki metabolik faaliyetlere yansımalarının çok yüksek olabileceği durumlarda, bitki büyütme ortamında yer alan elementlerin mevcut şartlarda en yüksek hassasiyetle ortama uygulanabileceği ve çevresel faktörlerin ortadan kaldırıldığı bir yöntem olması dolayısıyla iklim odası uygulamaları önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında Bor dışlama mekanizmasında yer alan bir B taşıyıcısı olarak bilinen *TaBOR2* geninin sentezlenme düzeylerine bakıldığında, B'un bitkiler tarafından alınabilirliğini etkileyecek, toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör iklim odası koşullarında ortadan kaldırılmakta ve tepkiler net olarak ortaya konmaktadır.

Çalışma kapsamında kullanılan yöntemler sayesinde bitkilerin element alım mekanizmalarının açığa çıkarılmasına katkı sağlanarak, genotiplerin tolerans ve hassasiyetleri tespit edilerek bu bilgiler ışığında kültür bitkilerinde istenilen yönde seçimler yapılabilecektir. Yapılan araştırmalarda bitkilerin başakçık ve çiçek oluşturma sırasında B noksanlığına gösterdikleri tepkilere göre toleranslı hatlardan duyarlı hatlara geri melezleme ile tolerans özelliklerinin transfer edilebileceği ifade edilmiştir. Belirli türlerde B hareketinin bilinmesi, bitkideki B durumunu teşhis etmek için kullanılması gereken yaklaşımın belirlenmesinde kolaylık sağlayacağı, B eksikliğinin sebep ve sonuçlarını anlamaya yardımcı olacağı ve kullanılması gereken optimum gübre miktarının belirlenmesini de sağlayacağı bilinmektedir. Yaptığımız bu tez çalışması kapsamında kullanılan *T. boeiticum* L. genotipinin, özelliklerinin ve B hareketinin belirlenmesi ile özellikleri bilinen uygun bölgeler için uygun genotip seçimlerinde bu yabancı buğday türünden elde edilen bilgilerden faydalanılması planlanmaktadır.

T. boeiticum L. genotipinin toksik seviyede B uygulamalarına verdiği tepkinin moleküler ve fizyolojik seviyede incelenmesi ve bitkiler tarafından bu elementin alım mekanizmasının araştırılması amacıyla yapılan bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

T. boeiticum L. genotipinin kontrollü şartlarda üretildiği ve farklı B dozu uygulamasına tabi tutulan kök ve gövde örneklerinden izole edilen total RNA konsantrasyonlarının yeterli seviyede olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak *T. boeiticum* L. genotipinin kök örneklerinde 1. zaman diliminde genotipte B'un dışlanmasında faaliyet gösteren proteinle (*TaBOR2*) ilgili gerek kritik B içeriğine sahip *Half Hoagland* ortamındaki örneklerde gerekse B içermeyen 0 mg kg⁻¹ ortamındaki örneklerde RNA düzeyleri maksimum seviyede olduğu belirlenmiştir. 2. ve 3. zaman diliminde ise ve aynı genotipin 25 mg kg⁻¹ B, 250 mg kg⁻¹ B ve yüksek B içeren ortamlarda (500 mg kg⁻¹) kök örneklerinde B taşıyıcı proteininin (*TaBOR2*) total RNA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu da bitki gelişiminin ortam koşullarından etkilenmiş olabileceği ile açıklanabilir.

T. boeiticum L. genotipinin kök analiz örneklerinde yüksek B içeren ortamlarda aktif taşınmayla, B'un dışlanmasında faaliyet gösteren proteinin RNA ekspresyon düzeylerinde başlangıçta bir artış olduğu ancak ekspresyonlarda ileriki dönemlerde giderek azalma olduğu belirlenmiştir. En yüksek artışa ise 250 ppm dozunda 1. Zaman diliminde rastlanmıştır. Bu da oldukça anlamlıdır. Çünkü bu örnekler bor uygulamasından bir gün sonra alınmışlardır. 500 ppm dozunda ise, ileri derecede toksik doz, tolerans mekanizmasının fazla boru dışlamada yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Nitekim bu veriler örneklerin fizyolojik analizleri ile de desteklenmektedir.

T. boeiticum L. genotipinin gövde örneklerinde 1. zaman diliminde RNA ekspresyon düzeyleri kritik B içeriğine sahip *Half Hoagland* ortamındaki örneklerde ve B içermeyen 0 mg kg⁻¹ ortamındaki örneklerde *TaBOR2* geninin RNA ekspresyon düzeyleri minimum seviyede olduğu belirlenmiştir. 2. ve 3. zaman diliminde ise ve aynı genotipin 25 mg kg⁻¹ B, 250 mg kg⁻¹ B ve yüksek B içeren ortamlarda (500 mg kg⁻¹) gövde örneklerinde *TaBOR2* proteininin RNA ekspresyon düzeyleri arttığı belirlenmiştir.

T. boeiticum L. genotipinin gövde analiz örneklerinde B içermeyen 0 mg kg⁻¹ ortamındaki ve yüksek B içeren ortamlarda (500 mg kg⁻¹) aktif taşınmayla, *TaBOR2* gen ekspresyonunun 1. zaman diliminde minimum seviyede olduğu belirlenmiş, ekspresyon düzeyinin ileriki dönemlerde giderek arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte 3. Zaman diliminde 0 mg kg⁻¹ B dozu uygulamalarında genin ekspresyonunda çok önemli bir artış olması daha fazla çalışma ile izah edilmesi gereken bir duruma işaret etmektedir. Çünkü bu beklentinin aksi yönünde bir ekspresyon düzeyidir. İhtimal olur ki, burada bitkiye bor taşınmasında devreye giren *TaBOR2* için bir homolog genin

ekspresyon düzeyleri gözleniyor olabilir. Diğer dozlarda ise 2. ve 3. Zaman aralıklarındaki ifade düzeylerindeki artışlar fazla borun kökten alındığı ilk aşamadan sonra gövdeye taşınması ile birlikte bu yüksek düzeydeki borun bitki dışına verilmesinde *TaBOR2* geninin gövdedeki aktivite artışı ile açıklanabilir. Bu sonuçları ilgili zaman dilimlerindeki bor konsantrasyon verileri de desteklemektedir.

Prolin, bitkilerde meydana gelen stres oluşumuyla birlikte serbest radikalleri süpürücü, su stresini dengeleyen ve proteinlerin kararlılığını sağlayan bir osmolit olarak görev yapmaktadır (Jain ve ark., 1991). Prolin ile ilgili yapılan çalışmalarda rollerinin; osmolit olarak görev yapması, hacmin dengelenmesi, proteinlerin stabilizasyonu, sitozilik pH'nın ve hidroksil radikallerinin düzenlenmesi sayılabilir (Matysik ve ark., 2002). Çalışmamızda *T. boeoticum* L. genotipinin 7. günde yapılan örneklemelerinde birbirine benzer şekilde 25 ve 250 mg B kg⁻¹ dozlarında artış olurken, 500 mg B kg⁻¹ dozunda genotipte azalma olduğu belirlenmiştir. 14. günde yapılan örneklemelerde ise genotipe uygulanan B dozlarında artış olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bor toksisitesi koşullarında bitkilerde prolin seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Prolin birikimi hücresel düzeyde osmotik dengenin düzenlenmesinde rol oynayabilir. Bu yüzden osmoregülasyonda önemlidir. Birçok araştırmacı prolinin tüm bitki seviyelerinde ve hücre kültürlerinde osmotik koruyuculuğunu göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile henüz tam olarak aydınlatılmayan B'un bitkideki hareket mekanizmasına moleküler ve fizyolojik düzeyde ışık tutulmaya çalışılmış ve bilgimiz dâhilinde ilk defa, önemli gen kaynağı olan yabani bir buğday türünde B'un dışlanması faaliyet gösteren bir proteinle ilgili RNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiş ve antioksidan enzim aktiviteleri, büyüme parametreleri ve bor konsantrasyonları ile desteklenmiştir. Ancak araştırılan noktaların netleşmesi için konu üzerine çalışmaların devam etmesinin yararlı olacağı kanaatindeyim.

KAYNAKLAR

- Aktaş, H., 2007, “Türkiye orjinli yabancı diploid buğday (*T. monococcum spp.boeoticum*) populasyonlarının morfolojik ve moleküler karakterizasyonu” , Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Adana, 9.
- Anonim 2013, <http://www.tuik.gov.tr>
- Arora, A., Sairam, R. K., and Srivastava, G. C., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plant, Review Article, Curr. Sci., India, 82.
- Atlı, A., 1999. Kışlık Tahıl Üretim Bölgelerimizde Yetiştirilen Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Kaliteleri ve Kalitelerinin Stabilitesi Üzerine Araştırmalar. *Türkiye Tahıl Simpozyumu* 6-9 Ekim 1999, Bursa, 443-454.
- Blevins, D.G. and Lucaszewski, K.M. 1998. Boron in Plant Structure and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 481-500.
- Blum, A., 1986, Breeding Crop Varieties for Stres Environments, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2: 199-237.
- Brown, P. H., Bellaloi, N., Hu, H. and Dandekar, A., 1999, Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency, *Plant Physiology*, 119, 17-20 .
- Brown, P.H., Shelp, B.J., 1997. Boron Mobility in Plants. *Boron in Soils and Plants: Reviews*. Kluwer Academic Publishers, Printed In The Netherlands, Plant and Soil, 193: 85-101.
- Cadenas, S.E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
- Cornic, G. 1996. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26.
- Davies, K.J.A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901.
- Demirtaş, A. 2004. Bitkide bor ve etkileri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 36(2), 217-225.
- Dordas, C., Chrispeels, M. J. and Brown, P. H. 2000. Permeability and channelmediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124, 1349-1361.
- Ediz, N., Özdağ, H., 2001, Bor mineralleri ve ekonomisi. *DPÜ Fen Bilimleri Dergisi*. Sayı: 2, 133-152 .
- Foyer, C. H. and Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146, 359-388.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 1-11.

- Goldberg, S. 1997. Reactions of boron with soils. *J. Plant and Soil*. 193, 35-48.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., Zhang, C., 2005, Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in pots under drought, *Plant Science* 169, 313-321.
- Güneş, A., Alpaslan, M ve İnal, A. 2002, Bitki Besleme ve Gübreleme. A.Ü. Ziraat Fakültesi. Yayın No: 1526, Ders Kitabı: 479 Ankara.
- Heun, M., Huerta, A.J., Barnhart, D., And Waines, J.G., 1997a. Genetic variation in wild diploid wheats *Triticum monococcum* var. *Boeoticum* and *T. urartu* (Poaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 78:260–264.
- Heun, M., Kisan, D., Accerbi, M., And Salamini., 1997b. Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science* 278, 1312-1314.
- Hu, H. and Brown, P. H. 1997. Absorption of Boron by Plant Roots. *J. Plant and Soil*. 193, 49-58.
- Jain, S., Nainawatee, H.S., Jain, R.K. J.B., 1991, Chowdhury, Proline status of genetically stable salt-tolerant Brassica juncea L. Somaclones and their parent cv. 'Parkash', *Plant Cell Rep.* 9 684–687.
- Imlay, J.A. and Linn, S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240, 1302-1309.
- Lawlor, D.W. 2001. Limitation of photosynthesis in water stressed leaves: stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* 89, 1-15.
- Leibler, D.C., Kling, D.S. and Reed, D.J. 1986. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -tocopherol. Control of α -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.* 261, 12114-12119.
- Lichtenhaler, H. K., 1996, Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plant, *J. Plant Physiol.*, 148: 4-14.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Science Direct*, 444: 139-158.
- Marshner, H., 1997, Functions of mineral nutrition: micronutrients, *Mineral Nutrition of Higher Plant*, Academic Press, San Diego, 313-404, 889 p.
- Matysik, J., Bhalu, P., 2002, Mohanty, Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, *Curr. Sci.* 82 525–532.
- Mengel, K. And Kirby, E. A., 1979, Boron, *Principles of Plant Nutrition*, 2nd ed., International Potash Institute, Switzerland, 483-494, 593 p.
- Morsy, M.R., Jouve, L., Hausman, J.F., Hoffmann L. and Stewart, J., 2007, Alternation of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance, *Journal of Plant Physiology*, 164, (2), 157-167 .

- Nable, R. O. 1988, Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism, *Plant and Soil*, 112, 45-52 p.
- Nable, R. O., Banuelos, G. S. And Paul, J. G. 1997, Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193, 181- 198 .
- Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., And Salamini, F., 2002. AFLP Analysis of a Collection of Tetraploid Wheats Indicates the Origin of Emmer and Hard Wheat Domestication in Southeast Turkey. *Mol Biol Evol*, 24: 1224-1233.
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001, *Bitki Biyoteknolojisi –II-* , S.Ü., Vakfi Yay., 308- 313.
- Paull, J. G., Nable, R. O., Mateme, M. A., and Rathjen, A. J., 1992, Response of annual medics (*Medicago ssp.*) and field peas (*Pisumsativum*) to high concentration of boron: genetic variation and the mechanism to tolerance, *Australian Journal of Agricultural Research*, 43, 203-213 p.
- Peltzer, D., Dreyer, E. and Polle, A. 2002. Temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Physiol. Biochem.* 40,141-150.
- Perica, S., Brown, P. H., Connell, J. H., Nyomora, A. M. S., Dordas, C. And Hu, H., 2001, Foliar boron application fertility and fruit set of olive, *Hort Science*, 36(4), 714-716 .
- Pınarkara, E., Uygan, S., Kayaş, S. A. And Hakkı, E. E., 2010., Real Time PCR Verilerinin Normalizasyonunda PCR Etkinliğinin Önemi. *VI. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi*. 20-21 Mayıs 2010, Konya, 273p.
- Raza, S. H., Athar, H. R., Ashraf, M. and Hamee, A., 2006., Llysinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 60: 368-376.
- Reid, R., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. C. R. and Graham, R. D. 2004. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell and Environment*. 25, 1405-1414.
- Reid, R. 2007. Identification of Boron Transporter Genes Likely to be Responsible for Tolerance to Boron Toxicity in Wheat and Barley, *Plant Cell Physiol*. 48(12): 1673–1678.
- Rerkasem, B., and Janyod, S., 1997. *Genotypic Variation In Plant Responce to Low Boron and Implications For Plant Breeding*. Kluwer Academic Publishers. Printed Nederland.
- Rerkasem, B., Janyod, S., 2004. Boron Deficiency In Wheat: A Review. *Field Crops Research* 89, 173-186 p.

- Sairam, R. K. and Saxena D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agronomy and Crop Science*. 184, 55-61.
- Sairam, R.K., Deshmukhi, P.S. and Saxena, D.C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*. 41(3), 387-394.
- Serrano, R., Gaxiola, R., 1994. Microbial models and salt tolerance in plants, *Crit. Rev. Plant Sci*. 13:121-138.
- Shorrocks, V. M., 1997, The occurrence and correction of boron deficiency, *Plant and Soil*, 193, 121-148 .
- Silva, D.A.R. and Andrade, J.M.V. 1983. Influence of Microstrients on The Male Sterility on Upland Wheat and Rice And Soybean Yields In Red Yellow Latosol. *Pesq. Agropec Bras Brasilia* 18, 593-601. (In Portuguese With English Abstract).
- Soylu, S., Topal, A., Sade, B., Akgün, N., Gezgin, S., Babaoğlu, M., 2004. Yield and Yield Attributes of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Genotypes as Affected by Boron Application in Boron-Deficient Calcareous Soils: An Evaluation of Major Turkish Genotypes for B Efficiency. *Journal of Plant Nutrition*, Vol. 27, No. 6, pp.1077-1106.
- Stangoulis, J. C. R. and Reid, R. J. 2002. Boron toxicity in plants and animals. In *Boron in Plant and Animal Nutrition*, Kluwer Academic. pp 227-240, New York.
- Subedi, K.D., C.B. Budhathoki, M. Subedi and J.K. Tuladhar., 1993. Survey and Research Report on Wheat Sterility Problem (1992/93). Working Paper No: 93/94, Nepal.
- Taban, S., Erdal, İ., 2000. Bor Uygulamasının Değişik Buğday Çeşitlerinde Gelişme ve Toprak Üstü Aksamda Bor Dağılımı Üzerine Etkisi. *Turkish. J. Agric. For.* 24: 255-262.
- Tandan, JP. and S.M.A. Nagvi. 1992. Wheat varietal screening for boron deficiency in India. In: *Boron Deficiency in Wheat* (Eds. C.E. Mann and B. Rerkasem), *Wheat Spec. Rep.* 11, CIMMYT, Mexico, pp. 76-78.
- Taslak, İ., Çağlar, Ö., Bulut, S., Akten, Ş., 2007. Bazı arpa genotiplerinin tuzluluğa toleranslarının belirlenmesi I. Çimlendirme denemesi. *VII. Tarla Bitkileri Kongresi*, Erzurum, 25-27 Haziran, 188-192.
- Topal A., S. Gezgin, N. Akgün, N. Dursun and M. Babaoğlu. 2002. Yield and Yield attributes of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) as Affected by Boron Application. *Boron in Plant and Animal Nutrition*. (Eds. Goldbach et al.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp.401-406.
- Vallage, V., And Antoni, K., 1978. A new interspecific hybrid: *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* x *Aegilops ventricosa*. *Wheat Info. Serv.* 35: 22-24.

- Vallage, V., And Hari, S.,1979. Domestication of plants in the old World – The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 123 (2): 256-275.
- Waines, J. G., And Barnhart, D., 1983. Isolation and Characterization of Five Novel High Molecular Weight Subunit of Glutenin Genes From *Triticum timopheevi* and *Aegilops cylindrica*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153 (1), 67–72.
- Yılmaz, A., 2002, Her derde deva hazinemiz bor, *Bilim ve Teknik*, Sayı:414, 38-48.

EKLER**EK-1** 1. Zaman diliminde kök örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/µl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (µg)
0 ppm 1. tek.	311.81	12.28	7.80	4.13	1.89	0.63	3.2
0 ppm 2. tek.	816.55	62.71	20.41	12.24	1.67	0.33	1.2
0 ppm 3. tek.	829.92	64.07	20.75	12.41	1.67	0.32	1.2
0 ppm 4. tek.	457.95	10.42	11.45	5.91	1.94	1.1	2.2
25 ppm 1. tek.	391.74	8.65	9.79	4.79	2.05	1.13	2.6
25 ppm 2. tek.	558.61	50.70	13.97	8.70	1.6	0.28	1.8
25 ppm 3. tek.	607.27	53.03	15.18	9.35	1.62	0.29	1.6
25 ppm 4. tek.	980.74	66.29	24.52	15.07	1.63	0.37	1.0
250 ppm 1. tek.	586.76	50.04	14.67	9.06	1.62	0.29	1.7
250 ppm 2. tek.	323.23	10.45	8.08	4.14	1.95	0.77	3.1
250 ppm 3. tek.	337.27	7.96	8.43	4.39	1.92	1.06	3.0
250 ppm 4. tek.	294.75	8.45	7.37	3.89	1.9	0.87	3.4
500 ppm 1. tek.	639.69	60.26	15.99	9.86	1.62	0.27	1.6
500 ppm 2. tek.	608.21	53.71	15.21	9.43	1.61	0.28	1.6
500 ppm 3. tek.	423.57	8.03	10.59	5.15	2.06	1.32	2.4
500 ppm 4. tek.	680.67	57.77	17.02	10.41	1.63	0.29	1.5

EK-2 2. Zaman diliminde kök örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeiticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/μl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (μg)
0 ppm 1. tek.	1318.02	80.729	32.95	18.631	1.77	0.41	0.8
0 ppm 2. tek.	1930.43	84.086	48.261	26.722	1.81	0.57	0.5
0 ppm 3. tek.	1604.61	83.084	40.115	22.279	1.80	0.48	0.6
0 ppm 4. tek.	1389.47	78.594	34.737	19.865	1.75	0.44	0.7
25 ppm 1. tek.	2301.36	87.704	57.534	30.339	1.90	0.66	0.4
25 ppm 2. tek.	2271.06	85.839	56.777	30.092	1.89	0.66	0.4
25 ppm 3. tek.	1852.98	84.521	46.325	24.956	1.86	0.55	0.5
25 ppm 4. tek.	1865.83	82.965	46.646	25.736	1.81	0.56	0.5
250 ppm 1. tek.	409.43	11.218	10.236	5.103	2.01	0.91	2.4
250 ppm 2. tek.	333.17	11.84	8.329	4.205	1.98	0.70	3.0
250 ppm 3. tek.	469.78	9.723	11.745	5.811	2.02	1.21	2.1
250 ppm 4. tek.	640.78	54.15	16.019	9.69	1.65	0.30	1.6
500 ppm 1. tek.	456.39	10.173	11.41	5.518	2.07	1.12	2.2
500 ppm 2. tek.	1110.74	79.271	27.769	15.917	1.74	0.35	0.9
500 ppm 3. tek.	901.10	61.024	22.527	13.215	1.70	0.37	1.1
500 ppm 4. tek.	755.38	79.902	18.885	11.024	1.71	0.24	1.3

EK-1 3. Zaman diliminde kök örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/µl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (µg)
0 ppm 1. tek.	767.54	55.692	19.188	11.434	1.68	0.34	1.3
0 ppm 2. tek.	412.77	10.472	10.319	5.266	1.96	0.99	2.4
25 ppm 1. tek.	701.87	51.151	17.547	10.517	1.67	0.34	1.4
25 ppm 2. tek.	421.63	8.381	10.541	5.113	2.06	1.26	2.4
250 ppm 1. tek.	459.87	7.574	11.497	5.792	1.98	1.52	2.2
250 ppm 2. tek.	456.86	11.944	11.421	5.519	2.07	0.96	2.2
500 ppm 1. tek.	200.64	12.932	5.016	2.755	1.82	0.39	5.0
500 ppm 2. tek.	185.96	12.719	4.649	2.616	1.78	0.37	5.4

EK-4 1. Zaman diliminde gövde örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/µl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (µg)
0 ppm 1. tek.	786.30	8.341	19.658	9.271	2.12	2.36	1.3
0 ppm 2. tek.	1019.80	10.787	25.494	12.080	2.11	2.36	1.0
0 ppm 3. tek.	655.60	6.912	16.391	7.804	2.10	2.37	1.5
0 ppm 4. tek.	845.60	8.888	21.193	10.050	2.10	2.38	1.2
25 ppm 1. tek.	839.90	9.178	20.999	10.002	2.10	2.29	1.2
25 ppm 2. tek.	855.40	9.631	21.385	10.140	2.11	2.22	1.2
25 ppm 3. tek.	977.50	10.355	24.437	11.558	2.11	2.36	1.0
25 ppm 4. tek.	864.50	9.101	21.612	10.252	2.11	2.37	1.2
250 ppm 1. tek.	851.30	9.521	21.281	10.090	2.11	2.24	1.2
250 ppm 2. tek.	937.30	10.022	23.432	11.118	2.11	2.34	1.1
250 ppm 3. tek.	692.80	7.364	17.320	8.242	2.10	2.35	1.4
250 ppm 4. tek.	905.10	9.540	22.627	10.671	2.12	2.37	1.1
500 ppm 1. tek.	637.40	6.826	15.936	7.617	2.09	2.33	1.6
500 ppm 2. tek.	636.10	6.972	15.901	7.578	2.1	2.28	1.6
500 ppm 3. tek.	679.40	7.187	16.986	8.058	2.11	2.36	1.5
500 ppm 4. tek.	596.50	6.426	14.913	7.196	2.07	2.32	1.7

EK-5 2. Zaman diliminde gövde örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/µl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (µg)
0 ppm 1. tek.	1352.12	37.078	33.803	17.072	1.98	0.91	0.7
0 ppm 2. tek.	1492.22	76.204	37.306	19.143	1.95	0.49	0.7
0 ppm 3. tek.	1490.00	59.8	37.25	19.11	1.95	0.62	0.7
0 ppm 4. tek.	1698.75	60.358	42.469	21.951	1.93	0.7	0.6
25 ppm 1. tek.	1470.93	58.252	36.773	20.002	1.84	0.63	0.7
25 ppm 2. tek.	776.58	33.383	19.414	9.799	1.98	0.58	1.3
25 ppm 3. tek.	1093.46	28.509	27.336	13.944	1.96	0.96	0.9
25 ppm 4. tek.	1321.65	43.234	33.041	16.6	1.99	0.76	0.8
250 ppm 1. tek.	1175.61	42.261	29.39	14.914	1.97	0.7	0.9
250 ppm 2. tek.	698.12	71.333	17.453	8.862	1.97	0.24	1.4
250 ppm 3. tek.	1591.67	71.338	39.792	20.9	1.90	0.56	0.6
250 ppm 4. tek.	1250.19	42.423	31.255	15.932	1.96	0.74	0.8
500 ppm 1. tek.	601.97	43.941	15.049	7.784	1.93	0.34	1.7
500 ppm 2. tek.	1349.74	70.011	33.744	17.43	1.94	0.48	0.7
500 ppm 3. tek.	1049.95	49.604	26.249	16.081	1.63	0.53	1.0
500 ppm 4. tek.	1839.57	54.418	45.989	23.089	1.99	0.85	0.5

EK-6 3. Zaman diliminde gövde örneklerinin RNA konsantrasyonları

<i>T. boeticum</i> L.	Konsantrasyon (ng/µl)	230	260	280	260/280	260/230	Top. RNA (µg)
0 ppm 1. tek.	635.69	24.77	15.89	8.616	1.84	0.64	1.6
0 ppm 2. tek.	690.39	17.79	17.26	8.526	2.02	0.97	1.4
25 ppm 1. tek.	908.82	24.15	22.72	11.641	1.95	0.94	1.1
25 ppm 2. tek.	407.86	10.90	10.20	5.563	1.83	0.94	2.5
250 ppm 1. tek.	546.42	23.52	13.66	7.057	1.94	0.58	1.8
250 ppm 2. tek.	742.35	16.50	18.56	9.627	1.93	1.12	1.3
500 ppm 1. tek.	1074.88	40.16	26.87	14.908	1.80	0.67	0.9
500 ppm 2. tek.	549.82	36.02	13.75	7.962	1.73	0.38	1.8

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Songül UYĞAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Elazığ, 1985
Telefon : 05074742710
Faks : -
e-mail : songluygan@yahoo.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Y.D.A. Yeşilkent Lisesi, Erzin, Hatay	2003
Üniversite	: S.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri, Konya University of Basilicata, İtalya (Erasmus Programı)	2008 2007-2008 (Güz Dönemi)
Yüksek Lisans	: S.Ü. F.B.E. Tarla Bitkileri A.B.D., Konya	2014
Doktora	: -	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2008 -2010	104O547 TUBİTAK Projesi	Bursiyer Öğrenci
2010	SITINPLANT European Project FP7-SME-2007-1	Bursiyer Öğrenci
2010	110T260 TUBİTAK projesi	Bursiyer Öğrenci
2011	Tarım ve Köyişleri Bakanlığı	Ziraat Mühendisi

UZMANLIK ALANI

- Bitki Biyoteknolojisi
- Bitki Fizyolojisi

YABANCI DİLLER

- İngilizce

YAYINLAR

- HAKKI EE, UYGAN S, BABAOĞLU M, TOPAL A, GEZGİN S.(2007). Determintion Of Wild Wheat Genetic Resources That Can Contribute Best To Boron Toxicity Tolerance In Cultivars. Journal Of Biotechnology 2007 131 Issue 2s S33-S34.
- KAYIS, S. A., PINARKARA, E., UYGAN, S., and HAKKI, E. E. (2009). Evaluation of confidence interval estimates of cluster analysis in molecular marker data. New Biotechnology, 25: Supplement 1, Abstract p. S305. doi:10.1016/j.nbt.2009.06.936.
- HAKKI, E. E., KAYIŞ, S. A., PINARKARA, E., UYGAN, S., HAMURCU, M., and GEZGİN, S. (2009). Evaluating Boron Accumulating Potential of Cannabis sativa L. *International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends*. 27-30 September, Ankara, Turkey. p. 88.
- UYGAN, S., HAMURCU, M., HAKKI, E.E., SEKMEN,A.H., GEZGİN, S., TÜRKAN, İ. (2009). Yabani Buğday Genotiplerindebor Toksisitesine Dirençlilikle İlgili Bazı Fizyolojik Özelliklerin Belirlenmesi. *XVI.Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*. 13-16 Aralık, 2009, Antalya, Türkiye, p. 7.
- UYGAN, S., ÖZBEK, Z., HAMURCU, M., GEZGİN, S., KAYIŞ, S.A., TOPAL,A., HAKKI, E.E. (2010). İki Makarnalık Buğday Çeşidinin Farklı Bor Dozu Uygulamalarına Tepkileri. *20.Ulusal Biyoloji Kongresi*. 21-25 Haziran, 2010, Denizli, Türkiye, p. 505-506.
- PINARKARA, E., UYGAN S., KAYIŞ, S. A., HAKKI, E. E. (2010). Real Time PCR Verilerinin Normalizasyonunda PCR Etkinliğinin Önemi. *IV. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi* 20- 21 Mayıs, 2010, Konya, Türkiye, p. 273.
- HAKKI E. E., S. UYGAN, M. HAMURCU, S. GEZGIN, B. S. BOZKURT, S. A. KAYIS , " Evaluation of puroindoline b as a house keeping gene in wild wheat species ", Current Opinion in Biotechnology , 22S, , S145-P56, 2011, (SCI)