T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOR VE 24-EPİBRASSİNOLİD UYGULAMALARININ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da HÜCRE ÇEPERİ İLE İLGİLİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

HAZIRLAYAN

RABİA İŞKİL

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. YONCA SURGUN ACAR

BARTIN-2017

T.C.
BARTIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BOR VE 24-EPİBRASSİNOLİD UYGULAMALARININ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da HÜCRE ÇEPERİ İLE İLGİLİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN
Rabia İŞKİL

JÜRİ ÜYELERİ

Danışman	:	Yrd. Doç Dr. Yonca SURGUN ACAR	-	Bartın Üniversitesi
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. Fahriye ZEMHERİ	-	Bartın Üniversitesi
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. Burak Evren İNANAN	-	Aksaray Üniversitesi

BARTIN-2017

KABUL VE ONAY

Rabia İŞKİL tarafından hazırlanan "BOR VE 24-EPİBRASSİNOLİD UYGULAMALARININ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da HÜCRE ÇEPERİ İLE İLGİLİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ" başlıklı bu çalışma, 03.07.2017 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR (Danışman) ……

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fahriye ZEMHERİ ……

Üye : Yrd. Doç. Dr. Burak Evren İNANAN ……

Bu tezin kabulü Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..…/..…/20… tarih ve 20…../…..-….. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. H. Selma ÇELİKYAY
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Yrd. Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR danışmanlığında hazırlamış olduğum "BOR VE 24-EPİBRASSİNOLİD UYGULAMALARININ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da HÜCRE ÇEPERİ İLE İLGİLİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ" başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımı kabul edeceğimi beyan ederim.

03.07.2017
Rabia İŞKİL

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde tez danışmanlığımı üstlenerek araştırma konusunun seçimi ve yürütülmesi aşamalarında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini ve yardımını esirgemeyen, sabırlı, anlayışlı ve yol gösterici yaklaşımı ile beni cesaretlendiren ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum çok değerli danışmanım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR'a en içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca her zaman destekleyici ve öğretici olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fahriye ZEMHERİ'ye, desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz ERDEN'e ve uzakta olmasına rağmen manevi desteğini her zaman hissettiğim hocam Yrd. Doç. Dr. Ümit ACAR'a gönülden teşekkür ederim.

Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü arasında olan Ortak Lisanüstü Programı kapsamında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL'e ortak danışmanlığımı kabul etmesinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Sevgi, hoşgörü ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeden bugünlere gelmemi sağlayarak tüm eğitim öğretim hayatım boyunca yanımda olan ve bana güvenen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rabia İŞKİL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BOR VE 24-EPİBRASSİNOLİD UYGULAMALARININ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da HÜCRE ÇEPERİ İLE İLGİLİ BAZI GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabia İŞKİL

Bartın Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın- 2017, sayfa: XIX + 120

Borun topraktaki noksanlığı veya yüksek konsantrasyonda bulunması bitki hücre duvarlarını etkileyen önemli bir abiyotik stres faktörü olabilmektedir. Brassinosteroid (BR)'lerin çok düşük konsantrasyonlarda bile hücre bölünmesi, uzaması ve genişlemesi gibi bitki büyüme ve gelişmesinde düzenleyici görevlerinin yanı sıra çevresel streslere toleransın arttırılmasında da etkili oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte, BR'lerin streslere toleransı artırma mekanizmalarını anlamaya ilişkin fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışmasında amaç, model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da (a) bor noksanlığı ve bor toksisitesinin bitkilerde hücre çeperi üzerine etkileri ve (b) bitkilerde oluşan bor stresi üzerine 24-Epibrassnolid (EBL)'in olası etkilerinin yaprak ve kök hücre çeperinde moleküler düzeyde araştırılmasıdır. Beş hafta ve on hafta süreyle hidroponik ortamda yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh bitkileri borik asit (BA) içermeyen (-BA, 0 µM) veya yüksek konsantrasyonda BA (+BA, 3000 µM) ve/veya 1 µM EBL hormonu içeren ortamda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Uygulamalı bitkilerin (beş ve on haftalık bitkiler) rozet yaprak ve kök örneklerinde hücre duvarı sentezinde rol oynayan *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8, CSLB5, XTH16, XTH21, XTH23,*

EXPA5, EXP14, PME2, PME41 ve *SEB1* genlerinin ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR analizi ile tespit edilmiştir. Beş haftalık ve on haftalık bitkilerin yaprak örneklerinde genel olarak *CESA1* ile *CESA6* ve *CESA4* ile *CESA8* genleri benzer ekspresyon profilleri göstermiştir. Beş haftalık bitkilerin yaprak örneklerinde yüksek konsantrasyonda BA uygulaması *CESA4, CESA8* ve *CSLB5* genlerinin ekspresyonunu arttırırken, on haftalık bitkilerde *CESA4, CESA6* ve *CESA8* genlerinin ekspresyonları hem 0 µM hem de 3000 µM BA uygulamaları sonucu artış göstermiştir. Beş haftalık ve on haftalık bitkilerde *EXP8* geninin ekspresyonu 0 ve 3000 µM BA uygulamaları sonucu azalırken, BA ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ekspresyonu anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($P < 0.01$). *EXP14* geninin mRNA seviyesi beş haftalık bitkilerde 0 µM BA uygulamasında azalırken, on haftalık bitkilerde ise 3000 µM BA uygulaması sonucu artmıştır. *XTH16* geninin ekspresyonu tek başına yapılan EBL veya BA uygulamaları sonucu beş haftalık bitkilerde azalmıştır, bununla birlikte EBL ile birlikte BA uygulamalarında ekspresyon daha da azaltmıştır. *XTH23* geninin ekspresyonu her iki bitki grubuna ait örneklerin yaprak dokularında EBL ilaveli 0 ve 3000 µM BA uygulamalarında istatistiki önemlilikte arttırmıştır ($P < 0.01$). *PME2* ve *PME41* genleri beş haftalık ve on haftalık bitkilerde benzer ekspresyon profilleri göstermiştir ve BA uygulamalarına ilave edilen EBL hormonu ekspresyonların dramatik bir şekilde artmasını sağlamıştır. On haftalık bitkilerde SEB1 geninin ekspresyonu tüm uygulamalar sonucu kontrole göre artış sağlamıştır ($P < 0.01$).

EBL hormonu araştırılan genler kapsamında yaprak ve kök dokularına spesifik yanıtlar oluşturmuştur. Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde tek başına ya da BA ile birlikte yapılan EBL uygulamaları araştırılan genlerde (*XTH23* geni hariç) genel olarak ekspresyonlarını azaltırken, on haftalık bitkilerde sadece *CSLB5, EXP14, XTH16* ve *PME2* genlerinin ekspresyonları azalmıştır. Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde yapılan tüm uygulamalar *CESA1* (0 µM BA uygulaması hariç) ve *CESA4* genlerinin ekspresyonlarını kontrole göre azaltmıştır. *EXPA5* geninin ekspresyonu on haftalık bitkilerin kök dokularında kontrole göre değişim göstermeyen 0 µM BA uygulaması EBL hormonu ile birlikte uygulandığında ekspresyonu arttırmıştır. *EXP14* geninin transkript seviyesi beş haftalık bitkilerde EBL hormonu tek başına veya 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında anlamlı olacak şekilde azalırken ($P < 0.01$), on haftalık bitkilerde 0 µM BA uygulamasında da ekspresyonun azalmasına neden olmuştur. On haftalık bitkilerde *XTH23* geninin ekspresyonu sadece tek başına yapılan EBL uygulaması ile artarken, beş haftalık bitkilerde kontrole göre ekspresyon değişimi göstermeyen 0 µM BA uygulaması ve anlamlı bir

azalma gösteren 3000 µM BA uygulamasının ekspresyonunu EBL uygulaması ile artmıştır. *XTH21* geninin mRNA seviyesi ise 3000 µM BA ile birlikte yapılan EBL uygulaması sonucunda kontrole göre anlamlı bir azalma göstermiştir. *PME2* geninin ekspresyonu beş ve on haftalık bitkilerin kök hücrelerinde EBL ile birlikte yapılan BA uygulamaları sonucu anlamlı azalmalar göstermiştir. *SEB1* geninin ekspresyonu ise beş ve on haftalık bitkilerin kök hücrelerinde farklı ekspresyon profilleri göstermiştir.

Sonuç olarak tez çalışması, bitkilerde hücre çeperinde bor-brassinosteroid etkileşimi üzerine yapılan ilk çalışma olma özelliğindedir. Tez çalışması ile hücre çeperinde borun eksikliği ve toksisitesinin etkilerinin yanı sıra brassinosteroidlerin strese yanıtında hücre çeperinde meydana getirdiği değişimler kapsamlı bir şekilde moleküler düzeyde gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, Bor, Brassinosteroid, Gen ekspresyonu, Hücre çeperi.

Bilim Kodu

401.02.02

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF BORON AND 24- EPIBRASSINOLID TREATMENTS ON EXPRESSION LEVELS OF SOME GENES RELATED TO CELL WALL IN *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Rabia İŞKİL

Bartın University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology

Thesis Advisor: Asst. Prof. Yonca SURGUN ACAR
Co-Advisor: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Bartın-2017, pp: XIX + 120

Deficiency or high concentration of boron in soil could be an important abiotic stress factor affecting the plant cell wall. It has been determined that, Brassinosteroids (BR) even at very low concentrations, are efficient in enhancing the tolerance to environmental stress, and also regulatory functions in plant growth and development such as cell division, elongation and enlargement. At the same time, there are not many studies concerning to understand the mechanisms of how BRs increase the tolerance to stresses. The aim of this thesis study is to search in molecular level in *Arabidopsis thaliana*, as a model plant, (a) the effects of boron deficiency and boron toxicity on cell wall in plants and (b) effects of 24-Epibrassnolid (EBL) on boron stress taken place in plants in leaf and root cell wall. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants were grown in hydroponic environment for five weeks and ten weeks and incubated for 24 hours in environments excluding boric acid (BA) (-BA, 0 μM) or including high concentration of BA (+BA, 3000 μM) and/or 1 μM EBL hormone. In rosette leaf and root samples of applied plants (five and ten week-plants) expression levels of some cellulose synthase genes playing role in cell wall synthesis (*CESA1, CESA4, CESA6, CESA8* and *CSLB5*), genes coding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase proteins (*XTH16, XTH21* and *XTH23*), expansin genes

(*EXPA5, EXP8* and *EXP14*), pectin methyl esterase genes (*PME2* and *PME41*) and genes coding cell wall protein (*SEB1*) were determined by Real-Time PCR analysis. In leaf samples of five weeks and ten weeks plants, generally similar expression profiles were shown in *CESA1* with *CESA6* and *CESA4* with *CESA8*. In leaf samples of five weeks plants, the application of high concentration BA increases the expression of *CESA4, CESA8* and *CSLB5* genes, while in ten weeks plants expression of *CESA4, CESA6* and *CESA8* genes increased in either 0 μM and 3000 μM BA application. In five weeks and ten weeks plants, expression of *EXP8* gene was decreased in result of 0 and 3000 μM BA application; EBL application together with BA increased the expression significantly ($P < 0.01$). mRNA level of *EXP14* gene is decreased in consequence of 0 μM BA application in five weeks plants, while in ten weeks plants application of 3000 μM BA increased the mRNA level. The expression of *XTH16* gene decreased in result of alone EBL or BA applications in five plants, however application of EBL and BA together was more decreased the expression. Expression of *XTH23* gene has increased significantly in EBL together with 0 and 3000 μM BA applications in leaf tissues of samples of both two plant groups ($P < 0.01$). *PME2* and *PME41* genes has shown similar expression profiles in five weeks and ten weeks plants and additional EBL hormone to BA applications has provided to increase the expressions dramatically. In ten weeks plants expression of *SEB1* gene has increased in all treatments comparing to the control ($P < 0.01$).

Within the concept of surveyed genes, EBL hormone formed specific responses to leaf and root tissues. In root samples of five weeks plants, EBL applications alone or with BA generally decreased the expressions of surveyed genes (except *XTH23* gene) while in ten weeks plants expressions of only *CSLB5, EXP14, XTH16* and *PME2* genes decreased. In root samples of five weeks plants all applications decreased the expression of *CESA1* (except 0 μM BA application) and *CESA4* genes according to control. In root tissues of ten weeks plants, 0 μM BA application did not change the expression of *EXPA5* gene but when applied with EBL hormone, expression increased. Transcript level of *EXP14* gene in five weeks plants significantly decreased in alone EBL hormone or EBL with 3000 μM BA application, while in ten weeks plants 0 μM BA application caused the decrease of expression. In ten weeks plants expression of *XTH23* gene increased with alone EBL application, on the other hand, in five weeks plants EBL application increased the expression in 0 μM BA application which normally did not show expression change according to control and in 3000 μM BA application which normally showed a significant

decrease. mRNA level of *XTH21* gene showed a significant decrease according to control as a result of 3000 μM BA together with EBL application. Expression of *PME2* gene showed significant decreases in five weeks and ten weeks group plant root cells in consequence of EBL and BA applications. As for the expression of *SEB1* gene showed different expression profiles in five weeks and ten weeks plants root cells.

Consequently, thesis study is the first study in terms of conducing og boron-brassinosteroid interaction in plant cell wall. With the study, along with the effects of boron deficiency and toxicity in cell wall, changes that brassinosteroids generated in cell wall in response to stress has been determined in molecular level comprehensively.

Key Words

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, Boron, Brassinosteroide, Cell wall, Gene expression.

Science Code

401.02.02

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ii
BEYANNAME iii
ÖNSÖZ iv
ÖZET v
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
TABLOLAR DİZİNİ xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xviii

BÖLÜM 1 GİRİŞ 1

1.1 Bitki Hücre Çeperi Yapısı 3
1.1.1 Selüloz 7
1.1.2 Hemiselüloz 11
1.1.3 Pektin 13
1.1.4 Ekspansin 15
1.2 Bor ve Borun Hücre Duvarındaki Rolü 17
1.2.1 Bor Eksikliği 19
1.2.2 Bor Toksisitesi 20
1.3 Stresin Hücre Duvarı Üzerine Etkisi 22
1.4 Brassinosteroidler: Genel Etkileri, Sinyalizasyonu ve Hücre Duvarı Üzerine Etkileri 27
1.5 Literatür Özetleri 32

BÖLÜM 2 MATERYAL VE YÖNTEM 38

2.1 Materyal 38
2.2 Yöntem 38
2.2.1 Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi 39

2.2.2 Çalışmada Kullanılan Borik asit ve 24-Epibrassinolid Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 40
2.2.3 Bitkilere Uygulamaların Yapılması 40
2.2.4 Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinden RNA İzolasyonu 41
2.2.5 RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini 42
2.2.6 DNaz I Uygulaması 44
2.2.7 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 44
2.2.8 Primerlerin Seçilmesi 45
2.2.9 Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu 46
2.2.10 RT-PCR Ürünlerinin Jel elektroforezi 48
2.2.11 RT-PCR Bant Profillerinin Değerlendirilmesi 48
2.3 İstatistiksel Analiz 49

BÖLÜM 3 BULGULAR 50

3.1 Uygulamalı Örneklerden RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi 50
3.2 Real-time PCR Analizleri 51
3.2.1 Beş Haftalık Bitkilerin Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 51
3.2.1.1 Rozet Yaprak Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 52
3.2.1.2 Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 61
3.2.2 On Haftalık Bitkilerin Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 71
3.2.2.1 Rozet Yaprak Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 71
3.2.2.2 Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 82

BÖLÜM 4 TARTIŞMA 92

KAYNAKLAR 111
ÖZGEÇMİŞ 119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa No
1.	Bitki hücre duvarının genel yapısı	4
2.	*Arabidopsis thaliana'*da primer ve sekonder hücre duvar yapısı	6
4.	Hücre duvarında selüloz.	8
5.	Plazma membranında selüloz sentezi	9
6.	Pektinin şematik gösterimi	14
7.	Basitleştirilmiş bitki hücre duvarı modeli ve ekspansinlerle gevşetilmesi.	16
8.	Rhamnogalakturonan-II (RG-II) yapısı.	19
9.	Abiyotik strese karşı bitki hücresi duvar mekanizmasındaki değişimleri gösteren model	26
10.	Brassinosteroidlerin yaygın kullanılan formları..	27
11.	BR varlığında veya yokluğunda basitleşitirilmiş BR sinyal yolakları.	29
12.	Bitki büyümesinde BR tarafından regüle edilen CESA genlerinin modellenmiş açıklaması	30
13.	Bitki hücre duvarı homeostasisinde brasinosteroid feedback sinyali aracılık etmektedir	31
14.	Borik asit ve/veya EBL içeren besin ortamlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan beş haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları.	50
15.	Borik asit ve/veya EBL içeren besin ortamlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları	51
16.	Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	53
17.	Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	55
18.	Beş haftalık bikilerin rozet yaprak örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz/hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	57

Şekil No		Sayfa No
19.	Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri..	58
20.	Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü	59
21.	Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	62
22.	Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	64
23.	Beş haftalık bikilerin kök örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	66
24.	Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	68
25.	Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü.	69
26.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	73
27.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	75
28.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	77
29.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri	79
30.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü	80
31.	On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri..	83
32.	On haftalık bitkilerin kök örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri.	85

Şekil No **Sayfa No**

33. On haftalık bitkilerin kök örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. 87

34. On haftalık bitkilerin kök örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. 89

35. On haftalık bitkilerin kök örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü. 90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
1.	*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'in sistematiği…….....	38
2.	Beş ve on haftalık *A.thaliana* bitkilerine 24 saat süreyle yapılan uygulamalar	41
3.	Birinci grup (5 haftalık) bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık oranları.	43
4.	İkinci grup (10 haftalık) bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık oranları.	43
5.	Tez kapsamında seçilen genler ve primerlere ait bilgiler.	46
6.	Çalışmada kullanılan genlere ait primerlerin optimize edilen PCR koşulları.	47
7.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A. thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)	60
8.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)	70
9.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)	81
10.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)	91
11.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A. thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları	94
12.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole meydana gelen değişim durumları	95
13.	Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları	96

Tablo No **Sayfa No**

14. Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları 97

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ºC : Santigrad

KISALTMALAR

bp	:	Baz çifti
BA	:	Borik Asit
BL	:	Brassinolid
cDNA	:	Komplementer DNA
cm	:	Santimetre
Cq	:	Döngü eşiği
dak.	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EBL	:	24-Epibrassinolid
EXP	:	Ekspansin
g	:	Gram
HBL	:	28-Homobrassinolid
m	:	Metre
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
M	:	Molar
ng	:	Nanogram
pmol	:	Pikomol
PME	:	Pektin metil esteraz
PHD	:	Primer hücre duvarı
RG-I	:	Rhamnogalakturonan-I
RG-II	:	Rhamnogalakturonan-II

RT-PCR	:	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	:	Rotate per minute
RNA	:	Ribonükleik asit
san.	:	Saniye
SHD	:	Sekonder hücre duvarı
XET/XHT	:	Ksiloglukan endo-β-transglukosilaz/hidrolazlar
XyG	:	Ksiloglukan
µM	:	Mikromolar
µl	:	Mikrolitre

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik bilimi tüm dünyada büyük ilgi görmüş ve açığa çıkan bilgiler doğrultusunda biyoteknoloji ve genetik mühendisliği gibi alanlarda yeni çalışmalara ışık tutmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda pek çok organizmanın genomu hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Elde edilen bilgiler ile canlıların kökenleri, moleküler filogenetik açıdan akrabalık dereceleri, genetik tedavi yöntemleri ve ıslah gibi pek çok alanda ilerlemeler kaydedilmiştir. Bazı canlılar sahip oldukları avantajlar nedeniyle moleküler ve genetik çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır.

Brassicaceae familyasında yer alan *Arabidopsis thaliana* (L.) moleküler ve genetik çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Model organizma olarak tercih edilmesindeki özellikler arasında laboratuvar şartlarında yetiştirilebilmesi, yaşam döngüsünün kısa olması, çok sayıda tohum vermesi ve küçük bir genoma sahip olmasıyla birlikte tüm genomunun sekanslanmış olması yer almaktadır. *Arabidopsis thaliana'*nın sahip olduğu genlerin yaklaşık %10'unun hücre duvarındaki polimerlerin biyosentezi, sentezlenen polimerin taşınması, depolanması ve yeniden modellenmesi gibi çeşitli aşamalarında rol oynadığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte *A.thaliana'*nın tüm genom dizisinin sekanslanmış olması ve hücre duvarı biyosentezinde rol alan proteinleri kodlayan birçok genin tanımlanmış olması *A.thaliana'ı* hücre duvarı çalışmalarında da tercih edilen model bir bitki haline getirmiştir (Liepman vd., 2010).

Brassinosteroidler (BR'ler), yapısal olarak hayvan steroid hormonlarına benzeyen önemli bir spesifik bitki steroid grubudur (Kagale vd., 2007; Xie vd., 2011). En aktif formu brassinolid (BL) olmakla birlikte 24-Epibrassinolid (EBL) ve 28-Homobrassinolid (HBL) yaygın olarak kullanılan diğer brassinosteroid çeşitleridir (Surgun vd., 2012). Bitki hormonlarının yeni bir sınıfı olan BR'ler hücre bölünmesi ve genişlemesi, hücre duvarı rejenerasyonu, tohum çimlenmesi, ksilem farklılaşması, yaprak senesensi, biyokütle ve verim artışı gibi çeşitli gelişimsel ve fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Kagale vd., 2007; Surgun vd., 2012; Yusuf vd., 2017). Bitki büyüme ve gelişimindeki önemli rollerinin yanı sıra BR'ler çeşitli çevresel streslere (düşük ve yüksek

sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metal, patojen saldırısı gibi) karşı bitki toleransını da arttırmaktadır (Kagale vd., 2007; Surgun vd., 2012; Gökdoğan ve Bürün, 2015a; Yusuf vd., 2017). Ayrıca stres koşullarındaki bitkilere ekzojen BR uygulandığında protein sentezinin devam ettiği, fotosentetik etkinin yükseldiği, antioksidan enzimlerin aktivitesi ve osmatik koruyucuların birikiminin arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte BR'lerin stres yanıtlarının kontrol mekanizması ve stres genlerinin ekspresyonlarını nasıl düzenlediği tam olarak açıklanamamıştır (Surgun vd., 2012).

Bor (B), dünyada stratejik öneme sahip önemli yer altı kaynaklarından biridir ve ülkemiz dünya toplam bor rezervinin % 74'üne sahiptir (URL 1). Bor, bitkilerin büyüme sürecinde birçok farklı metabolik yolakta rol oynamakla birlikte hücre duvarı sentezi ve yapısı için de çok önemlidir (Matoh, 1997; Spurr, 1957; Goldbach ve Wimmer, 2007; Camacho-Cristobal vd., 2008a, 2008b). Borun bitkiler tarafından alınımı, toprak pH'sına ve toprakta bulunan diğer besin elementlerinin miktarına bağlıdır. Bor eksikliği ve bor toksisitesi bitkilerde strese sebep olmaktadır. Toprakta bor bulunmaması veya toprağın özelliği sonucunda bitkilerde bor eksikliği görülebilmektedir (Demirtaş, 2005). Bor eksikliğinde bitkilerde kök uzaması, karbonhidrat metabolizması, nükleik asit sentezi ve şeker taşınımı gibi süreçler olumsuz etkilenmektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008b). Yüksek bor konsantrasyonuna sahip sulama sularının kullanılması, düşük yağış oranı, yüzey madenciliği, uçucu kül ve endüstriyel atıklarla meydana gelebilen ya da kendiliğinden yüksek konsantrasyonda B içeren topraklar toksik etki oluşturmakta ve borun dahil olduğu metabolik yolaklarda bozulmalara sebep olmaktadır (Nable vd., 1997; Roessner vd., 2006).

Tez çalışmasında, beş ve on haftalık *A.thaliana* bitkileri 24-Epibrassinolid (1 μM) ve borik asit içermeyen (0 μM) veya yüksek konsantrasyonda borik asit (3000 μM) içeren besin ortamında 24 saat süreyle inkübe dilmiştir. Yapılan çalışmada amaç (a) bor noksanlığı ve bor toksisitesinin bitkilerde hücre çeperi üzerine etkileri ve (b) bitkilerde oluşan bor stresi (noksanlığı ve toksisite) üzerine 24-Epibrassnolidin olası etkilerinin rozet yaprak ve kök hücre çeperinde fizyolojik ve moleküler düzeyde araştırılmasıdır.

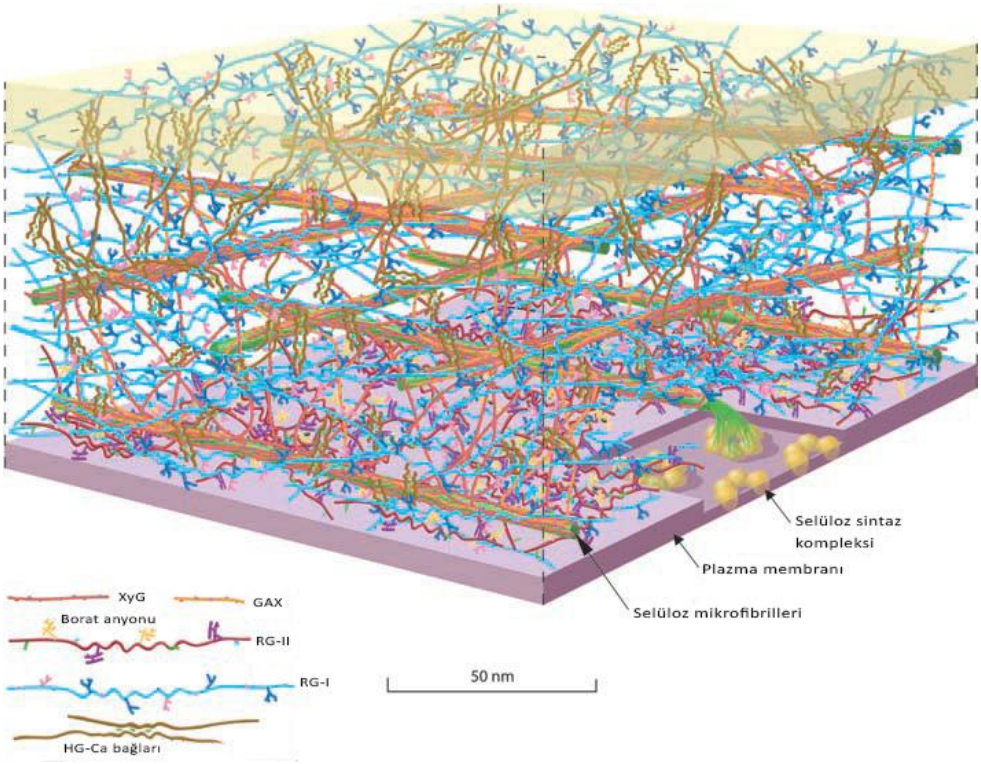
1.1 Bitki Hücre Çeperi Yapısı

Bitki hücreleri, hayvan hücrelerinden farklı olarak hücre şeklini tanımlayan ve bitkinin yapısal bütünlüğüne katkı sağlayan, hücrenin büyüme ve gelişmesinde rol oynayan karmaşık ve dinamik yapıda polisakkarit bir çeper ile çevrilidir (Camacho-Cristobal vd., 2008a; Pauly vd., 1999). Hücre çeperi (hücre duvarı) selüloz mikrofibriller ile birlikte pektin matrisine gömülü selülozik olmayan nötral polisakkaritlerden oluşan, çapraz bağlar ile bağlı yapısal proteinler ihtiva eden, ayrıca bulunduğu doku ve organa özgü lignin içeriğine sahip kompleks bir yapıdır (Gall vd., 2015).

Hücre duvarı, hücreyi güçlendirmekle birlikte hücreler arası iletişim, suyun hareketi ve bitkilerin çevresel ve patojen kaynaklı streslere karşı savunma yanıtlarının oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır (Cosgrove, 2005; Camacho-Cristobal vd., 2008a). Biyolojik işlevlerinin yanı sıra bitki hücre duvarları günümüzde biyoyakıt olarak da ekonomik değere sahiptir (Cosgrove, 2005; Taiz ve Zeiger, 2008; Weng vd., 2008). Bitki hücre duvarlarında bulunan selüloz ve selülozik olmayan polisakkaritler dünyada yenilenebilir karbohidratın asıl kaynağını oluşturmaktadır. Bu polisakkaritlerin sahip olduğu fermente edilebilir şekerler dikkate alındığında hücre duvarları ve artıkları yenilenebilir biyoyakıt üretimi açısından çok önemli olduğu belirtilmektedir (Burton ve Fincher, 2014). Hücre duvarı polisakkaritleri, basit şekerlere ayrıldıktan (sakkarifikasyon) sonra biyoyakıt üretiminin hammaddesi olarak kullanılabilmektedir (Weng vd., 2008; Vanholme vd., 2010). Model bitki olan *A.thaliana,* hücre duvarı biyosentezinin arttırılması ve lignoselülozlu biyokütlenin sakkarifikasyon potansiyelini belirleyen genlerin ve yolakların keşfedilmesi çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Vanholme vd., 2010).

Asıl bileşeni selüloz, hemiselüloz, pektin gibi polisakkaritler olan hücre duvarı, polisakkarit ve protein (glikoprotein ve proteoglikan gibi) matriksi içine gömülü selüloz mikrofibrilleri ve ksiloglukandan oluşan bir ağ yapısını içermektedir (Lerouxel vd., 2006; Camacho-Cristobal vd., 2008a; Cavalier vd., 2008). Bitki hücre duvarı ağırlığının %30-40'ını oluşturan selüloz, hücre duvarının ana yük taşıyıcısıdır. Hemiselülozlar ise selüloz mikrofibrilleriyle etkileşime giren ksiloglukan, ksilan, mannan ve (1,3) (1,4) karışık bağ ihtiva eden β-D-glukan polisakaritlerini kapsamaktadır (Leipman vd., 2010). Pektin polisakkariti ise mikrofibrillerin birbirinden ayrılmalarını, hücre büyümesi sırasında hareketlerini ve büyüme durduğunda sabitlenmesinde rol oynamaktadır (Cosgrove, 2005).

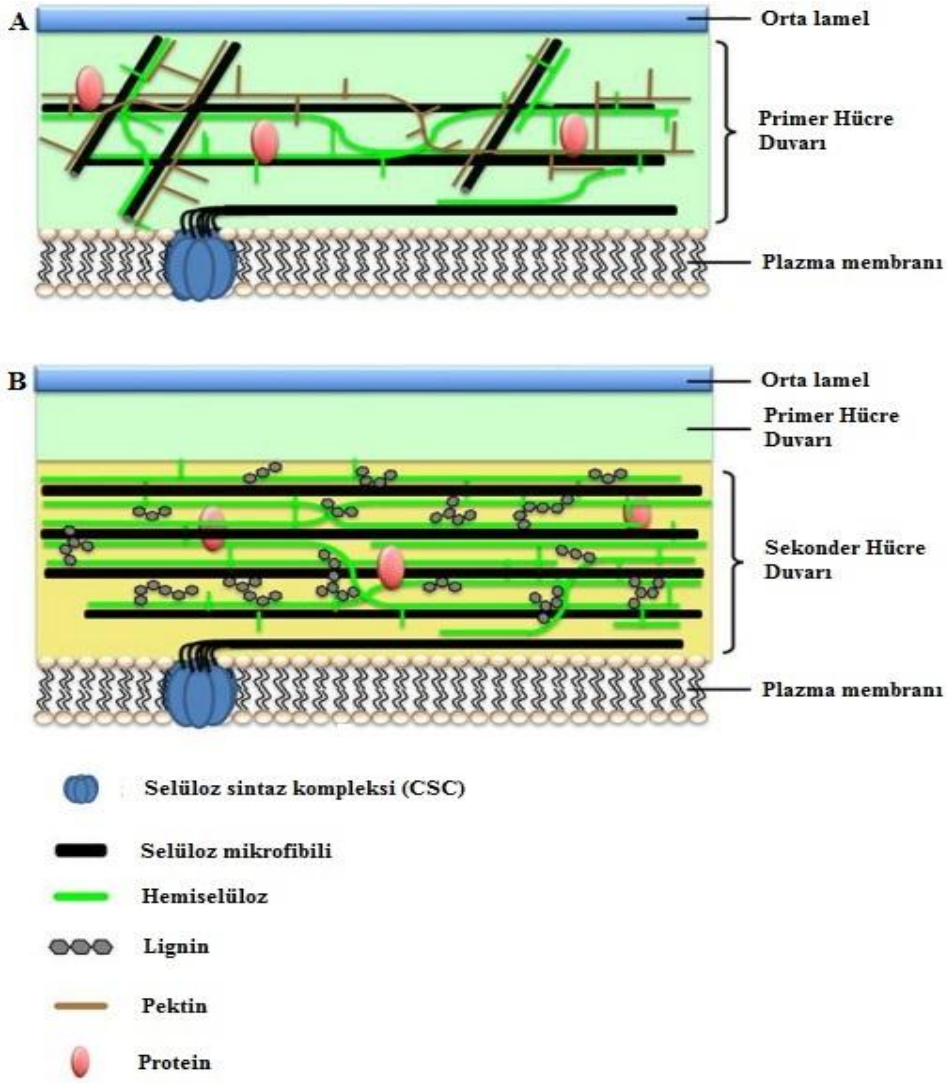
Hücre duvarıyla ilişkili olan proteinler hücre duvarı genişlemesi ve genişlemenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu proteinler ksiloglukan endo-β-transglukosilaz/hidrolazları (XET/XTH'ler; GH16), endo-1,4-β-D- glukanazları (EGase, GH9) ve expansinleri (EXPA, EXPB, EXPLA, EXPLB, GH45) içermektedir. Hücre duvarı değişiminde rol oynayan diğer enzimler ise duvar plastisitesinin kontrolünü sağlamaktadır. Bu grupta, pektin metil esteraz (PME; CE8), poligalakturonaz (PG; GH28), pektin / pektat liyaz benzeri (PLL; PL1) ve pektin asetilesteraz (PAE; CE13) gibi pektin modifiye edici enzimler yer almaktadır (Gall vd., 2015). Şekil 1'de bitki hücre duvarının genel yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1: Bitki hücre duvarının genel yapısı (XyG: ksiloglukan, GAX: glukorunoarabinoksilan, RG-I: Rhamnogalakturonan-I, RG-II: Rhamnogalakturonan-II) (Somerville vd., 2004).

Bitki hücre duvarları, biyosentetik içerikleri ve hücrede bulunduğu yer bakımından primer hücre duvarı (Primary Cell Wall, PCW) ve sekonder hücre duvarı (Secondary Cell Wall, SCW) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Keegstra, 2010; Nakano vd., 2015). Her bitki hücresi, hücre bölünmesi sırasında sentezlenen çeşitli enzim ve yapısal proteinlerle birlikte pektin içeren nispeten ince ve esnek primer hücre duvarına sahiptir. Primer hücre duvarı tarafından oluşturulan kuvvet, hücre uzamasında ve genişlemesinde kritik derecede düzenleyici olarak rol oynadığından primer hücre duvarı hücre şeklinin ve boyutunun

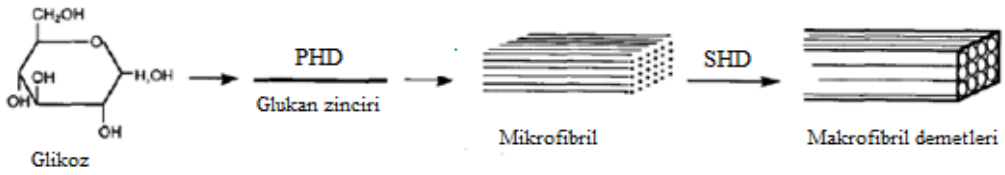
belirlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2). Hücreler, hücre farklılaşması sürecinde primer hücre duvarı ve plazma zarı arasında sekonder hücre duvarını sentezler. Daha az miktarda protein veya pektin içeriğinin yanı sıra lignin ihtiva eden sekonder hücre duvarı nispeten daha kalın ve sert bir yapıdadır. Ksilem hücreleri gibi belirli hücrelerde bulunan sekonder hücre duvarı hücrenin mekanik sertliğini ve/veya hidrofobik özelliğini arttırır (Şekil 2) (Lerouxel vd., 2006; Keegstra, 2010; Liepman vd., 2010; Cosgrove ve Jarvis, 2012; Nakano vd., 2015). Hücreyi dıştan saran bu yapılar bileşimlerindeki karbodihrat, protein, lignin ve su içerikleri bakımından bitki türlerine ve hücre tiplerine göre farklılık göstermekle birlikte, çeşitli gelişimsel olaylar ve çevresel stresler de hücre duvarı bileşenlerini ve yapısını değişikliğe uğratabilmektedir. Bitki hücre duvarları, büyüme ve gelişme, çevresel stresin algılanması ve sinyallere yanıt oluşturulması, bitki savunması ve hücreler arası ileşim gibi olaylarda çeşitli değişikliklere uğrayabilmektedir (Showalter, 1993).



Şekil 2: *Arabidopsis thaliana'*da primer ve sekonder hücre duvar yapısı. A: Primer hücre duvarı modeli, B: Sekonder hücre duvarı modeli (Nakano vd., 2015).

Hücre duvarının ana bileşeni olan selüloz (1,4) –β-D-glukan olarakta isimlendirilir ve demetler halinde bulunan selüloz mikrofibrillerden meydana gelmektedir. Fakat primer hücre duvarı ve sekonder hücre duvarı selülozu arasında önemli yapısal farklılıklar vardır. Primer hücre duvarında selüloz nispeten düşük polimerizasyon derecesine sahiptir ve mikrofibriller 2-2,5 nm genişliktedir. Buna karşılık sekonder hücre duvarında selüloz yüksek derecede polimerizasyona sahiptir ve 5-10 nm'lik mikrofibril genişlikleri vardır. Şekil 3'te primer hücre duvarı ve sekonder hücre duvarı arasındaki selüloz polimerizasyon farkı gösterilmektedir (Delmer ve Amor, 1995). Diğer bazı hücre duvarı bileşenleride primer ve sekonder hücre duvarında farklılık göstermektedir. Primer hücre duvarında hemüselüloz olarak ksiloglukan bulunurken sekonder hücre duvarı ksilan içermektedir.

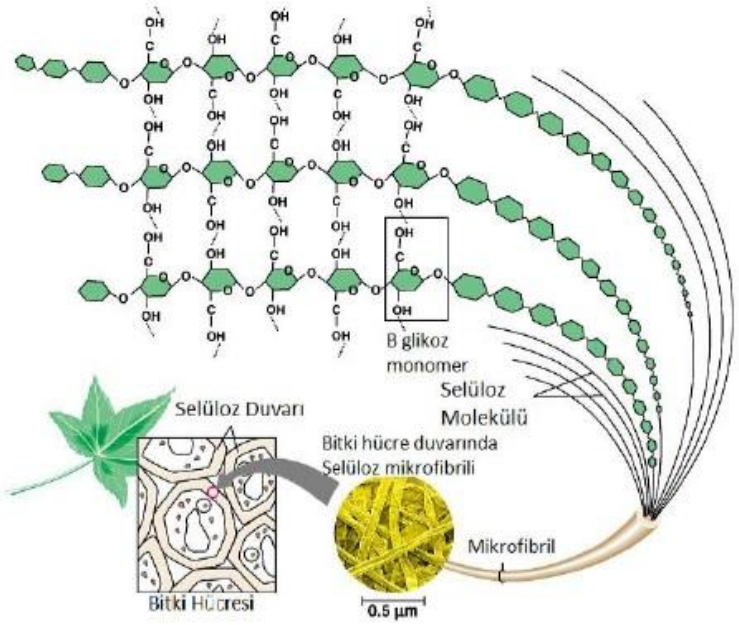
Ayrıca primer hücre duvarında pektin bol miktarda bulunurken, sekonder hücre duvarı lignin ve belirli fenolik polimerlerce zengindir. Hücre duvarı bileşimindeki bu farklılıklar, farklı fiziksel özellikler kazandırarak primer hücre duvarını esnek hale getirir ve sekonder hücre duvarını mekanik ve biyolojik olarak sağlamlaştırır (Nakano vd., 2015).



Şekil 3: Hücre duvarında selüloz polimerizasyonu. PHD: Primer hücre duvarı, SHD: Sekonder hücre duvarı (Delmer ve Amor, 1995).

1.1.1 Selüloz

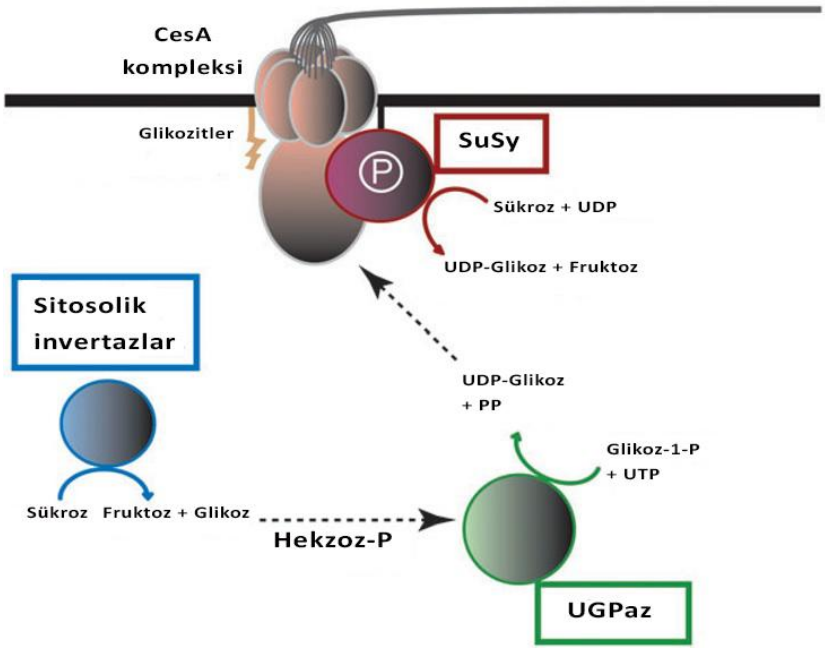
Dünyada en bol bulunan biyopolimer olan selüloz bitki hücre duvarının ana maddesidir (Cosgrove, 2005). Selüloz, bitki hücreleri için destekleyici materyali sağlamakta ve hücre genişlemesinin yönünü de belirlemektedir (Xie vd., 2011). (1,4)-β-bağı ile bağlanan glukan moleküllerinden oluşan selüloz polisakkaridi, bitki hücre duvarının merkezinde ana yük taşıyıcısıdır ve diğer duvar bileşenlerinin bağlanması için iskele görevi görür (Lerouxel vd., 2006; Liepman vd., 2010). Selüloz zincir uzunluğu tam olarak bilinmemekle birlikte dallanmamış şekilde 30-36 tane birbirine bağlı glukan molekelü ihtiva etmektedir (Şekil 4). Selüloz mikrofibrillerini oluşturan paralel glukan zincirleri arasında kurulan Hidrojen bağları ve Van Der Walls kuvvetleriyle kristal yapıların oluşması selüloz polisakkaritine sulu ortamda çözünmez karakter kazandırmaktadır (Somerville vd., 2004).



Şekil 4: Hücre duvarında selüloz (Koç, 2015).

Bitki gelişimi için gerekli olan selülozun sentezi, plazma membranında bulunan selüloz sintaz kompleksi (Cellulose Synthase Complex, CSC) olarak bilinen protein kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir (Liepman vd., 2010; Mendu vd., 2011; Xie vd., 2011). Selüloz sintaz kompleksi plazma zarında hücre içine UDP-glikoz alınımı sağlanan ve hücre dışına mikrofibril salınımı gerçekleştirilen bölgelerde bulunmaktadır (Liepman vd., 2010). CSC kompleksi hekzamerik rozet şeklinde ve 25-30 nm çapındadır. Her CSC 6 katalitik alt üniteden oluşmakta, her alt ünite de CESA gen süper ailesi tarafından kodlanan 6 selüloz sintaz (CESA) proteini içermektedir. Yani bir CSC toplamda 36 CESA proteininden oluşmaktadır (Lerouxel vd., 2006; Xie vd., 2011). Selüloz mikrofibrillerinin boyutları göz önüne alındığında bir rozette bulunan altı alt birimden herbirinin altı (1,4)-β-D-glukan zinciri sentezleyebileceği ve bunun sonucunda 36 glukan zincirinin mikrofibrile kristalize olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (Somerville, 2006). Plazma membranında bulunan CSC'nin katalitik alt birimleri (1,4)-β-D-glukan zincir polimerizasyonu için aktif bir şeker olan üridin difosfat glukozu (UDP-Glc) substrat olarak kullanmaktadır. UDP-Glc, iki farklı yolla elde edilmektedir. Birincisi, sükroz şekerinin selüloz sintaz kompleksinin bir parçası olan sükroz sintaz (SuSy) tarafından bölünmesiyle ortaya UDP-Glc ve frukroz şekeri elde edilmesidir. İkincisi ise UDP-glikoz pirofosforilaz (UGPaz) enzimi varlığında glikoz-1-P

molekülü ile UTP'nin reaksiyona girerek UDP-Glc elde edilmesidir. Böylelikle (1,4)-β-D-glukan zinciri sentezlenmektedir (Şekil 5) (Endler ve Persson, 2011).



Şekil 5: Plazma membranında selüloz sentezi (Endler ve Persson, 2011).

A.thaliana genomunda 10 farklı selüloz sintaz (*CESA*) geni tanımlanmıştır (Somerville vd., 2004; Mendu vd., 2011; Xie vd., 2011). Bunlar *CESA1*, *CESA2*, *CESA3*, *CESA4*, *CESA5*, *CESA6*, *CESA7*, *CESA8*, *CESA9* ve *CESA10* genleridir. Yapılan araştırmalar sonucunda *CESA1*, *CESA2*, *CESA3*, *CESA5*, *CESA6* ve *CESA9*'un primer hücre duvar sentezi sırasında aktif selüloz sintaz kompleksi ile ilişkiliyken *CESA4*, *CESA7* ve *CESA8*'in sekonder hücre duvarı oluşumu sırasında aktif selüloz sintaz kompleksinin bir parçası olduğu belirtilmiştir. Fakat primer ve sekonder hücre duvar oluşumunda selüloz sintaz kompleksinde etkin olan *CESA* genlerinin kesin sayısı belirlenememiştir (Endler ve Persson, 2011; Xie vd., 2011). *CESA* genlerinin spesifik kombinasyonları, farklı hücre tiplerinde, farklı zamanlarda ve farklı aşamalarda aktive olabilmektedir (Mendu vd., 2011). İşlevsel bir selüloz sentezlemek için *CESA* gen ailesinin 3 farklı *CESA* geninin gerektiği ortaya koyulmuştur (Cosgrove, 2005). Primer hücre duvarında selüloz biyosentezi için *CESA1*, *CESA3* ve *CESA6* genlerinin aynı anda ekspresyonu gerekli iken sekonder hücre duvarı biyosentezinde *CESA4*, *CESA7* ve *CESA8* genlerinin aynı anda ifade edilmesi gerekmektedir (Cosgrove, 2005; Lerouxel vd., 2006). Bazı *CESA* genlerinin fonksiyonları henüz bilinmez iken, bazı *CESA* genlerinin fonksiyonları ise çok az bilinmektedir. *CESA3*

geni, *CESA1* geni ile birlikte eksprese olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, solmuş fidelerin hipokotil uzamasında *CESA6* geninin gerekli olduğu belirlenmiştir. Sekonder duvar gelişiminden sorumlu olan *CESA* genleri de ksilem hücrelerinin gelişimi sürecinde eksprese edilmektedir. Ayrıca tohum epidermal hücrelerinde, sekonder radyal duvar oluşumu sırasında *CESA2, CESA5* ve *CESA9* genleri eksprese olmaktadır. *CESA5* geni tohum epidermal hücrelerinde sekonder hücre duvarı oluşumunda müsilaj biyosentezinde rol almaktadır. *CESA1* geni ile homolog olan *CESA10* geninin henüz fonksiyonu bilinmemektedir (Mendu vd., 2011).

A.thaliana genomu selüloz sintaz genleriyle dizi benzerliği olan 29 tane selüloz sintaz benzeri (Celluloz Synthase-Like; CSL) *CSLA, CSLB, CSLC, CSLD, CSLE* ve *CSLG* olmak üzere altı sınıf gen ailesi içermektedir (Somerville vd., 2004; Hazen vd., 2017). CSL proteinlerinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmış olmasa da çeşitli hücre duvarı polisakkaritlerinin sentezini katalizledikleri ortaya çıkartılmıştır (Hamann vd., 2004). CSL proteinleri, β-glikozil transferazların karakteristik sekans motiflerini içermekte, ancak CESA'da bulunan protein dimerizasyonunda rol oynayan çinko parmak motifleri içeren N-terminal bölgelere sahip değildir. CESA proteinlerine olan benzerlikleri ve farklılıkları sebebiyle, golgi'de lokalize olan ve hücre duvarı yapısına katılan ksiloglukan, ksilan, mannan ve diğer β-D-glukanlar gibi hemiselülozların β-D-glukan omurgasını oluşturan sintazların CSL proteinleri olduğu önerilmektedir (Cosgrove, 2005).

Selüloz mikrofibrillerinin oluşumu için CESA proteinlerinin yanı sıra CSC ile ilişkili olmayan bir takım proteinler de rol oynamaktadır. Selüloz oluşumu için membrana bağlı bir endo-1,4-β-D-glukanaz olan *KORRIGAN1* (*KOR1*) geni gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda, bu gende meydana gelen mutasyon sonucunda selüloz sentezinde azalma, primer ve sekonder duvar oluşumunda düzensizlikler gözlenmiştir. *COBRA* (*COB*) geni ise plazma membranının hücre dışı yüzeyinde bulunan glikofosfatidil inositol (GPI) proteinini kodlamaktadır ve selülozun polimerizasyonu ya da hücre duvarı birikimi ile ilgili rolü tam olarak açıklanmamış olmasına rağmen mikrofibril organizasyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca *A.thaliana* genomu *COBRA-LIKE* (*COBL*) ailesinin 11 üyesini de içermektedir. Benzer şekilde selüloz biyosentezinde rol olan diğer bir gen ise *KOBITO1* (*KOB1*)'dur (Somerville vd., 2004; Cosgrove, 2005; Lerouxel vd., 2006; Liepman vd., 2010).

1.1.2 Hemiselüloz

Selülozdan sonra en yaygın ikinci biyopolimer olan hemiselülozlar sınırlı çözünürlük gösteren, selüloz mikrofibilleriyle etkileşime giren ve hücre duvarına sıkıca bağlanmış heterojen bir polisakkarit grubudur (Taiz ve Zeiger, 2008; Liepman vd., 2010). Hemiselülozlar hücre duvarında selüloz mikrofibrillerinin sıkı bir şekilde toplanmasını engelleyerek duvarın mekanik gücünü zayıflatmakta ve dolayısıyla hücre duvar genişlemesini kolaylaştırmaktadır (Somerville vd., 2004). Hemiselülozlar 4 ana sınıfa ayrılırlar: ksiloglukanlar (XyG), mannanlar, ksilanlar ve (1,3) (1,4) karışık bağ ihtiva eden β-D-glukanlardır (Lerouxel vd., 2006; Liepman vd., 2010). *A.thaliana* gibi dikotiledonlu bitkilerin primer hücre duvarında en çok bulunan hemiselüloz ksiloglukanlardır ve yaprak hücre duvarlarının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Liepman vd., 2010). Sekonder hücre duvarı ise daha az miktarda ksiloglukan içerirken daha fazla miktarda selüloza sıkıca bağlanan ksilan ve glukomannan içermektedir (Taiz ve Zeiger, 2008). Ayrıca diğer dikotiledonlu bitkilerde olduğu gibi *A.thaliana'*da ksiloglukanların karakteristik XXXG tipini ihtiva etmektedir (Liepman vd., 2010).

Ksiloglukan, selüloz mikrofibrilleri ile büyük hemiselüloz polisakkaritlerini birbirine bağlayan önemli bir glukandır. Ksiloglukan, (1,4)-β-D-glukan omurgasına sahip, (1,6)-α-bağlantılı ksiloz yan zincirleri ile birlikte bu yan zincirlere ekli olarak galaktoz ve fukoz ihtiva eden kompleks bir polisakkarittir (Cosgrove, 2005; Liepman vd., 2010). Bu karmaşık yapıdaki polisakkaritin sentezlenmesi için en az dört enzimatik aktivite gerekmektedir: (1) *CSLC4* geni tarafından sentezlenen UDP-glikoz bağımlı (1,4)-β-glukan sintaz enzim aktivitesiyle glukan omurganın oluşumu, (2) *XXT1*/*XXT2* genlerinin ürünü olan UDP-ksiloz bağımlı (1,6)-α-ksiloz transferaz enzimi aktivitesi ile ksiloz rezidülerinin glukan omurgaya eklenmesi, (3) *MUR3* geninin kodladığı UDP-galaktoz bağımlı (1,2)-β-galaktozil transferaz enzimi aktivitesiyle spesifik ksiloz rezidülerine galaktoz rezidülerinin eklenmesi ve son olarak (4) *FUT1/MUR2* genlerinin ürünü GDP-fukoz bağımlı (1,2)-α-fukozil transferaz enzimi aktivitesiyle seçilen galaktoz rezidülerine fukoz eklenmesiyle ksiloglukanın biyosentezi gerçekleşmektedir (Liepman vd., 2010).

Hücre duvarının temel yük taşıyıcısı selüloz/ksiloglukan ağı olması nedeniyle hücre büyüme ve farklılaşma süreçlerinde ksiloglukan sentezi ve modifikasyonu büyük bir öneme sahiptir. Hücre genişleşmesi sırasında ksiloglukanların modifikasyonu ksiloglukan

endo transglikosilaz / hidrolaz (XTHs) enzimi tarafıdan gerçekleşmekte ve böylece hücre duvarı zayıflamadan hücre genişlemesi sağlanmaktadır. Bu nedenle *XTHs* gen ailesi üyeleri hücre duvarı değişikliği sürecinde önemli rol oynamaktadır. *XTHs* genlerinin ifadesinin uzama bölgesinde ve/veya hücre genişlemesinin son bulduğu ancak duvarın yeniden şekillendiği duvar oluşumunun aktif olduğu bölgelerde yüksek olduğu saptanmıştır (Cosgrove, 2005). *XTHs* gen aileleri çeşitli bitkilerde bulunmakla birlikte *A.thaliana* genomu 33 *XTH* genini ihtiva etmektedir (Liu vd., 2007).

Ksiloglukan, selüloz mikrofibrillerine kovalent olmayan bağlar ile çapraz bağlanarak büyüme sırasında hücre duvarına sağlamlık kazandırmaktadır. XTH'ların iki farklı mekanizma ile hücre duvarı genişlemesi sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. Birincisi, XTH'lar ksiloglukan uzunluğunu değiştirerek hücre duvarını zayıflatmadan genişlemesini sağlamaktadır. Diğeri ise selüloz mikrofibrilleri ile ksiloglukan arasındaki çapraz bağları parçalamakta ve bu bağları yeniden kurarak selüloz/ksiloglukan çerçevesinin oluşmasını ve düzenlenmesini sağlamaktadır. Ksiloglukanlar kök tüylerinin oluşumu, hipokotil uzaması, yaprak büyümesi ve genişlemesi, tohumda depolanmış karbohidratların hidrolizi, meyve oluşumu gibi hücre duvarı modifikasyonunun gerekli olduğu bitki gelişim süreçlerinde ve organ morfogenezinde rol oynamaktadır (Liu vd., 2007; Singh vd., 2011).

Mannan, bitki türlerinde yaygın olarak bulunan diğer bir hemiselüloz sınıfıdır. Mannan biyosentezi için en az iki farklı enzim gerekmektedir. (1,4)-β-D-mannan omurga GDP-mannoz-bağımlı (1,4)-β-mannan sintaz tarafından sentezlenmektedir, ayrıca bazı mannan sintaz enzimleri GDP-glikoz bağımlı (1,4)-β-glukan sintaz aktivitesine sahip olduğundan glukomannan sintaz olarak da bilinmektedir. Mannan ve/veya glukomannan omurgasına (1,6)-α-galaktozil transferaz enzimi tarafından galaktozil rezidüleri eklenmektedir. *A.thaliana'*da glukomannan sintaz enzimini selüloz sintaz-benzeri A (*Cellulose Synthase-Like A, CSLA*) gen ailesinin üyeleri tarafından kodlanmaktadır (Liepman vd., 2010). Mannanların hücre duvarındaki rolü tam olarak açıklanamamakla birlikte selüloz mikrofibrillerinin çapraz bağlanmasında yapısal role sahip olduğu önerilmektedir. Ayrıca bazı tohumlarda depo polisakkariti olarak rol almaktadır (Handford vd., 2003).

Sekonder hücre duvarında bol miktarda bulunan diğer hemiselülozik polisakkarit ise ksilandır. Ksilan, arabinozil, glikuronozil veya asetil gruplarının bağlı olduğu (1,4)-β-D-ksilan omurgasından oluşmaktadır. *A.thaliana* genomu ksilan biyosentezinde rol oynayan

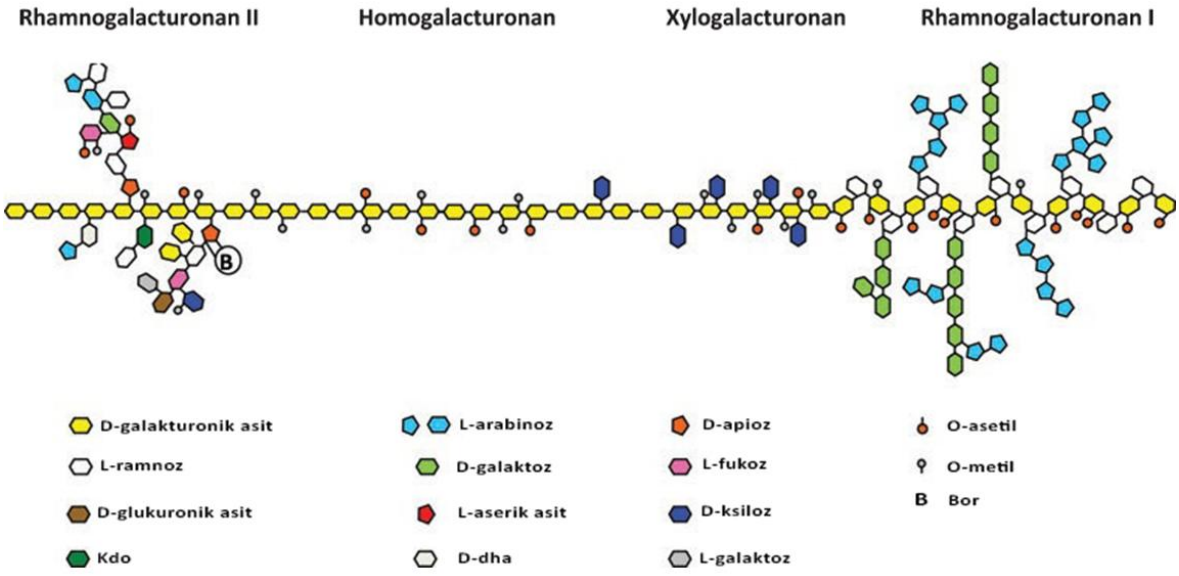
altı glikozil transferaz enzimi kodlayan gene (*IRX7, IRX8, IRX9, IRX10, IRX14 ve PARVUS)* sahiptir. Ksilanın yapısal özellikleri bitki gelişimi süreçlerinde farklılık gösterebilmektedir. Bu hemiselüloz grubu da selüloz mikrofibrillerinin çapraz bağlanmasına ve hücre mekanik özelliklerine katkı sağlamaktadır (McCartney vd., 2005; Liepman vd., 2010).

1.1.3 Pektin

Bitki hücre duvarları selüloz ve hemiselülozun yanı sıra hücre duvar maktriksinde jelleştirici ajan olan heterojen bir polisakkarit grubu pektinleri içermektedir (Taiz ve Zeiger, 2008). Primer hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %35'ini oluşturan bu polisakkarit, matrikste hidratlı bir jel oluşturarak mikrofibrilleri birbirinden ayırmakta, hücre büyümesi sırasında mikrofibrillerin hareketini sağlamakta ve büyüme durduğunda mikrofibrilleri yerlerine sabitlemektedir. Pektinler, duvar gözenekliliğinin ve duvar kalınlığının önemli belirleyicileridir ve hücre duvar bileşenleri arasında sulu tamponlar veya sulandırılmış kalsiyum şelatörleri ile en kolay çözünenidir (Wolf vd., 2003; Cosgrove, 2005). Pektin biyosentezinde karmaşık yapısı sebebiyle çok sayıda enzim rol oynar. Sentez sırasında çok sayıda glikosil transferaz, metil transferaz ve asetil transferazın rol aldığı tahmin edilmektedir (Liepman vd., 2010). Pektinlerin biyosentezi golgide gerçekleştirildikten sonra yan zincirlerle modifiye edilir ve metil esterefikasyonuyla yüksek metillenmiş formda apoplastik boşluğa salgılanır. Burada pektin metil esteraz (PME) enzimleriyle de-esterifiye edilerek duvar yapısına katılır (Wolf vd., 2003; Peacelle vd., 2008).

A.thaliana primer hücre duvarındaki pektik polisakkaritler homogalakturonan (HG), rhamnogalakturonan-I (RG-I) ve daha az miktarda rhamnogalakturonan-II (RG-II)' den meydana gelmektedir. Ayrıca *A.thaliana* yapraklarının primer hücre duvarları bol miktarda ksilogalakturonan (XG) da içermektedir. Ksilogalakturonan, galakturonik asitten oluşan omurgaya ksiloz rezidüleri eklenerek modifiye edilmiş bir homogalakturonandır (Lerouxel vd., 2006; Pelloux vd., 2007; Liepman vd., 2010). Pektinler genellikle galakturonik asit gibi asidik şekerler ile ramnoz, galaktoz ve arabinoz gibi nötr şekerleri içermektedir. Basit yapılı olan homogalakturonan (HG), (1,4) bağlı α-D- galakturonik asit rezidülerinden oluşan bir polisakkarittir. Rhamnogalakturonan-I (RG-I) çeşitli yan zincirler bulunduran heterojen yapılı uzun bir omurgaya sahiptir. RG-I, (1,4) α-D- galakturonik asit ile (1,2) α-

D-ramnoz içermekte olup, yan zincirler ramnoza eklenmiş olan arabinan, galaktan ve arabinogalaktanlardan meydana gelmektedir. Galakturonik asit rezidüleri genellikle metil esterlidir. Rhamnogalanturonan-II (RG-II) karmaşık bağlanma şekillerine sahip en az 10 farklı şeker içeren dallanmış yapıdaki pektik bir polisakkarittir (Taiz ve Zeiger, 2008). RG-II yapısını oluşturan birimler borat diesterleri tarafından çapraz bağlanmış olup hücre duvarı yapısı için oldukça önemlidir (Somerville vd., 2004; Taiz ve Zeiger; 2008).



Şekil 6: Pektinin şematik gösterimi. *A.thaliana* ve diğer bitkilerde bulunan pektinin 4 domaini (Liepman vd., 2010).

Sentezlendikten sonra yüksek metillenmiş formda bulunan pektik polisakkaritlerin hücre duvarı yapısına katılabilmeleri için pektin metil esteraz (PME; EC 3.1.1.11) enzimleri tarafından de-esterefiye edilmesi gerekmektedir. Bu enzimlerin aktivitesi apoplastik boşluğun pH'sına ve iki değerlikli katyonların varlığına bağlıdır. PME, hücre duvarında serbert karboksil grubu üreten pektinlerin metil esterlenmiş galakturonik asit omurgasının de-esterefikasyonunu katalize etmektedir. PME'ler enzimatik aktivitesi sayesinde bitki gelişim sürecinde veya stres durumunda hücre duvarı genişleşmesi ve hücre duvarı oluşumu gibi hücre duvarının yapısal ve işlevsel özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Richard vd., 1994; Wolf vd., 2003).

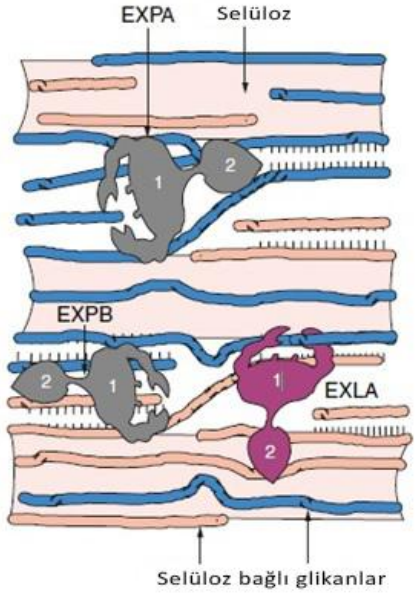
1.1.4 Ekspansin

Bitkiler aleminin tüm üyelerinde bulunan ekspansinler, bitki büyümesi sırasında hücre duvarının uzamasında ve çevresel stresten korunması için duvarın esnemesinde rol oynamaktadır (Cho ve Cosgrove, 2000). Ekspansinler, hücre duvarı yapısal bileşenlerini hidrolitik olarak koparmadan, pH'ya bağlı olarak duvarın uzamasında rol oynayan duvar gevşetici proteinlerdir (Zhang vd., 2011). Bu proteinler, asidik pH'larda yüksek aktiviteye sahip olduklarından "asit büyüme faktörleri" olarak da tanımlanır (Wei vd., 2011). Ekspansinler bitki hücresi büyümesinde, meyve olgunlaşması ve yumuşamasında, kök saçaklarının oluşumunda ve yaprak organogenezisi gibi gelişim süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Wieczorek vd., 2006; Wei vd., 2011).

Ekspansinler, sekans farklılığı ve biyokimyasal etkinliklerine göre ayrılmış dört büyük gen ailesine (*EXPA, EXPB, EXLA* ve *EXLB*) sahiptirler (Cho ve Cosgrove, 2000; Cosgrove, 2005; Sampedro ve Cosgrove, 2005; Choi vd., 2006). *A.thaliana* genomu 36 farklı ekspansin genine sahiptir. En geniş alt aile 26 üyeyle α-ekspansin (*EXPA*,eski ismi *EXP* veya *EXPa1*) olurken, β-ekspansin (*EXPB*, eski ismi *EXPb1*) gen ailesi 6 gen içermektedir. Ayrıca *A.thaliana* genomu 3 tane ekspansin-benzeri A (*EXLA*, eski ismi *EXPL* veya *EXPb2*) geni ve 1 tane ekspansin-benzeri B (*EXLB*, eski ismi *EXPR* veya *EXPb3*) genine sahiptir (Li vd., 2003; Choi vd., 2006; Cosgrove, 2005). EXPA ve EXPB proteinleri hücre duvarı gevşemesinde rol oynarken *EXLA* ve *EXLB* genlerinin sadece gen dizileri bilinmektedir (Sampedro ve Cosgrove, 2005). Ekspansin genlerinin sentez mekanizması tam olarak açıklanmamakla birlikte birçok durumda oksin, giberellin ve etilen gibi bitki büyüme hormonları tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Wieczorek vd, 2006).

Ekspansinler çeşitli bitkilerde hücre büyümesi ve farklılaşması aşamalarında etki göstermektedir. Örneğin, çeltik (*Oryza sativa*) ekspansinlerinden *OsEXPA4*'ün bitki büyümesi ve gelişimini etkilediği, domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkisinde ise ekspansinlerin meyve yumuşamasında etkili olduğu ortaya koymuştur (Zhang vd., 2011). *A.thaliana* ekspansinlerinden *AtEXPA1* olgun yapraklarda bulunurken, *AtEXPA7* ve *AtEXPA18* kök büyümesi ve gelişimiyle ilişkili ekspansinlerdir (Choi vd., 2006). Ayrıca *AtEXPA5*, brassinosteroid hormununun sinyal yolağında etkin olan *BRASSINAZOLE RESISTANT 1* (*BZR1*) tarafında ekpresyonu düzenenlenen, büyüme düzenleyici olarak gösterilen bir gendir (Park vd., 2010).

Ekspansinlerin etki mekanizması için öne sürülen model şu şekildedir; ekspansinler matriks polisakkaritlerini birbirine ya da selüloz mikrofibrillerin yüzeyine bağlayan kovalent olmayan bağları kırmaktadır. Hücre duvarı, ksiloglukan, ksilan gibi çeşitli glikanların hidrojen bağlarıyla selüloz mikrofibrillerine bağlanması sonucu oluşan kuvvetli ve esnek bir ağ içermektedir. Hücre duvarı genişlemesi sırasında EXPA'lar selüloz yüzeylerinden ksiloglukanların ayrılmasını sağlarken benzer etkiyle EXPB'ler selüloz yüzeyinden ksilanın ayrılmasını sağlamaktadır. Ekspansinin birbirine yapışan zincirleri açarak fermuar gibi hareket ettiği ön görülmektedir. Ekspansin-benzeri A (EXLA) ve ekspansin-benzeri B (EXLB) proteinlerin aktiviteleri ise henüz açıklanamamakla birlike duvar genişlemesi sırasında hücre duvarına salındığı ön görülmüştür (Sampedro ve Cosgrove, 2005).



Şekil 7: Basitleştirilmiş bitki hücre duvarı modeli ve ekspansinlerle gevşetilmesi. Hücre duvarı, ksiloglukan veya ksilan (ince şeritler) gibi çeşitli glikanların bağlı olduğu selüloz mikrofibril (gölgeli alanlar) iskeletten oluşmaktadır ki bu polisakkaritler, hidrojen bağlarına dayanan (kısa çizgilerle gösterilen) kuvvetli, esnek, yük taşıyıcı bir ağ oluşturmaktadır. Hücre duvarının uzaması selüloz mikrofibrillerinin hareket etmesini ve ayrılmasını gerektirmektedir. Ekspansinler (EXPA), benzer etkiler için lokal ayrışma ve ksiloglukanların selüloz yüzeyi üzerinde kaymasıyla bu hareketi teşvik ederken, ekspansin (EXPB), ksilan gibi farklı bir glukan üzerinde benzer etki üzerine çalışmaktadır (Sampedro ve Cosgrove, 2005).

1.2 Bor ve Borun Hücre Duvarındaki Rolü

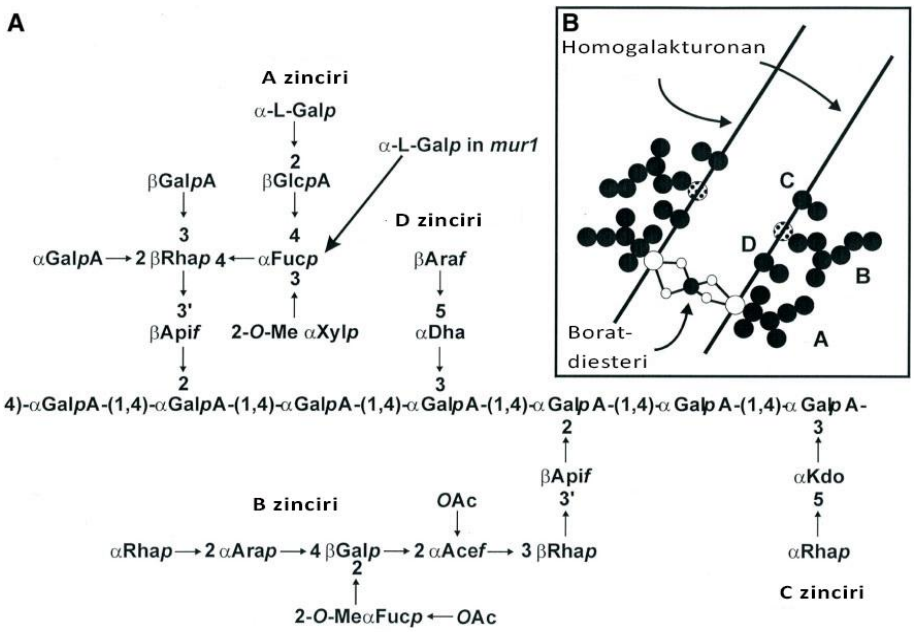
Periyodik tabloda "B" ile simgelenen bor, 10,81 atom ağırlığındadır ve metal ile ametal arası yarı iletken özelliğe sahiptir. Doğada az miktarda bulunan bor litosfer ve hidrosfer tabakalarında yaygın olarak bulunmaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008b). Toprakta bor, en çok borik asit [$B(OH)_3$] formunda bulunurken az miktarda borat anyonu [$B(OH)_4^-$] formuna da rastlanmaktadır. Bununla birlikte, borik asit ve borat anyonu, normal koşullar altında çeşitli biyolojik moleküller ile kolayca reaksiyona girebilmektedir (Brown vd., 2002). Dünyada önemli bor yatakları Türkiye, ABD, Rusya ve Güney Amerika'da bulunmakta ve Türkiye dünya toplam bor rezervi sıralamasında %74'lük pay ile ilk sırada yer almaktadır (URL-1, 2017).

Bor (B) bitkilerin normal büyümesi için gerekli olan bir metaloiddir. Bitkilerde şeker taşınımı, karbonhidrat metabolizması, kök uzaması, membran bütünlüğü, lignifikasyon, indol asetik asit (IAA) metabolizması, fenol metabolizması, nitrat asimilasyonu, antioksidatif savunma sistemi, nükleik asit metabolizması gibi metabolik yollarda rol oynayan bor, hücre duvar sentezi ve yapısı için de çok önemlidir (Matoh, 1997; Spurr, 1957; Demirtaş, 2005; Baykal ve Öncel, 2006; Goldbach ve Wimmer, 2007; Camacho-Cristobal vd., 2008a; Camacho-Cristobal vd., 2008b). Hücredeki borun %90'ına yakını hücre duvarında bulunmaktadır ve hücre duvarının metabolik faaliyetlerinden çok yapısal birimlerine katılmaktadır (Hu vd., 1996; Brown vd., 2002). Bitkiler için esansiyel önemi olan bor elementi bitkilerde suda çözünen ya da suda çözünmeyen formlarda bulunmaktadır. Suda çözünen formdaki bor apoplastik bölgede borik asit (BA) olarak yaygın şekilde bulunurken, suda çözünmeyen formu bitki hücre duvarında Rhamnogalakturonan-II (RG-II) yapısında bulunmaktadır. BA borat-diester bağlanması yoluyla RG-II bölgesinde iki pektik polisakarit zincirini çapraz bağlar ve böylece hücre duvarlarında bir pektik polisakkarit ağı oluşturmaktadır (Matoh, 1997). Oluşan pektik polisakkarit ağı duvarı gözenekliliğine ve gerilip uzama kuvvetinin kontrolüne önemli katkı sağlamaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008a; Camacho-Cristobal vd., 2008b).

Borit asit (BA), hücrede borat anyonu formuna dönüşmekte ve bileşiğin cis pozisyonunda sahip olduğu diol gruplarıyla kendiliğinden etkileşime girebilmektedir. Bu yüzden hücrede borik asit ve borat anyonlarının birbirine dönüşümü arasındaki denge ve borat anyonları ile diol grupları arasındaki etkileşim önemlidir. Çözeltinin pH'sına ve diollerin

stereokimyasına bağlı olarak sulu çözeltilerde bu denge hızlı bir şekilde kurulmakta ve geri döndürülebilmektedir. Böylece borik asitin sahip olduğu bor, hücrede şekerler ve fenolik bileşikler ile kendiliğinden reaksiyona girerek kompleks oluşturabilmektedir (Matoh, 1997).

Bitkiler toprakta bulunan borik asiti kökleriyle almakta ve ksilem boruları yardımıyla yapraklara kadar ulaştırmaktadır. Bitki tarafından alınan borik asitin bir kısmı hücre duvarında yeni sentezlenen pektik polisakkarit zincirinin RG-II bölgesine bağlanmakta ve B-RG-II kompleksini oluşturmaktadır. Kalan kısmı ise çoğu zaman bir ligand ile kompleks oluşturmadan borik asit olarak hücre duvarında birikmektedir (Matoh, 1997). Bor, 2 tane RG-II monomeriyle ester bağı kurarak borat köprüsünü oluşturmaktadır (Şekil 8). Böylece pektik polisakkarit olan Rhamnogalakturonan-II hücre duvarının stabilitesini sağlamaktadır. Kompleks bir bileşik olan RG-II'nin yan zincirlerinde apioz bölgeler bulunmasına rağmen sadece A yan zincirindeki apioz bölge borat anyonlarıyla çapraz bağlanabilmekte ve B yan zincirinde bulunan apioz bölge borat köpsürü oluşumuna katılmamaktadır (O'Neill vd., 2001; Goldbach ve Wimmer, 2007). Bitkilerde B eksikliği ve B toksisitesi borat köprülerini etkilemektedir. Bor eksikliğinde yetişen bitkilerin kırılgan yaprakları ve bor toksisitesinde yetişen bitkilerin yapraklarının bükülmeye tepki olarak elastik yapısı borat köprüleri ile açıklanmaktadır (Blewins ve Lukoszewski, 1998). Bor, RG-II apioz rezidüleri ile oluşturduğu borat köprüsü sayesinde hücre duvarı stabilitesini sağlamaktadır. Borun, yetersiz veya fazla olduğu şartlarda büyüyen bitkileride hücre duvarında mevcut olan B-RG-II kompleks miktarı değiştiğinden fenotipik farklılıklar görülmektedir (Tenhaken, 2015).



Şekil 8: Rhamnogalakturonan-II (RG-II) yapısı. A: RG-II polisakkaritinin ayrıntılı yapısı. B:B-RG-II dimerinin yapısı (Goldbach ve Wimmer, 2007).

1.2.1 Bor Eksikliği

Borun bitkiler tarafından alınımı toprağın sahip olduğu bazı özellikler ile engellenebilmekte ya da azaltılabilmektedir. Toprak pH'sında meydana gelen artış ve kireçlenmeye bağlı olarak bitkinin bor alınımı azalmaktadır. Bununla birlikte, bitki büyüme ortamında bazı besin elementlerinin fazla bulunması sonucunda da bor alımı etkilenmektedir. Ortamda kalsiyum veya azot miktarının fazla olması da bor alınımını ciddi derecede azaltmaktadır (Demirtaş, 2005).

Bor eksikliği bitkilerde çeşitli anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açmaktadır (Brown, 2002; Camacho-Cristobal vd., 2008b). Bitkiler normal gelişimleri için bora ihtiyaç duyarlar ve özellikle de köklerin gelişiminde önemli bir etkiye sahiptir. Bor noksanlığı bitkilerde genelde çeşitli dokuların oluşumunu ve gelişimini yavaşlatmakta ve bitkinin su metabolizmasını bozmaktadır. Bor eksikliği belirtileri bitkiden bitkiye değişse de ortak belirtilerden biri tepe tomurcuk ve sürgün gelişiminin durmasıdır. Karakteristik olarak uç ve olgun yaprakların damar aralarında kloroz ve nekroz görülmektedir. Ayrıca genç dalların kuruması, anormal çiçek ve meyve oluşumuda B eksikliğinde sık görülen belirtilerdir. Bor, bitkilerde vejatatif gelişmeye nazaran generatif gelişmede daha büyük

önem taşımaktadır. Ortamda yeterli miktarda bor bulunmadığı zaman kök ucunda hücre büyümesi ve bölünmesini engellenmekte ve kök uzaması gerilemektedir. Bor eksikliğinde bitki kök uçlarında gelişimin gövdeye oranla azalmasıyla gövde/kök oranı arttığından bitkide stres koşullarına hassasiyet artmaktadır. Ayrıca, bor eksikliğinde deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi ve ribonükleik asit (RNA) miktarında da kayda değer azalma görülmektedir (Demirtaş, 2005; Goldbach ve Wimmer, 2007; Liu vd., 2014). Ayrıca, karbonhidrat metabolizması etkilenerek hücrede anormal miktarda karbonhidrat birikimine sebep olmakla birlikte karbonhidrat çeşidini de etkileyebilmektedir (Spurr, 1957). Borun sınırlı bulunduğu ortamda hücre büyümesi ve bölünmesi sınırlanmakta, bu durumda yaprak alanında ve fotosentez kabiliyetinde azalma görülmektedir (Bayrak vd., 2005). Bor, karbonhidrat oranı yüksek olan hücre duvarları için daha önemlidir ve eksikliğinde apikal meristem büyümesi durmakta ve hücre duvarı sentezi veya yapısal bütünlüğü inhibe olmaktadır. Bor ihtiyacı bitkiler arasında değişmekle birlikte B eksikliğinde genelde anormal derecede kalın ve yapısal olarak deforme olmuş, normal dokudan daha kaba hücre duvarı oluşumu gözlenmektedir (Brown, 2002). Bununla birlikte B eksikliğinde, birçok hücre duvarı gevşemesinde ve uzamasında rol oynayan hücre duvarı modifiye edici enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon seviyeleri azalmaktadır. Örneğin, B eksikliği *XTH* genlerinin transkript seviyesini düşürerek ksiloglukan ile çapraz bağlanmış selüloz mikrofibrillerinin yeniden düzenlenmesini etkilemekte ve sonuç olarak hücre duvarı gerilme özelliğinde değişiklikler meydana getirmektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008b). Yapılan çalışmalarda B eksikliğinde *A.thaliana* köklerinde aktin ve tubulin seviyelerinin artması ve mısır kök uçlarında sitoiskelet polimerizasyonunda meydana gelen değişiklik, borun sitoiskelet yapısında ve oluşumunda rol aldığını göstermektedir. Ayrıca borun plazma membran yapısı ve fonksiyonu için de gerekli olduğu düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada da B eksikliğinin membran potansiyelini değiştirdiği ve ATPaz proton pompası aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Camacho-Cristobal vd., 2008b).

1.2.2 Bor Toksisitesi

Toksik düzeydeki B, kurak ve yarı kurak olan topraklarda özellikle Türkiye, Güney Avusturalya, Şili, Kaliforniya ve Akdeniz Ülkelerinde bitki gelişimini sınırlayan önemli bir tarımsal tehdittir (Surgun vd., 2016b).

Bor toksisitesi, borun hücrede önemli metabolitlere affinite göstermesinden kaynaklı olabileceği tahmin edilmektedir. Bor nispeten tepkisiz olarak kabul edilse de cis konumunda hidroksil grubu bulunduran bileşikler (cis-dioller) ile kompleks oluşturabilmektedir. Bu durum toksik düzeydeki borun hücre içinde cis diol gruplarına sahip olan metabolitler ile kompleks oluşturabileceğini göstermektedir. Bor toksisitesine maruz kalan bitkidelerde fizyolojik yolaklarda değişiklikler meydana gelmektedir ve bununla ilgili olarak 3 olası mekanizma önerilmiştir: (1) hücre duvarı yapısının değiştirilmesi, (2) ATP, NAPH ve NADPH'nin riboz kısımlarında bağlanarak metabolik bozulma meydana gelmesi ve (3) serbest şekerlere yada RNA'nın yapısındaki riboza bağlanarak hücre bölünmesinin ve genişlemesinin engellenmesidir (Reid vd., 2004, Surgun vd., 2016a). Bor toksisitesinin başlıca semptomları, kuru madde kaybı, kök uzamasının engellenmesi, kökte hücre bölünmesi ve RNA içeriğinde azalma, meyve çürümesi, yapraklarda uç ve kenarlarda klorozla başlayıp nekrozla devam eden bozulmalar, kambiyum ölümüne bağlı gövde ölümü, yaşlı yaprakların yanık bir görünüm alarak erken dönemde dökülmesi, yaprakta klorofil miktarın, fotosentez hızının ve stomatal iletkenliğin azalmasıyla birlikte düşük lignin ve suberin seviyesi şeklinde sıralanabilir (Baykal ve Öncel, 2006; Roessner vd., 2006).

Bor toksisitesi, bir takım hücresel yolakları etkilemekte ve bitki büyümesini engellemektedir (Kasajima ve Fujiwara, 2007). Yüksek bor seviyesi hücresel bir sinyal olarak transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girebilmektedir. Yüksek B seviyesinin *A.thaliana'*nın hem kök hem de rozet yapraklarda bazı genlerin ekspresyonunu uyardığı tespit edilmiştir. Bu genlerden biri borun toksik olduğu koşullarda bitkide fizyolojik yanıt oluşturan yolaklarda rol oynayan downstream genlerinin ekspresyonlarını düzenleyen bir çinko parmak ailesi transkripsiyon faktörüdür (At1g03770) (Camacho-Cristobal vd., 2008b).

Bor eksikliğinin aksine, hücre duvarı bileşenlerinin B toksisitesine tepkisi daha az bilinmektedir (Wang vd., 2010). Reid vd. (2004) tarafından arpa fidelerinde yapılan çalışmada B toksisitesinin iki yönlü belirgin etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Nispeten düşük konsantrasyonlardaki (1-5 mM) B, hücre bölünmesini ve genişlemesini engellemektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (23 mM ve üstü) ise dokunun ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bor, primer hücre duvarının önemli bir bileşenidir ve B fazlası hücre duvarı sentezine müdahale ederek büyümeyi bozabilmektedir (Reid vd., 2004). Bor

toksisitesi muhtemelen çapraz bağlanmaları bozarak hücre duvarının genişlemesini engellemektedir (Princi vd., 2016). Tütün bitkisinde yapılan çalışmalarda B fazlalığı sonucunda hücre duvarında lignin, pektin-bağlı fenolik bileşikler ve suberin içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (Ghanati vd., 2002). Benzer şekilde B toksisitesi soya fasulyesinde de hücre duvarı suberin miktarı arttırmış ve B fazlalığında suberin sentezinin artmasının spesifik bir cevap olduğu ortaya çıkartılmıştır (Ghanati vd., 2005). Bor toksisitesinin hücre duvarı modifikasyonu ile ilgili genlerin sentezini uyardığı bilinmektedir (Aquea vd., 2012). 2010 yılında salatalık bitkisinde yapılan bir çalışmada yüksek B konsantrasyonunun (5 mM) kök uzamasını inhibe ettiği, ekspansin ve *PME* genlerinin ekspresyonunu up-regüle ettiği ve *PME* enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada, hidrojen sülfid uygulamasının yüksek bor konsantrasyonun neden olduğu toksik etkilerini ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (Wang vd., 2010).

1.3 Stresin Hücre Duvarı Üzerine Etkisi

Bitkiler yaşamları boyunca birçok çevresel strese maruz kalmaktadır. Bitkiler üzerinde etkili olan biyotik (virüsler, bakteriler, mantarlar veya nematodlar gibi canlı organizmalar) ve abiyotik (kuraklık, sıcaklık, tuzluluk, ağır metal kontaminasyonu ve besin eksikliği gibi çeşitli olumsuz çevresel koşulları) stres faktörleri bitki verimini ve yaşamını olumsuz etkilemektedir (Büyük vd., 2012; Gall vd., 2015). Ayrıca B gibi topraktaki besin maddelerinin konsantrasyonunda bir dengesizlik olması bitki hücre duvarlarını etkileyen önemli abiyotik stres faktörü olabilmektedir (Tenhaken, 2015).

Bitkiler stres faktörlerinden kaçınmak veya tolere edebilmek için çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal stratejiler geliştirmişlerdir (Degenhardt ve Gimmler, 2000; Gall vd., 2015). Hücre uzamasını yavaşlatarak büyümenin azalması, stresin görünür en erken etkisidir (Gall vd., 2015). Stres faktörlerinin meydana getirdiği etki bitkinin türüne, tolerans ve adaptasyon yeteneğine göre değişiklik gösterir (Büyük vd., 2012). Bazı bitkilerin tuz stresine karşı gelişimlerinde yavaşlama ve köklerinin boyunda bir azalma gözlenmiştir. Ağır metal stresine karşı ise buğday köklerinin çapında azalma tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, bazı bitki türleri de savunma olarak kök dokularında hücre duvar kalınlaşmaları göstermiştir (Degenhardt ve Gimmler, 2000).

Bitkiler, stres faktörlerinin olumsuz etkilerini azaltmak yada engelleyebilmek için moleküler savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu savunma mekanizmaları (a) makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, (b) koruyucu moleküllerin sentezi, (c) reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve detoksifikasyon olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Makromoleküllerin homeostasisi bitkilerin dehidrasyona karşı oluşturduğu temel cevap mekanizlarından biridir. İyon homeostasisi, su iletimi ve iyon dengesinin düzenlenmesinde etkin olan akuaporinlerin ve iyon taşıma sistemlerinin kontrolü ile sağlanmaktadır. Strese karşı verilen moleküler cevaplardan diğeri ise düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler), ısı şoku proteinleri (Heat-Shock Proteins, HSPs) ve geç embriyogenez bağımlı proteinler (Late Embryogenesis Abundants; LEAs) gibi koruyucu moleküllerin sentezine dayanmaktadır. Isı şoku proteinleri, hasarlı ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin hücreden uzaklaştırılması gibi birçok olayda rol oynamaktadır ve farklı stres koşullarını tolere etmek için sentezlenen moleküler şaperonlardır. Strese karşı verilen moleküler cevaplardan sonuncusu ise strese maruz kalmış bitkide ROS sentezi ve detoksifikasyonundan sorumlu enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların oluşumudur (Büyük vd., 2012).

Bitkilerde ROS'ların olası birçok kaynağı vardır. ROS bitkilerde fotosentez ve solunum gibi normal metabolizma ile ilişkili reaksiyonlarda üretilebildiği gibi stres koşulları altında da üretilmektedir (Mittler, 2002; Mittler vd., 2004). ROS'lar radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron katılmasıyla oluşmaktadır. ROS'lar atmosferdeki oksijenin (O_2) kısmen indirgenmiş halidir. Hücrede, singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) formlarında dengeli durumda bulunmaktadır (Mittler vd., 2004).

Hücrede ROS miktarı arttığında antioksidan savunma sistemleri ve ROS üretimi arasındaki denge bozulmakta ve bitki oksidatif strese girmektedir. ROS miktarı arttığında lipit peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, nükleik asit hasarı, enzim inhibisyonu gibi hasarlar oluşmakta ve hücre ölümüne kadar gidebilmektedir (Büyük vd., 2012). Bitkilerde stres koşulları altındaki bitkilerde ROS miktarı normal koşullar altında olan bir bitkiye oranla 3-10 kat artış göstermektedir (Breusegem ve Dat, 2006). Bitkilerin başlıca ROS formlarını ile savaşan enzimleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksin (PrxR)'dir (Mittler,

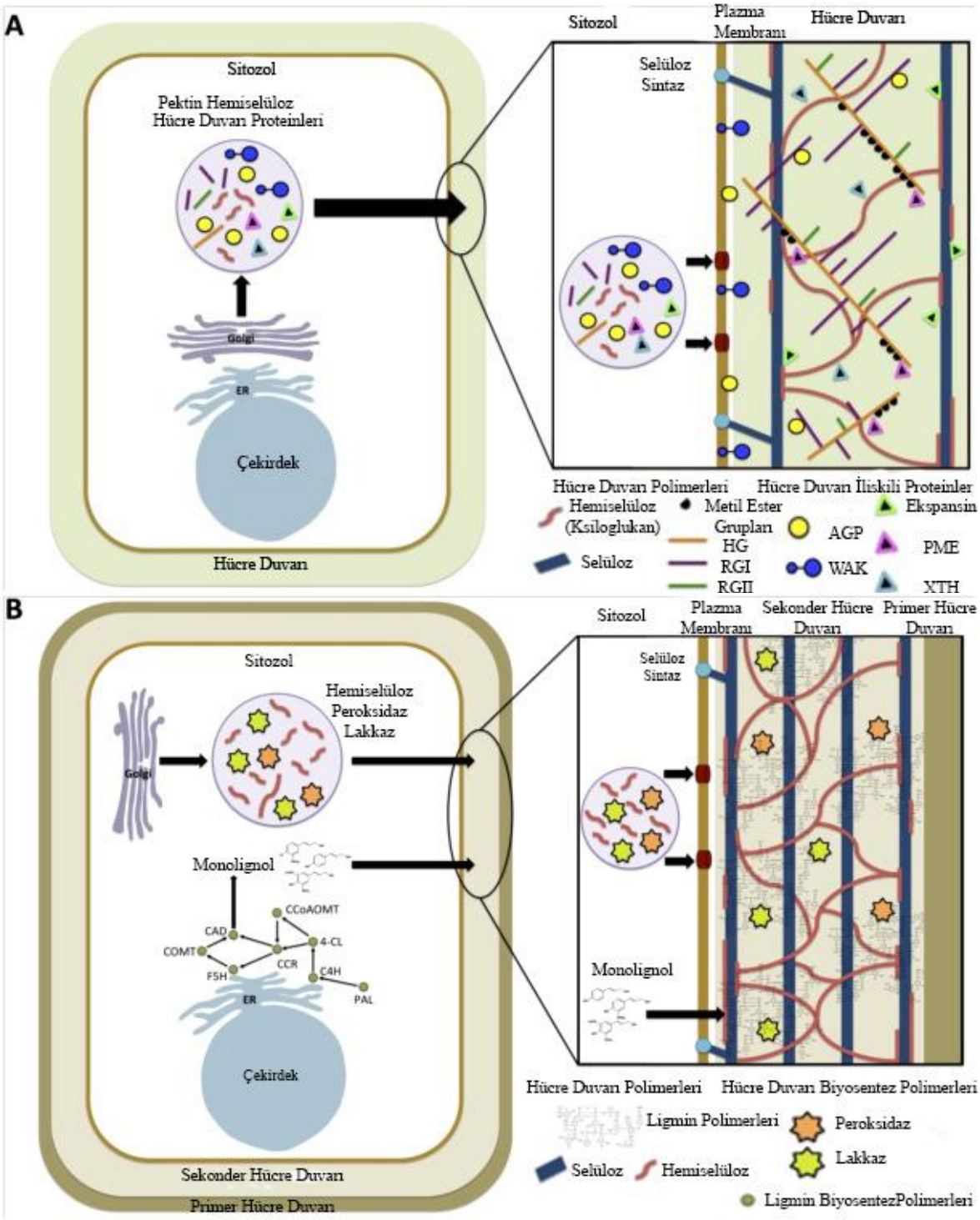
2002; Mittler vd., 2004). Hücrelerde SOD ve CAT veya APX enzim aktiviteleri arasındaki denge, süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksitin kararlı haldeki seviyelerinin belirlenmesinde çok önemlidir (Mittler vd., 2004). Hücre ROS temizlenmesinden sorumlu olan bu enzimler *A.thaliana* genomunda en az 73 gen tarafından kodlanmaktadır ve sitozol, vakuol, apoplast veya hücre duvarında bulunmaktadır (Mittler, 2002).

Stresin hücre duvarı biyosentez metabolizması üzerine etkisi fizyolojik, transkriptomik, proteomik ve biyokimyasal olarak tartışılmaktadır. Stresin genel etkileri bitki türüne, genotipine, yaşına, strese maruz kalma süresi ve stresin yoğunluğuna bağlıdır. Bu durum hücre duvarının strese tepkisini açıklamayı zorlaştırsa da iki ana mekanizma önerilmiştir. Birincisi primer hücre duvar plastisitesini sağlayan RG-I'in dallanma derecesindeki artış ile ilişkili olarak ksiloglukan endotransglukosilaz / hidrolaz (XTH) ve expansin miktarında artma meydana gelmektedir. İkincisi ise hemiselüloz ve lignin birikimiyle sekonder hücre duvarının kalınlaşmasıdır (Gall vd., 2015).

Normal koşullar altında büyüyen bir bitki hücresinde primer hücre duvarı polimerlerinin biyosentezi hücre içinde farklı yerlerde gerçekleşmektedir. Hücre duvarı biyosentezi sırasında hemiselüloz ve pektin, golgi aygıtında sentezlenerek apoplastik boşluğa salınırken, selüloz sentezi direk plazma zarında meydana gelmektedir. Duvar bileşenlerinin organizasyonu apoplastta koordine edilmekte ve duvar uzaması sırasında yeniden düzenlemektedir. Normal olmayan çevre koşulları altında bitki hücresinin büyümesi sırasında primer hücre duvarı bileşimi değişmektedir. Çeşitli abiyotik stres faktörleri primer hücre duvarının selüloz, hemiselüloz ve pektin içeriğini değiştirmektedir. Stres koşulları altında tolerant türlerde primer hücre duvarında selüloz ve ksiloglukan biyosentezi meydana gelmektedir. Bu durum *EXP* (ekspansin) ve *XTH* (ksiloglukan endo β-transglukosilaz/hidrolaz) kodlayan genlerin ekspresyonlarının artması ile ilişkilendirilmektedir. Paralel olarak, arabinan ve/veya galaktan yan zincirleriyle zenginleştirilmiş Rhamnogalakturonan-I (RG-I) seviyesi de artmaktadır. Hücre duvarı yapısına katılması için homogalakturonanın (HG) metil esterifikasyonu seviyesi PME aktivitesiyle azalmaktadır. Strese karşı primer hücre duvarında meydana gelen bu değişiklikler hücre uzamasını nispeten devam ettirmektedir. Stres şartlarına duyarlı olan türlerde ise polisakkarit içeriğinde azalma, hücre duvar hidrolazlarında (Endo-(1,4)-β-D-glucanases, EGase) artış, bununla birlikte hücre duvarı biyosentezinde ve yeniden şekillendirme enzimlerinde (PME, PG, SuSy) azalmaya bağlı olarak hücre duvarında

degredasyon gözlenmektedir. Abiyotik stres ayrıca, hücre uzaması ve gelişimi için gerekli olan duvara ilişkili kinazları (Cell wall-associated kinases, WAKs) da değiştirebilmektedir. Abiyotik strese karşı toleransa sahip bitkilerde, WAK kodlayan genlerin ifadesi artmaktadır, bu durum salınan bitki hücre duvarı parçalarının saptanması yoluyla hücre duvarı/plazma membranı arayüzünde stres algısını göstermektedir. Arabinogalaktan protein (AGP), prolin açısından zengin protein (Proline Rich Protein, PRP) ve glisin açısından zengin protein (Glisine Rich Protein, GRP) de dahil olmak üzere diğer hücre duvarı proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonları, abiyotik strese tepki olarak indüklenmekte, pektin veya hemiselüloz ile kovalent olarak bağlanarak duvarın güçlenmesine katkıda bulunmaktadırlar (Şekil 9A) (Gall vd., 2015).

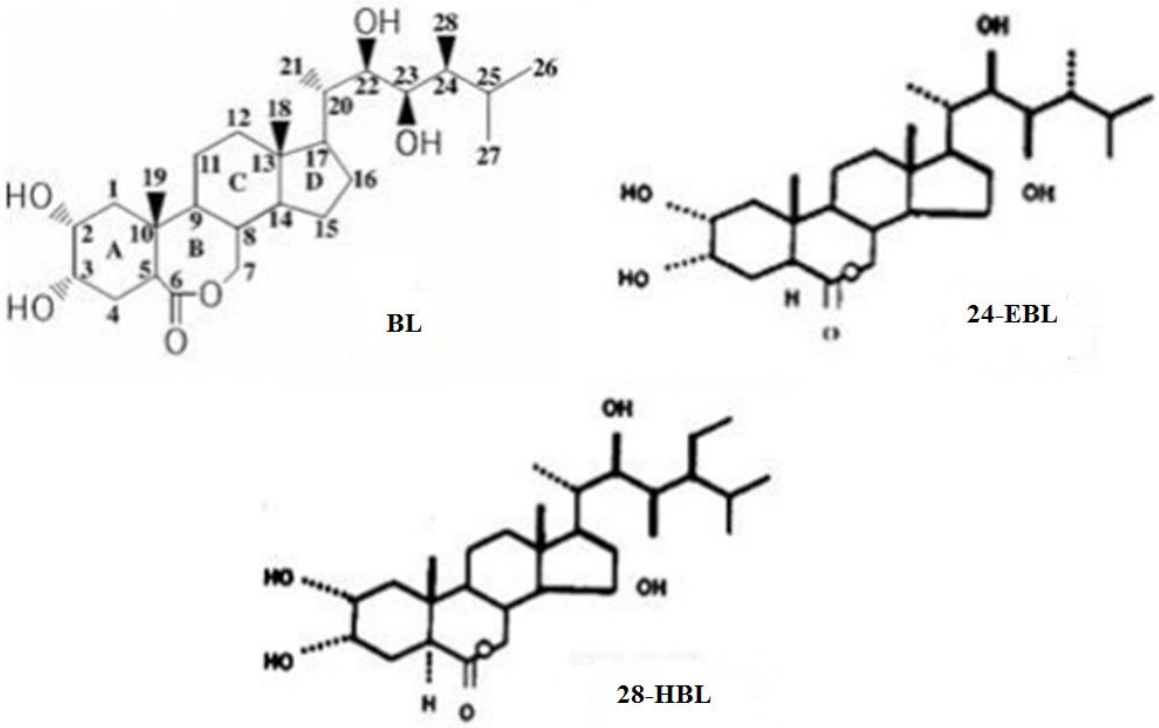
Abiyotik stres faktörlerine karşı koyabilmek için bazı bitkiler, hemiselüloz ve selüloz sentezi ile sekonder hücre duvarı kalınlaşmasını arttıran stratejiler uygulamaktadır. Sekonder hücre duvarı kalınlaşması lignin birikimiyle ilgilidir. Lignin yapı taşları olan monolignoller, fenilpropanoid ve monolignole spesifik yolaklar ile fenilalaninden sentezlenir. Monolignol biyosentezi gerçekleştirilen bu yolakta fenilalanin amonyak-liyaz (PAL), 4 koumarat CoA-ligaz (4CL), sinnamoil-CoA redüktaz (CCR), kafeinat O-metil transferaz (COMT) ve kafeoil-CoA 3-O-metil transferaz'ı CCoAOMT) içeren sitosolik enzimleriyle birlikte endoplazmik retikulum (ER9 membranına bağlı trans-sinnamat 4-hidroksilaz (C4H) ve ferulat 5-hidroksilaz (F5H) enzim aktiviteleri gerekmektedir. Monolignoller sentezlendikten sonra hücre duvarına taşınmakta ve burada apoplastik peroksidaz (PRX) ve lakkaz enzimleri tarafından lignine polimerize edilmektedir (Şekil 9B). Stres koşullarında bu mekanizma ile hücre duvarı genişlemesi ve hücre uzaması azalmakta, böylelikle su kaybı ve dehidrasyona bağlı hücre çöküşünü önlenebilmektedir (Gall vd., 2015).



Şekil 9: Abiyotik strese karşı bitki hücresi duvar mekanizmasındaki değişimleri gösteren model. A: Abiyotik stres faktörlerine maruz kalan bitkide primer hücre duvarı (PCW) dinamiklerinin anahtar noktaları göstermektedir. B: Abiyotik strese maruz kalan bitkide sekonder hücre duvarının (SCW) anahtar noktaları gösterilmektedir (Gall vd., 2015).

1.4 Brassinosteroidler: Genel Etkileri, Sinyalizasyonu ve Hücre Duvarı Üzerine Etkileri

Bitki büyüme hormonlarının yeni bir sınıfı olan brassinosteroidler (BR'ler), yapısal olarak hayvan ve böcek steroid hormonlarına benzeyen bitki steroidlerinin spesifik bir grubudur (Kagale vd., 2007; Xie vd., 2011). BR'ler kolestanın hidroksile edilmiş türevleridir ve sahip olduğu yan zincir uzunluğuna göre, C27, C28 ve C29 olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. BR'lerin aktif formları olan brassinolid (BL), 24-epibrassinolid (EBL) ve 28-homobrassinolid (HBL) çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 10). BR'ler bitkinin büyüyen kısımlarında sentezlenmekte, ancak polen, tohum, kök, gövde, yaprak ve çiçek gibi kısımlarında bulunmaktadır. Bununla birlikte bitki kısımları arasında BR seviyesi farklılık gösterebilmektedir (Surgun vd., 2012).

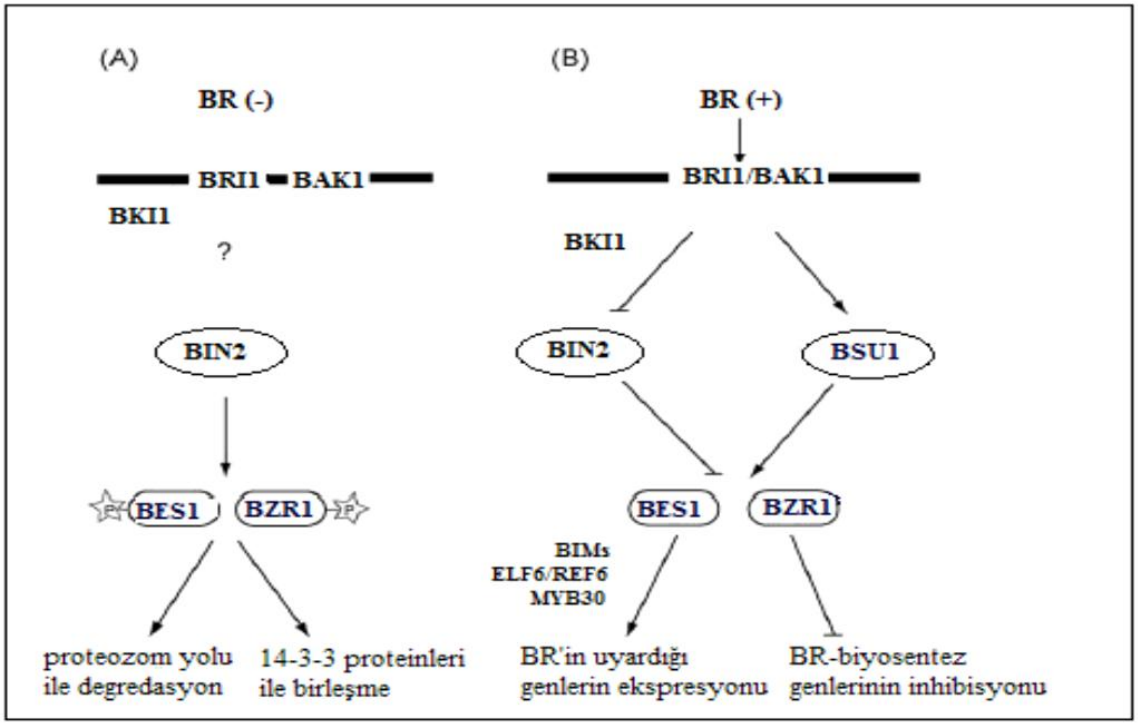


Şekil 10: Brassinosteroidlerin yaygın kullanılan formları. Brassinolid (BL), 24-Epibrassinolid (EBL) ve 28-Homobrassinolid (HBL)'in kimyasal yapısı (Surgun vd., 2012).

BR'ler bitkide çeşitli gelişimsel ve fizyolojik olayların düzenlenmesinde yer almaktadır. Düşük miktarlarda dahi etkin olabilen BR'ler, hücre bölünmesi, genişlemesi ve uzaması, hücre duvarı rejenerasyonu, reproduktif organ gelişimi, tohum çimlenmesi, yaprak

senesensi, vasküler farklılaşma, ksilem farklılaşması, polen tüpü oluşumu, biyokütle ve verim artışı gibi büyüme ve gelişim süreçlerinde düzenleyici olarak rol oynamaktadır (Kagale vd., 2007; Surgun vd., 2012; Yusuf vd., 2017). Bitki büyüme ve gelişmesindeki önemli rollerinin yanı sıra BR'ler düşük ve yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metal, patojen saldırısı gibi çeşitli stres faktörlerine karşı bitkinin adaptasyonunu sağlayarak bitkiyi korumaktadır (Kagale vd., 2007; Surgun vd., 2012; Gökdoğan ve Bürün, 2015a; Yusuf vd., 2017). Stres koşulları altında bitki toleransını ve tarımsal verimliliği artırmak için tohuma uygulama, yapraktan spreyleme ve besin ortamına ilave şeklinde BR uygulamaları yapılmaktadır (Gökdoğan ve Bürün, 2015b).

BR'ler plazma membranında BRI1-ilgili reseptör kinaz1 (BAK1) çekirdeği ile dimer halde bulunan lösin bakımından zengin (leucine-rich repeat-LRRs) reseptör kinaz benzeri (receptor-like kinase-RLK) Brassinosteroid Insensitive1 (BRI1) tarafından algılanmakta ve bir dizi genin düzenlemesiyle sonuçlanan sinyal iletim yolağı başlamaktadır (Belkhadir ve Chory, 2006; Surgun vd., 2012; Krishna vd., 2017). BRI1 ve BAK1'in kinaz aktivitesine sahip bölgeleri bir seri transfosforilasyona girer. BRI1 ile aktif hale gelen sinyal yolağında negatif regülatör Brassinosterois Insensitive2 (BIN2) inaktif hale gelirken BRI1-ethyl methanefulsonate-suppressor1 (BES1) ve Brassinazole Resistant1 (BZR1) aktif hale gelmektedir. Aktif haldeki BZR1, BR-biyosentez genlerini inhibe ederek hücrede sentezi durdurmakta, aktif haldeki BES1 ise diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve BR tarafından uyarılan hedef genlerinin ekspresyonunu tetiklemektedir. Ortamda BR yoklunda BIN2 aktif hale gelir ve BZR1 ve BES1'i inaktif hale getirir (Xie vd., 2011; Surgun vd., 2012; Krishna vd., 2017). Şekil 11'de ortamda BR varlığında ve BR yokluğunda aktifleşen sinyalizasyon mekanizması gösterilmektedir.

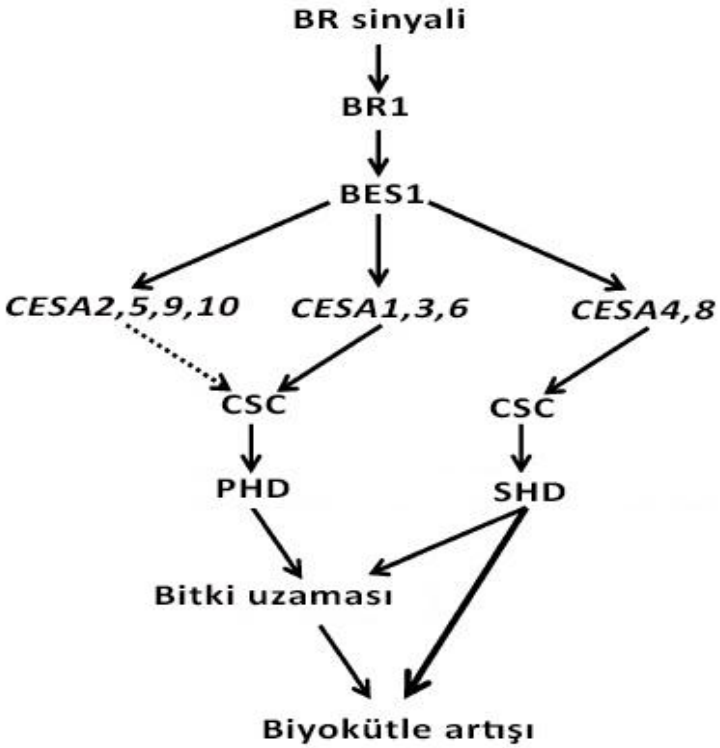


Şekil 11: BR varlığında veya yokluğunda basitleşitirilmiş BR sinyal yolakları. A: BR yokluğunda "BR(-)" ve (B) BR varlığında "BR (+)" BR sinyalizasyonu (Surgun vd., 2012).

Bitkide BR'ler tüm dokularda sentezlenerek, sentezlendikleri bölgede lokal olarak rol almaktadır. Bununla birlikte ekzojen olarak uygulanan BR hormonu kökten alınarak gövdeye ve yaprağa hızlı bir şekilde taşınmaktadır (Surgun vd., 2012). *A.thaliana*'da brasinosteroidlerin biyosentezi ve hormonun hücre yüzeyinde algılanmasıyla ilgili yapılan mutasyonlar sonucunda küçük yapraklar ve bodur sürgünlerle birlikte cüce bitkiler elde edilmiştir (Nakaya vd., 2002). *Arabidopsis* BR-sentezlemeyen veya BR-duyarsız mutant bitkiler ile yabani tipteki bitkiler karşılaştırıldığında hücre duvarı selüloz içeriğinin mutant bitkilerde daha az olduğu tespit edilmiş ve BR'lerin *CESA* genlerinin ekspresyonunu düzenlediği ortaya koyulmuştur (Xie vd., 2011). Ayrıca BR-sentezlemeyen *Arabidopsis* mutantlarında hücre duvarı gevşeme mekanizmasında rol oynayan XET fonksiyonu tanımlanan *TCH4* geninin mRNA seviyesinin yabani tip bitkilere nazaran düşük olduğu görülmüştür (Catterou vd., 2001).

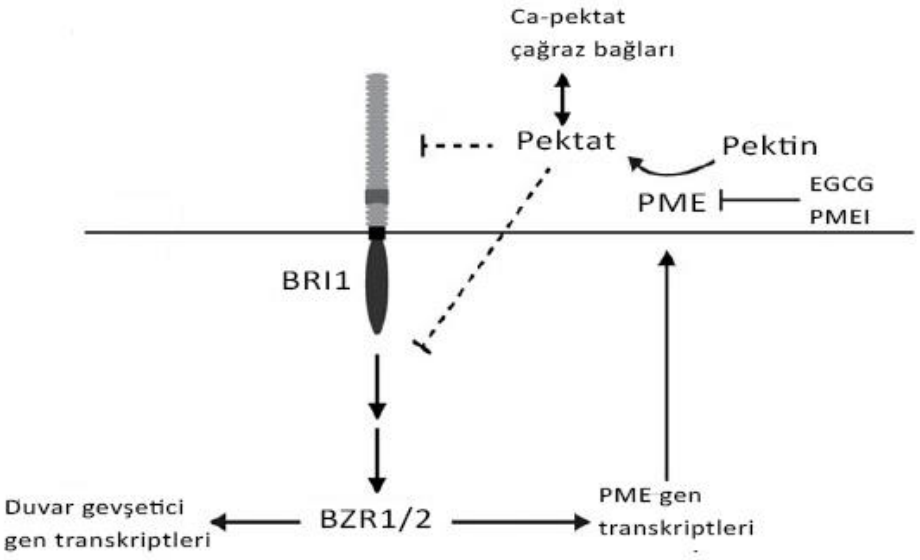
BR'lerin bitki büyümesini nasıl kontrol ettiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Fakat hücre uzaması ve genişlemesi sırasında yeni hücre duvarı polimerlerinin sentezlenmesi gerekmektedir. Bitki büyümesinde BR'lerin bazı *CESA* genlerinin ifadesini düzenlediği tespit edilmiştir. BR sinyalinin algılanmasıyla BES1 transkripsiyon faktörü aktif hale

gelmektedir. Primer hücre duvarı büyümesi sırasında *CESA1, CESA3* ve *CESA6* genlerinin promotör bölgelerini uyararak ekspresyonlarını artırmakta ve selüloz biyosentezini teşvik etmektedir. Ayrıca BR'ler ışıkta *CESA6*'nın işlevini kısmen yerine getirerek cüce fenotipin oluşmasını önleyen *CESA2, CESA5, CESA9* ve/veya *CESA10* genlerinin ekspresyonlarını artırırarak primer hücre duvarı sentezini gerçekleştirmektedir. Sekonder hücre duvarı büyümesi sırasında ise BR'ler *CESA4* ve *CESA8* genlerinin ekspresyonlarını teşvik etmektedir. Özetle, ortamda BR olduğu zaman oluşan sinyal ile primer ve sekonder hücre duvarı biyosentezinde rol oynaran *CESA* genlerinin ifadesi düzenlenmektedir (Şekil 12) (Xie vd., 2011).



Şekil 12: Bitki büyümesinde BR tarafından regüle edilen CESA genlerinin modellenmiş açıklaması. BR sinyalizasyonu BES1 transkripsiyon faktörleri aktif etmekte ve BES1'in *CESA1, CESA3* ve *CESA6*'nın promotor bölgesindeki E-box'lara bağlanmasını teşvik ederek birincil gelişmesi (primary growth) boyunca ekspresyolarını arttırmaktadır. BES1 ayrıca ikincil gelişim (sekondary growth) için *CESA4* ve *CESA8* ekspresyonlarını da arttırmaktadır. CESA genleri hücre uzamasında hücrelerin mimarisini sürdürmek için daha fazla selüloz sağlar. BR sinyalleşmesi kısmen *CESA6*'nın fonksiyonu yerine geçen *CESA2, CESA5, CESA9* ve *CESA10* genlerinin ekspresyonları da regüle etmekte ve *pcr1-1* cüce fenotipini de kurtarmaktadır. PHD: Primer hücre duvarı, SHD: Sekonder Hücre duvarı, CSC: Selüloz sintaz kompleksi (Xie vd., 2011).

Büyüme üzerinde etkili olan BR hormonunun hücre duvarı biyosentezindeki diğer bir görevi de pektin bağımlı hücre homeostasisini sağlamaktır. Pektinler, pektin metil esteraz enzimi (PME) tarafından modifiye edilebilen kompleks hücre duvarı polimerleridir. Bitkilerde PME aktivitesiyle ilgili yapılan genetik çalışmalar ile BR sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda büyüme davranışında belirgin değişiklikler meydana getirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Büyüyen hücrelerde hücre duvarının bütünlüğü, önce hücre duvarı gevşemesini (Ca^{+2} / pektat çapraz bağlarının uzaklaştırılması gibi) ve sonrada duvar sertliğini (yeni Ca^{+2} / pektat çapraz bağların üretilmesi gibi) sağlayan süreçler arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Pektin, pektin metil esteraz enzimleriyle esterlenerek yüksek metil esterlenmiş formda duvarda çökelir. Bu işlem endojen pektin metilesteraz inhibitörleri (PMEI) ve kimyasal inhibitör olan katekin türevi (-) - epigallokatekin gallate (Catechin-derivative (-)-epigallocatechin gallate, EGCG) tarafından engellenebilir. PME aktivitesinin inhibe edilmesi sonucunda tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizma ile BRI1 reseptörü ve/veya bir downstream BR sinyal bileşeni aktiyasyonu sağlanmaktadır. Sonucunda da hücre duvarı modifiye edici PME genlerinin transkripsiyon artış meydana gelmektedir (Şekil 13). Bitkilerin sahip olduğu bu mekanizma ile farklı ortamlarda normal büyüme sürecinde hücre duvarının mekanik homeostasisi kontrol edilebilmektedir (Wolf vd., 2012).



Şekil 13: Bitki hücre duvarı homeostasisinde brasinosteroid feedback sinyali aracılık etmektedir (Wolf vd., 2012).

1.5 Literatür Özetleri

Richard vd. (1994) hücre duvarında meydana gelen pektin değişikliklerini açıklayabilmek için *PME* genlerini araştırmışlardır. Bu amaçla diğer bitkilerle sekans benzerliği gösteren *A. thaliana* cDNA kütüphanesinden 1970 bp uzunluğunda ve 64,1 kDa'lık protein kodlayan AtPME1 dizisini izole etmişlerdir. Bitki dokularına spesifik olarak göre yapılan Nothern blot analizleri sonucu AtPME1'in genç yaprak ve tomurcuklarda mRNA seviyesinin yüksek, rozet yapraklar, sap ve gövde yapraklarında düşük, kökte ise neredeyse saptanamayacak düzeyde olduğu bulunmuştur. Ayrıca izoelektrofokus analizleri üç PME1 izoformunun olduğunu, bunlardan 4,9 ve 9,1 pI değerine sahip olanların kökte, 5,7 pI değerine sahip diğer izoformun ise çiçeklenme dönemiinde yüsek seviyede bulunduğunu göstermiştir.

Hu vd. (1996) bor elementinin hücre duvarı ile ilişkisini açıklamak amacıyla *A.thaliana* bitkisine ait yaprak örneklerinde bor ve hücre duvarı bileşenlerini analiz etmişlerdir. Borun farklı konsantrasyonlarında hücre duvarında bulunan üronik asit, ramnoz ve galaktoz miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, hücre duvarında bulunan pektin konsantrasyonunun dokunun bor ihtiyacına ve bor eksikliğine göre değiştiği sonucuna ulaşmışlardır.

Catterou vd. (2001) yaptıkları çalışmada hücre uzamasınında mikrotübül organizasyonunu aydınlatmak için yabanil tip *A.thaliana* ile uzama bölgesi baskılanan *bul1-1* mutantını karşılaştırmışlardır. İndirekt immunofloresan analizi ile mutant bitkilerde çok az sayıda α-tubulin olduğu gözlenmiştir. BR uygulamasından sonra mutant *bul1*-1 bitkilerinde miktotübül organizasyonun yeniden etkin olduğunu tespit edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada Nakaya vd. (2002) *A.thaliana* yabanıl tip ile brassinosteroid *det2* ve *dwf1* mutantlarını yaprak genişlemesini ve hücre sayısını karşılaştırmışlardır. Mutant bitkilerde yaprak genişlemesinin daha erken bittiği ve yaprak başına daha az hücre düştüğünü ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, ekzojen BR uygulamasının *det2* mutantlarında yaprak büyüklüğünün restore ettiğini rapor etmişlerdir.

Wolf vd. (2003) tarafından *A.thaliana* polenlerinde ifade edilen pektin metil esteraz inhibitörlerinin tanımlanması hedeflenmiş ve yapılan çalışmada iki pektin metil esteraz

inhibitörünün (AtPMEI1 ve AtPMEI2) analizi yapılmıştır. Rekombinant AtPMEI1 ve AtPMEI2 proteinlerinin fonksiyon analizleri sonucunda her iki proteinin de PME aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Real-time PCR ile AtPMEI1 ve AtPMEI2 genlerine ait mRNA'ların bitki gelişim sürecinde çiçeklerde yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği ortaya konulmuştur.

Hamann vd. (2004) yaptıkları çalışmada *A.thaliana*'da *CESA* ve *CSL* genlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla Affymetrix gen çipi kullanarak 10 *CESA* ve 29 *CSL* geninin farklı büyüme dönemlerinde ve organlardaki ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda birçok genin çeşitli organlarda farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bazı *CESA* genlerinin incelenen tüm dokularda yüksek düzeyde ekspresyon gösterirken, çok az sayıdaki *CSL* geninde benzer sonuç ile karşılaşılmışlardır. Genlere ait ekspresyon verilerinden yola çıkarak primer ve sekonder hücre duvarı oluşumunda *CESA* genlerinin çok önemli olduğu, *CSL* genlerinin ise daha küçük duvar bileşenlerini sentezlemek için gerekli enzimleri kodladıkları ya da belirli hücre tiplerinde eksprese edildikleri sonucuna ulaşmışlardır.

Raiola vd. (2004), yaptıkları çalışmada *A. thaliana*'da pektin metil esteraz inhibitörü kodlayan 2 geni (AtPMEI-1 ve AtPMEI-2) tanımlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Bu iki proteinin kivi meyvesinin hücre duvarındaki pektin metilesteraz inhibitörleri ile benzer özelliklere sahip olduğunu ve bitki kaynaklı metil esteraz enzimlerini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.

Kwon vd. (2005), *A.thaliana*'da hücre duvarı oluşum mekanizmasını açıklamak amacıyla protoplast hücre kültüründe hücre duvarı rejenerasyonu süresince hücre duvarı boşluğuna salgılanan proteinleri analiz etmişlerdir. Araştırıcılar, 2 boyutlu jel elektroforezi (2-D PAGE) ve matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi (MALDI-TOF / MS) yöntemleriyle hücre duvarı oluşumu ve genişlemesi boyunca post translasyonel modifikasyonlardan sorumlu çok sayıda protein varlığını ortaya koymuşlardır.

Feiz vd. (2006), yüksek oranda hücre duvarı proteini elde etmek ve tanımlamak için birkaç hücre duvarı izolasyon yöntemlerimini değerlendirmiş ve yeni modifiye bir izolasyon protokolü ortaya koymuşlardır. Yeni protokolü *A. thaliana* hipokotilleri üzerinden geliştirmişler ve tuz ekstraksiyonundan sonra diğer prosedürlere oranla daha çok protein

elde edildiği, deterjan uygulamasıyla da hücresel proteinlerin uzaklaştırıldığı sonucuna ulaşmışlardır.

Wieczorek vd. (2006) çalışmalarında *Arabidopsis* köklerinde parazitler tarafından sinsityum oluşturulurken ekspansin gen ailesi üyelerinin nasıl etkilendiğini araştırmak amacıyla 26 *EXPA* ve 3 *EXPB* geninin cDNA kütüphanesinden farklı primerler kullanarak sinsityumların transkriptlerini incelemişlerdir. Sinsityum oluşumu sırasında hücre duvarı büyümesi ve hücre duvarı ayrışımında ekspansin genlerinin ihtiyaca göre spesifik olarak düzenlendiği ortaya koyulmuştur.

Persson vd. (2007) yaptıkları çalışmada *A.thaliana'da* hücre duvarında selüloz birikiminde *CESA* genlerinin etkisini ortaya koymaya çalışmışlardır. *CESA* gen ailesinin farklı genlerinde meydana gelen mutasyonları değerlendirdiklerinde ölümcül sonuçlarla karşılaşmışlardır. Çalışma sonucunda, *CESA1, CESA3* ve *CESA6* genlerinin mutlak gerekliliğini ortaya koyulmuştur.

Liu vd. (2007) yaptıkları çalışmada *Arabidopsis* te *XTH21* geninin işlev kaybı olan mutant hatlarından yararlanmışlardır. Analizler sonucu, *AtXTH21* geninin ksiloglukan ağırlığını ve selüloz depolanmasını değiştirerek hücre duvarı uzamasını etkilediğini, bunun sonucunda da kök büyümesinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir.

Kasajima ve Fujiwara (2007), yüksek bor konsantrasyonuna maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde transkriptom analizi ile ekspresyonu değişen genleri tespit etmişlerdir. Bu genlerden iki tanesine ait transkipt kökte [At1g03770 (transkripsiyon faktör) ve At5g57340] fazla miktarda bulunurken yedi tanesinin ise yaprakta (At2g04040, At2g04050, At2g04070, At1g32870,At5g51440, At2g21640) fazla miktarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Camacho-Cristobal vd. (2008a) yaptıkları çalışmada *A.thaliana* köklerinde bor eksikliğinin hücre duvarı genlerinin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla 2 μM B içeren hidroponik ortamda yetiştirdikleri bitkileri daha sonra 6 ve 24 saat bor bulunmayan ortama aktarmışlardır. Transkriptom analizi sonucunda B eksikliğinin hücre duvarı ile ilgili birkaç genin (arabinogalaktan proteini, ksiloglukan endotransglikozozaz / hidrolaz,

poligalakturaz, pektat liyaz, pektin metilesteraz, selüloz sintaz benzeri genler ve ekspansin gen ailelerine ait genler) ekspresyonunu azalttığını tespit etmişlerdir.

Peaucelle vd. (2008), *A. thaliana*'nın meristem dokusununda pektin metilesteraz (PME) enzim aktivitesini incelemişlerdir. Hücre duvarı yapısı ve işlevlerini modüle eden PME enziminin hücre duvarındaki pektik polisakkaritlerin de-metil esterefikasyonuyla *Arabidopsis* sürgün apikal meristemine eşlik eden çiçek primordiyasının oluşumunda rol aldığını ortaya koymuşlardır.

Park vd. (2009) *A.thaliana'da AtEXPA5* geninin BR hormonunun hedef geni olma ihtimalini araştırmışlardır. Ekzojen olarak brassinosteroid hormonu uygulandığında *A.thaliana*'nın toprak üstü kısımları, özellikle çiçek sapı ve çiçeklerinde ağırlı olarak ifade edilen *AtEXPA5* geninin, ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. *AtEXPA5* geninin ekspresyonu BR-sentezlemeyen (*det2)* ve BR-duyarsız (*bri1-301*) mutantlarında azalırken, BR dominant mutantı *bzr1-1D'*de ise ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Çift mutasyona sahip olan *bzr1-1D*expA5-1* mutantı ise *bzr1-1D* mutantına kıyasla daha az oranda büyüme göstermiştir. Ayrıca *bzr1-1D* mutantının brassinazole karşı olan direnci *bzr1-1D*expA5-1* mutantında ortadan kalkmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile *AtEXPA5* geninin brassinosteroid sinyaliyle kontrol edilen büyüme düzenleyici bir gen olduğunu ispatlamışlardır.

Zhang vd. (2010) çalışmalarında *Arabidopsis'*te stoma açılmasında ekspansin geni olan *AtEXPA1*'in etkisini ortaya koymuşlardır. *AtEXPA1* geninin over-ekspresyonu ile stoma açılması hızlanmıştır. *AtEXPA1* transgenik hatlarının stoma hücrelerinin, yabanıl tip bitkilerden daha düşük hacimsel elastik modüle sahip olduğu sonucuyla karşılaşmışlardır.

Xie vd. (2011) yaptıkları çalışmada *Arabidopsis*'te BR mutantları ile yabanıl tip bitkilerin selüloz içeriklerini ve *CESA* genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemişlerdir. Yaptıkları kromatin immünopresipitasyon deneyleri ve genetik analizler sonucu BR'lerin bazı CESA genlerinin eksresyonunu düzenlediğini tespit etmişlerdir.

Wei vd. (2011) normal şartlar altında yetiştirdikleri yabanıl tip *A.thaliana* bitkisinde bekçi hücrelerini araştırmakta ve stomal açıklığın *AtEXPA1* tarafından düzenlendiğini ortaya koymuşlardır. Bitkide terleme ve fotosentez oranında artış meydana geldiği zaman bitki

kuraklık toleransını artırmak için ekspansin tarafından düzenlenen stomal açıklığın modifiye edilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Singh vd. (2011) yaptıkları çalışmada bir gül çeşidi olan *Rosa bourboniana* bitkisinde yaprak ve meyve dökülmesine sürecinde etilen ilişkili *RbXTH1* ve *RbXTH2* genlerinin ekspresyonlarını araştırmışlardır. Farklı dozlarda ve sürede etilene maruz kalan bitkilerde Real-Time PCR yöntemiyle *RbXTH1* ve *RbXTH2* ekspresyon seviyelerini karşılaştırdıklarında absisyon işlemi başladıktan kısa süre sonra genlerin ekspresyonunun hızla arttığı ve bununla birlikte etilen muamele edilen bitkilerde transkripsiyonlarının daha hızlı arttığı sonucuna ulaşmışlardır. Etilene maruz kalan bitkilerde *RbXTH1* geninin ekspresyonu dokuya spesifik olarak düzenlenirken *RbXTH2* geninin ekspresyonunun dokudan bağımsız olduğu ortaya koyulmuştur. Elde edilen sonuçlar *XTH*'ların *XET* aktivitesiyle ksiloglukanları hücre duvarında yeniden biçinlendirerek absisyon sürecinde hücre bölünmesi için önemli olduğunu göstermektedir.

Liu vd. (2014) çalışmalarında farklı miktarlarda bor uyguladıkları portakal bitkilerini kimyasal ve enstrumental analizlerle (XPS ve FTIR) araştırmışlardır. Borun yetersiz/eksik olduğu ortamda yetişen bitkilerde yapraklarda kıvrılma ve sadece yaprağın üst yüzeyinde klorozis görülmüştür. Bor eksikliğinde yaprağın hem üst hem de alt yüzeyinde hemiselüloz ve selüloz konsantrasyonları artarken kovalent bağlı pektin miktarının önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır.

Surgun vd. (2016a) bor toksisitesine maruz bırakılan *A.thaliana*'da ekzojen uygulanan EBL'nin bor akümülasyonu, antioksidan sistem ve büyüme üzerine etkisini araştırmışlar ve EBL'in borun toksik etkilerini kısmen iyileştirdiğini tespit etmişlerdir. 0.80 ve 1.60 μM borik asit ile muamele ettikleri fidelerin yapraklarına spreyleme tekniği ile EBL (0.01 ve 1 μM) uyguladıklarında pigment (klorofil ve karotenoid) içeriğinde ve büyümede artış saptamışlardır. Bor toksisitesi altında antioksidan enzim aktivitesi ve prolin içeriği artmıştır. EBL uygulaması sonrası ise antioksidan enzim aktivitesinin ve prolin içeriğinin daha da arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bor toksisitesinde bitkilerde gözlenen yüksek lipid peroksidasyonunda EBL uygulaması sonrası azalma meydana gelmiştir.

Surgun vd. (2016b) diğer bir çalışmalarında *A.thaliana'*da yüksek konsantrasyondaki borun neden olduğu stres üzerine EBL'in etkilerini transkripsiyonel düzeyde

araştırmışlardır. Bu amaçla yüksek konsantrasyonda borik asit ile maruz bırakılan bitkilere ekzojen olarak EBL uygulamışlar ve bor taşıyıcı genlerin (*BOR1-4*), yüksek bor ile indüklenen genlerin (*MATE, Hsp-benzeri*), BR ile indüklenen genlerin (*Hsp70-4, Hsp90-1*) ve diğer stresler ile ilişkili *(LTI/COR78, LEA4-5*) genlerin ekspresyonlarını semi-kantitatif RT-PCR ile araştırmışlardır. BA uygulaması yaprak ve kök dokularında *BOR1 ve BOR3* gen ekspresyonlarını azaltmış ve yüksek konsantrasyonda EBL uygulaması kök dokularında bu genlerin eksprsyonlarını daha da azaltmıştır. Yüksek bor toksisitesi altındaki fidelerde 1 μM EBL uygulaması her iki dokuda *MATE* ve *Hsp-benzeri* genlerin ekspresyonlarını artırmıştır. EBL'nin yüksek konsantrasyonunun, kökte *LTI / COR78* geninin ekspresyonunu arttırmış ve yaprak dokusunda *LEA4-5* geninde daha etkili olduğu bulunmuştur. Araştırma sonucunda ekzojen EBL uygulamasının *Arabidopsis thaliana'da* yüksek konsantrasyonda bor şartlarında stres yanıtlarını moleküler düzeyde etkilediğini rapor etmişlerdir.

BÖLÜM 2

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan yabanıl tip *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Columbia *(Col 0)* tohumları Belçika Antwerp Üniversitesi, Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. *Arabidopsis thaliana,* 20-25 cm boya kadar büyüyebilen, tek yıllık otsu bir bitkidir. 2000 yılında DNA dizilemesi tamamlanan üçüncü canlı ve ilk bitki olan *A.thaliana* 2n=10 kromozomunda 25000 dolayında gen içermektedir (Kaul vd., 2000; Meinke vd., 1998). *A.thaliana* L. Heynh bitkisine ait sistematik bilgiler Tablo 1'de verilmiştir (Davis, 1965):

Tablo 1: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'in sistematiği

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Mangoliopsida
Takım	Brassicales
Familya	Brassicaceae
Alt familya	Brassicoideae
Cins	Arabidopsis
Tür	*Arabidopsis thaliana*

2.2 Yöntem

Tez çalışması kapsamında öncelikle bitki materyali yetiştirildikten sonra borik asit ve/veya 24-Epibrassinolid uygulamaları yapılmış ve ardından moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Tez çalışmasında kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkileri Surgun vd. (2012) tarafından modifiye edilen hidroponik ortamda yetiştirilmiştir. Sistem şu şekildedir: 1.5 ml'lik plastik tüpler üstten 1 cm, alttan ise 1,5 cm olacak şekilde kesilmiştir. Daha sonra kesilen tüplere agar delici yardımıyla kesilen taş yünleri çok bastırılmadan yerleştirilmiştir. Opak plastik kaplar (28 cm boyunda, 20 cm eninde ve 10 cm yüksekliğinde) hidroponik ortam tankı olarak kullanılmıştır. Hidroponik tanklarının içine yerleşecek şekilde kesilen ince straforların üzerine plastik tüpler için uygun delikler açılmıştır. Taş yünleri ile doldurulan tüpler straforların üzerindeki deliklere yerleştirilmiş ve uniform bir çimlenme sağlamak amacıyla taş yününün üst kısımlarına 200 µl % 0.7'lik plant agar (Duchefa Biochemie, Almanya) eklenmiştir. Agar katılaştıktan sonra tohumlar her tüpe 3-4 tane olacak şekilde ekilmiştir. Sıvı besin ortamı olarak MGRL (Fujiwara vd., 1992) kullanılmış ve tohum ekiminin ardından ilk üç gün boyunca hidroponik tankların üzeri streç film ile kaplanmıştır. Üç günün ardından streç film kaldırılmış ve çimlenen tohumlar her tüpte 1 bitki olacak şekilde seyreltilmiştir. 10-12 günün ardından gelişen kökler tüplerin alt kısmından görünmeye başlanmıştır. Çalışma boyunca tüm bitkiler bitki büyütme kabininde (Aralab, Portekiz) 150 µmol m^{-2} s^{-1}, 22±2 ˚C, 16 saat gündüz/ 8 saat gece fotoperiyodik koşullarda inkübe edilmiştir.

Besin Ortamının Hazırlanması: Tez çalışması kapsamında hidroponik ortam olarak kullanılan MGRL sıvı besin ortamının içeriği şu şekildedir: 1.75 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 5,8), 1.5 mM $MgSO_4$, 2.0 mM $Ca(NO_3)_2$, 3.0 mM KNO_3, 6.7 µM Na_2EDTA, 8.6 µM $FeSO_4$, 10.3 µM $MnSO_4$, 150.0 µM H_3BO_3, 1.0 µM $ZnSO_4$, 24.0 nM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 130.0 nM $CoCl_2$ ve 1 µM $CuSO_4$.

Beş litre MGRL sıvı besin ortamı için 87.5 ml sodyum fosfat tamponu (pH:5.8), 1.845 g $MgSO_4.7H_2O$, 2.36 g $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 2 g KNO_3, 0.124 g $Na_2EDTA.2H_2O$, 0.011 g $FeSO_4.7H_2O$, 0.008 g $MnSO_4.H_2O$, 0.46 g H_3BO_3, 0.001 g $ZnSO_4.7H_2O$, 0.000149 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, 0.00015 g $CoCl_2.6H_2O$ ve 0.0012 g $CuSO_4.8H_2O$ alınarak bir miktar dH_2O içinde tamamen çözünmeleri sağlanmış ve son hacim 5 litreye tamamlanmıştır. Hidroponik besin ortamı haftada 2 kez değiştirilmiştir.

2.2.2 Çalışmada Kullanılan Borik asit ve 24-Epibrassinolid Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında borik asit içermeyen (0 µM) ve yüksek borik asit konsantrasyonu (3000 µM) olmak üzere iki farklı konsantrasyon belirlenmiştir (Kasajima ve Fujiwara, 2007). Yapılan literatür çalışmaları kapsamında 24-Epibrassinolid (EBL) konsantrasyon 1 µM olarak belirlenmiştir (Kagale vd., 2007, Behnamnia vd., 2009, Surgun vd., 2016a,b). Öncelikle EBL hormonuda (Sigma E-1641) konsantrasyonu 1 mg ml^{-1} olacak şekilde stok solusyonu olarak hazırlanmıştır. Bunun için 10 mg hormon 1 ml absolüt etanol içinde çözülerek son hacim %70'lik etanol ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

2.2.3 Bitkilere Uygulamaların Yapılması

Tez çalışması kapsamında hidroponik sistemde kontrol ortamında yetiştirilen beş haftalık ve on haftalık bitkiler 0 veya 3000 µM BA ve/veya 1 µM EBL içeren besin ortamlarına aktarılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her uygulamaya ait rozet yaprak ve kök örnekleri alınarak sıvı nitrojen içinde dondurulmuş ve hemen ardından RNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Kontrol ve sadece EBL içeren besin ortamında borik asit konsantrasyonu MGRL solusyonunun içeriğinde belirtildiği gibi 150 µM'dır. Grafik ve tablolarda 0 µM borik asit uygulaması "-BA", 3000 µM borik asit uygulaması "+BA", 1 µM EBL uygulaması "EBL" ve kontrol uygulaması "K" olarak kısaltılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2: Beş ve on haftalık *A.thaliana* bitkilerine 24 saat süreyle yapılan uygulamalar

Uygulamalar	Beş haftalık bitkiler		On haftalık bitkiler	
	Borik asit (µM)	EBL (µM)	Borik asit (µM)	EBL (µM)
Kontrol	150	-	150	-
EBL	150	1	150	1
-BA	0	-	0	-
-BA + EBL	0	1	0	1
+BA	3000	-	3000	-
+BA + EBL	3000	1	3000	1

2.2.4 Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinden RNA İzolasyonu

Altı farklı uygulama grubuna (kontrol, EBL uygulaması, BA içermeyen ortam (0 µM), BA içermeyen ortam ve EBL uygulaması, yüksek konsantrasyonda BA uygulaması, yüksek konsantrasyonda BA uygulaması ve EBL uygulaması) ait bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden RNA izolasyon kiti (Zymo Research-R2024, USA) kullanılarak RNA izolasyonları yapılmıştır. Uygulanan kit protokolü şu şekildedir:

- Yaklaşık 100-150 mg kök ve rozet yaprak örnekleri (5'er bitkiye ait kök ve yaprak örnekleri birleştirilmiştir) soğuk havanda sıvı nitrojen yardımıyla ezilmiş ve 800 µl RNA lizis solüsyonu eklenerek ezme işlemine devam edilmiştir.
- Lizat pipet yardımıyla ZR Bashing Bead Lysis Tube'e transfer edilmiş ve 14000 rpm'de 1 dak. (4˚C) santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası 400 µl süpernant, içinde Zymo-Spin IIIC Column bulunan tüpe aktarılarak 8000 rpm'de 30 san. (4˚C) daha santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası IIIC Column atılmış ve tüpte kalan süpernatant üzerine 0.8 hacim etanol (% 95-100) eklenmiştir..
- Karışım Zymo-Spin IIC Column bulunan tüpe aktarılarak 14000 rpm'de 30 san. (4˚C) santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası Column'dan tüpe geçen kısım atılmıştır. Zymo-Spin IIC Column yeni bir tüpün içine yerleştirilmiş ve üzerine 400 µl RNA Prep Buffer eklendikten sonra 14000 rpm'de 1 dak. (4˚C) santrifüj edilmiştir.
- Zymo-Spin IIC Column'dan tüpe geçen kısım tekrardan atılmış ve IIC Column yeni bir tüpün içine alınmıştır.
- IIC Column'a 800 µl RNA Wash Buffer eklenerek 14000 rpm'de 30 san. (4˚C) santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası tüpe geçen kısım atılmış ve IIC Column aynı tüpe yerleştirilerek bu basamak 400 µl RNA Wash Buffer ile tekrar edilmiştir.
- Zymo-Spin IIC Column yeni tüp içine yerleştirilerek 14000 rpm'de 2 dak. (4˚C) santrifüjlenmiş ve RNA Wash Buffer'ın tamamen uzaklaşması sağlanmıştır.
- Zymo-Spin IIC Column dikkatli bir şekilde nükleaz içermeyen yeni tüpe aktarılmış ve 30 µl ddH_2O column tam ortasına gelecek şekilde yavaşça eklenerek 1 dakika inkübe edilmiştir.
- Son olarak Column 12000 rpm'de 30 san. (4˚C) santrifüjlenerek RNA'nın columndan tamamen inmesi sağlanmıştır.

2.2.5 RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini

Beş ve on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök dokularından izole edilen RNA örneklerinin miktarları ve saflık oranları (A_{260}/A_{280}) Multiskan^{TM} FC Mikroplate Fotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 3 ve 4). Ayrıca beş ve on haftalık bitkilerden izole edilen RNA örneklerinin bütünlüğü ve kalitesi yatay jel elektroforezi kullanılarak % 1,2'lik agaroz jelde 70 voltta 120 dak. yürütülerek belirlenmiştir. Jeller UV ışık altında Fusion FX7 imaging system, (Vilber Lourmat, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir.

Tablo 3: Birinci grup (5 haftalık) bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık oranları

Uygulamalar	ng/µl		Saflık oranları		A_{260}		A_{280}	
	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök
Kontrol	834	96.6	2.23	2.11	1.02	0.118	0.459	0.0561
EBL	285	135	2.18	2.15	0.349	0.165	0.16	0.0769
-BA	444	85.1	2.21	2.07	0.544	0.104	0.246	0.0503
-BA + EBL	192	143	2.17	2.14	0.236	0.176	0.109	0.082
+BA	288	74.7	2.2	2.07	0.353	0.0915	0.16	0.0441
+BA + EBL	277	89.3	2.17	2.07	0.34	0.109	0.157	0.0529

Tablo 4: İkinci grup (10 haftalık) bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden izole edilen RNA miktarları ve saflık oranları

Uygulamalar	ng/µl		Saflık oranları		A_{260}		A_{280}	
	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak	Kök
Kontrol	924	852	2.2	2.09	1.13	1.04	0.514	0.498
EBL	656	440	2.2	2.06	0.803	0.539	0.365	0.262
-BA	675	291	2.22	2.01	0.827	0.356	0.373	0.178
-BA + EBL	510	544	2.22	2.03	0.625	0.666	0.281	0.329
+BA	676	678	2.23	2.06	0.829	0.831	0.372	0.404
+BA + EBL	764	428	2.24	2.07	0.935	0.524	0.418	0.254

Kalitatif analiz için %1,2'lik agaroz jel hazırlanması ve RNA örneklerinin yüklenmesi: 2,4 g agaroz (Multicell, Kanada) 200 ml 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) (Multicell, Kanada) tamponu içinde mikro dalga fırın yardımıyla kaynatılmıştır. Jele biraz soğuduktan sonra (50-60 ˚C) 2 µl safe DNA jel stain (Invitrogen, USA) eklenmiştir. Hazırlanan agaroz jel hava kabarcığı olmayacak şekilde daha önceden tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine dökülmüştür. Jel tamamen donduktan sonra dikkatli bir şekilde taraklar çıkartılmış ve jel tepsini elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklara 3 µl RNA örneği ve 2 µl 6X TriTrack DNA yükleme boyası (Thermo Scientific #R1161) karıştırılarak yükleme yapılmıştır. Elektroforez tank tamponu olarak 1X TAE tamponu ve marker olarak 50 bp DNA (Thermo Scientific #SM1133) ladder kullanılmıştır.

2.2.6 DNaz I Uygulaması

İzole edilen RNA örneklerinden DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla DNaz I (Thermo Scientific #EN0521) uygulaması yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden kantitatif analiz sonuçları kullanılarak 1 µg kalıp RNA örneği için ne kadar (µl) örnek alınacağı hesaplanmıştır. 1 µg kalıp RNA için hesaplanan miktar (µl), 1 µl 10X Reaksiyon Buffer ($MgCI_2$ içeren), 1 µl DNaz I (Thermo Scientific #EN0521) eklendikten sonra son hacim ddH_2O ile 15 µl'ye tamamlanmış ve tüpler 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere 1µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler buz içine alınarak reaksiyon sonlanması sağlanmıştır.

2.2.7 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

DNaz I uygulamasının hemen ardından tüm uygulamalara ait izole edilen RNA örneklerinden RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K162) yardımıyla cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. Uygulanan kit protokolü şu şekildedir:

- DNaz I uygulaması yapılan örneklerden 11 µl alınımş ve 1 µl oligo $d(T)_{18}$ primeri eklenmiştir. Tüpler kısa süreli vorteks edildikten sonra 65 ˚C'de 5 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak soğumaları sağlanmıştır.
- Daha sonra tüplere 4 µl 5X Reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNase inhibitörü (20 u/µl), 2 µl dNTP mix (10 mM) ve 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

- Tüpler kısa süre vorteks edilmiş ve önce 42 ˚C'de 60 dak. inkübasyonun ardından 70 ˚C'de 5 dak. daha inkübasyona bırakılmıştır.
- cDNA sentezi gerçekleştirilen örneklere 1/20 oranında seyreltme yapılmış ve Real-time PCR analizine kadar -20 ˚C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8 Primerlerin Seçilmesi

Tez çalışmasında ekspresyon seviyeleri araştırılacak genleri belirlemek için literatürler değerlendirilmiş ve *Arabidopsis thaliana*'da hücre çeperi ile ilişkili bazı genler (selüloz sintaz genleri, ksiloglukan endotransglukosilaz/hidrolaz proteini kodlayan genler, ekspansin genleri, pektin metil esteraz genleri ve hücre duvarı proteinleri) belirlenmiştir (Tablo 5). Seçilen genlere ait primer sekanslarının bir kısmı literatürlerden alınırken, bir kısmı Primer3Plus (URL-2, 2017) kullanılarak dizayn edilmiştir.

Kontrol geni olarak hücrede ekspresyonu hiçbir koşulda değişmeyen (housekeeping gene) *Aktin2* seçilmiştir. Liyofilize şekilde temin edilen primerler -20 ˚C'den alınmış ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Primerlerin stok konsantrasyonları 1000 pmol μl^{-1} olacak şekilde çözüldükten sonra 37 ˚C' de 5 dak. inkübe edilmiştir. Primerler, Real-Time PCR reaksiyonlarında konsantrasyonu 10 pmol μl^{-1} olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

Tablo 5: Tez kapsamında seçilen genler ve primerlere ait bilgiler

Gen lokus numarası	Gen ismi	5'- 3'	Bant uzunluğu (bç)	Kaynak
Selüloz Sintaz (Cellulose synthase)				
At4g32410	*CESA1*	F-ACTGGTTCCAATGGCGAAGAAC R-AACCGAGGTCAACCACAAAG	198	Bu çalışma
At5g44030	*CESA4*	F-CATTCGTCAAAGATCGCAGA R-CCAACCTTCTTCAGGCTTCT	103	Bu çalışma
At5g64740	*CESA6*	F-CGTGGACCTCTCTACCGCTCA R-AGAAGAGCGCCATGAAGAGG	120	Bu çalışma
At4g18780	*CESA8*	F-CTTATGGAGAATGGCGGTGT R-AACCCGTCAAAATGTCTTCG	157	Bu çalışma
At4g15290	*CSLB5*	F- TTATTGCCTCTTGCCTGCTT R-CAGTGCATCCCCACAAGTGTG	100	Bu çalışma
Ksiloglukan endotransglikosilaz/hidrolaz proteinleri [Xyloglucanmendotransglucosylase/hydrolase protein (XTHs)]				
At3g23730	*XTH16*	F-TGAGCTTAATGCTTATGGGAGAA R-CTCTGGTGGGAATCCTTGAG	108	Camacho-Cristobal vd., 2008a
At2g18800	*XTH21*	F-GGGTGTGGCTTATCCAAAGA R-GGTCCCTGTGACCAGTTTGT	110	Camacho-Cristobal vd., 2008a
At4g25810	*XTH23*	F-CAAGAACAGATGAGATGGGTACAGAAT R-CGCAGCTAAGCACTCGCGT	101	Yokoyama ve Nishitani, 2001
Ekspansinler [Expansins (EXPs))				
At3g29030	*EXPA5*	F-CCGGTATCATTCCCGTTATG R-AATTTTGCCCCCAATTTCTC	195	Bu çalışma
At2g40610	*EXP8*	F-CAACCATCACCGTCACAGCTA R-TGAAGAGGAGGATTGCACCAA	90	Bu çalışma
At5g56320	*EXP14*	F-TTCACGATCAACGGTCATTC R-GCCAACGTGTATTGGTTCCT	101	Camacho-Cristobal vd., 2008a
Pektin metil esterazlar [Pectin methyesterase (PME)]				
At1g53830	*PME2*	F-ATGTTCTTGGGAGATGGCCG R-TCGACGGTTCCGGTTATGTG	293	Bu çalışma
At4g02330	*PME41*	F-TGGACCACTTTCAACTCCG R-GGTTCAACAACCTCGTCTATG	498	Qu vd., 2011
Hücre duvarı proteini				
At4g16120	*SEB1*	F-GGTACCGTTTTCGCTGGTTA R-TTTGGGACATTTCCATCCAT	181	Müssig vd., 2002
İnternal kontrol				
At3g18780	*Aktin2*	F-TGCCAATCTACGAGGGTTTC R-TTCTCGATGGAAGAGCTGGT	226	Bu çalışma

2.2.9 Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu

cDNA sentezinin ardından ekspresyon seviyeleri araştırılan *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8, CSLB5, XTH16, XTH21, XTH23, EXPA5,EXP8, EXP14, PME2, PME41* ve *SEB1* genlerine ait primerlerin PCR reaksiyon koşullarının ve PCR karışımı bileşenlerininin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan primerlerin T_m (melting

temperature) sıcaklıkları dikkate alınarak her primer için maksimum bağlanmanın gerçekleştiği sıcaklığı belirlemek amacıyla 2 farklı sıcaklık aralığında (42-52 ˚C ve 44-60 ˚C) gradient PCR yapılmıştır. Yapılan PCR sonucunda her primerin en iyi T_m belirlenmiştir. Optimize edilen PCR koşulları Tablo 6 'da verilmiştir. Tüm Real-time PCR çalışmaları BioRad CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System cihazında (BioRad, ABD) gerçekleştirilmiştir. Her Real-Time PCR reaksiyonunda *Aktin2* geni tekrar edilmiştir.

Tablo 6: Çalışmada kullanılan genlere ait primerlerin optimize edilen PCR koşulları

Genler	**Başlangıç Denatürasyonu**			**Döngü sayısı = 35**					
				Denatürasyon		**Bağlanma**		**Uzama**	
	Sıcaklık (°C)	**Süre (dak.)**	**Döngü Sayısı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (san.)**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (san.)**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (san.)**
Aktin2	94	3	1	94	30	48-60	30	72	45
CESA1	94	3	1	94	30	57.8	30	72	45
CESA4	94	3	1	94	30	53.8	30	72	45
CESA6	94	3	1	94	30	53.8	30	72	45
CESA8	94	3	1	94	30	50	30	72	45
CSLB5	94	3	1	94	30	53.8	30	72	45
EXPA5	94	3	1	94	30	50	30	72	45
EXP8	94	3	1	94	30	53.8	30	72	45
EXP14	94	3	1	94	30	57.8	30	72	45
XTH16	94	3	1	94	30	57.8	30	72	45
XTH21	94	3	1	94	30	50	30	72	45
XTH23	94	3	1	94	30	57.8	30	72	45
PME2	94	3	1	94	30	50	30	72	45
PME41	94	3	1	94	30	58.7	30	72	45
SEB1	94	3	1	94	30	58.7	30	72	45

RT-PCR reaksiyonu bileşenleri için yapılan optimizasyon çalışmasında bazı primerlerin en iyi çalıştığı $MgCl_2$ konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. *CESA1, CESA4, CESA6, CSLB5, EXP8, EXP14, XTH16, XTH23, PME41* ve *SEB1* genleri için optimizasyonu yapılan PCR karışımı şu şekildedir; 0.375 µl forward primer (10 pmol), 0.375 µl revers primer (10 pmol), 5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı (Thermo Scientific, #K0252), 3 µl cDNA (1/20 seyreltilmiş cDNA) ve 1.25 µl nükleaz-freee su eklenerek, toplam hacim 10 µl olacak şekilde tamamlanmıştır. *CESA8, EXPA5, PME2 ve XTH21*

genleri için optimizasyonu yapılan PCR karışımı ise şu şekildedir; 0.375 µl forward primer (10 pmol), 0.375 µl revers primer (10 pmol), 5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı (Thermo Scientific, #K0252), 3 µl cDNA, **0.75 µl $MgCl_2$ (25 mM)** ve 0.50 µl su eklenerek, toplam hacim 10 µl olacak şekilde tamamlanmıştır.

2.2.10 RT-PCR Ürünlerinin Jel elektroforezi

RT-PCR sonuçları yatay jel elektroforezi sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. % 2.5'luk agaroz jel 200 ml 1×TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) solüsyonu içinde 5 g agaroz (Merck, Almanya) kaynatılarak hazırlanmıştır. Jel kuyucuklarına 10 µl Real-time PCR örnekleri ile 2 µl 6X yükleme boyası karıştırılarak toplam 12 µl yüklenmiştir. Amplifiye edilen DNA fragmentinin uzunluğunun kontrolü için Gene Ruler 100 bp Marker Plus (Thermo Scientific, #SM0241) kullanılmıştır. Güç kaynağı yardımıyla örnekler 80 Voltta 1 saat yürütüldükten sonra, UV ışık altında FUSION FX7 Kemilüminesan Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir ve Fusion FX7 imaging system programı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.2.11 RT-PCR Bant Profillerinin Değerlendirilmesi

Denatürasyon, primer bağlanması ve zincir uzaması olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Cq) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formülü kullanılarak Bio RAD CFX Manager 3.1 yazılımı ile otomatik olarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Formül şu şekildedir;

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = (Cq_{\text{hedef gen}} - Cq_{\text{aktin2}})_{\text{uygulama grubu}} - (Cq_{\text{hedef gen}} - Cq_{\text{aktin2}})_{\text{kontrol grubu}} \quad (1)$$

Her gen için hesaplanan bu değer uygulama örneklerinin kontrole göre mRNA ekspresyon düzeyini kat olarak azalma ya da artma (fold increase ya da fold decrease) olarak ifade etmektedir. İnternal kontrol olarak *Aktin*2 geni kullanılmış ve her bir örneğe ait *Aktin*2 genine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulanmıştır.

2.3 İstatistiksel Analiz

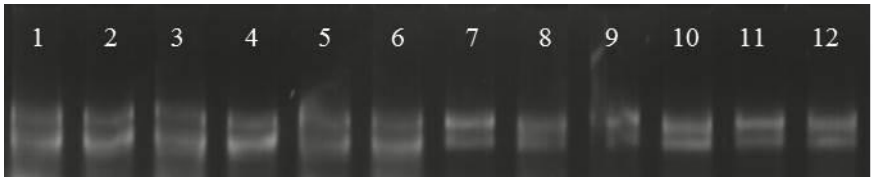
Tez çalışmasında tüm deneyler her uygulama grubuna ait 3 bağımsız tekerrürde 3 kere tekrarlanarak gerçekleşmiştir. İstatiksel analizlerde SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) istatistik yazılım paketi kullanılmıştır. Gen ekpresyon değerleri tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve her bir gen bakımından uygulama grupları arasındaki ikili farklılık Duncan Çoklu Aralık testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Grafiklerin çiziminde Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Chicago, IL) programı kullanılmış olup, sütunlarda ortalama değerler ile birlikte standart hata (SE) değerleri gösterilmiştir. Gen ifade düzeyi grafiklerinde kontrol (%100) olarak kabul edilmiştir.

BÖLÜM 3

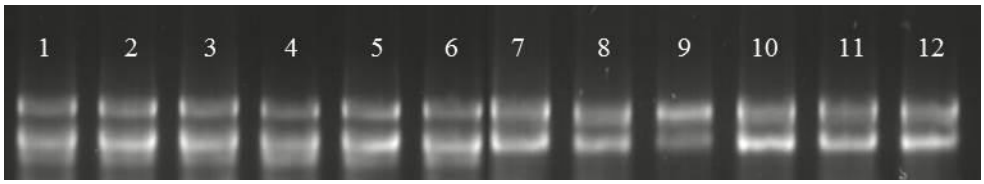
BULGULAR

3.1 Uygulamalı Örneklerden RNA İzolasyonu ve cDNA sentezi

Borik asit ve/veya EBL içeren besin ortamlarında 24 saat inkübe edilmiş beş haftalık ve on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök kısımlarından total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların kaliteleri ve olası degredasyon durumlarını tespit etmek amacıyla RNA'lar agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jelde 18S ve 28S bantlarının gözlenmesi izolasyon sırasında degredasyon olmadığını göstermektedir. Beş haftalık ve on haftalık bitkilere ait örneklerden izole edilen RNA agaroz jel sonuçları Şekil 14 ve 15'te verilmiştir.



Şekil 14: Borik asit ve/veya EBL içeren besin ortamlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan beş haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları. 1-6 arası rozet yaprak örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL, 3: -BA, 4: -BA + EBL, 5: +BA, 6: +BA + EBL), 7-12 arası kök örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL, 3: -BA, 4: -BA + EBL, 5: +BA, 6: +BA + EBL). %1,2'lik agaroz jelde 70 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Jel kuyucuklarına 3 µl RNA örneği ve 2 µl 6X TriTrack DNA yükleme boyası karıştırılarak yükleme yapılmıştır.



Şekil 15: Borik asit ve/veya EBL içeren besin ortamlarına 24 saat süreyle maruz bırakılan on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinden elde edilen RNA izolasyon sonuçları. 1-6 arası rozet yaprak örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL, 3: -BA, 4: -BA + EBL, 5: +BA, 6: +BA + EBL), 7-12 arası kök örnekleri (1: Kontrol, 2: EBL, 3: -BA, 4: -BA + EBL, 5: +BA, 6: +BA + EBL). %1,2'lik agaroz jelde 70 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Jel kuyucuklarına 3 µl RNA örneği ve 2 µl 6X TriTrack DNA yükleme boyası karıştırılarak yükleme yapılmıştır.

RNA izolasyon gerçekleşen tüm örneklere DnazI uygulamasının materyal ve yöntem kısmında belirtildiği prokoller uygulanarak cDNA sentezi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2 Real-time PCR Analizleri

Tez çalışmasında, beş ve on haftalık *Arabidopsis thaliana* bitkilerine ait kök ve rozet yaprak örneklerinde 14 gene ait mRNA seviyeleri belirlenmek için RT-PCR analizleri yapılmıştır.

3.2.1 Beş Haftalık Bitkilerin Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

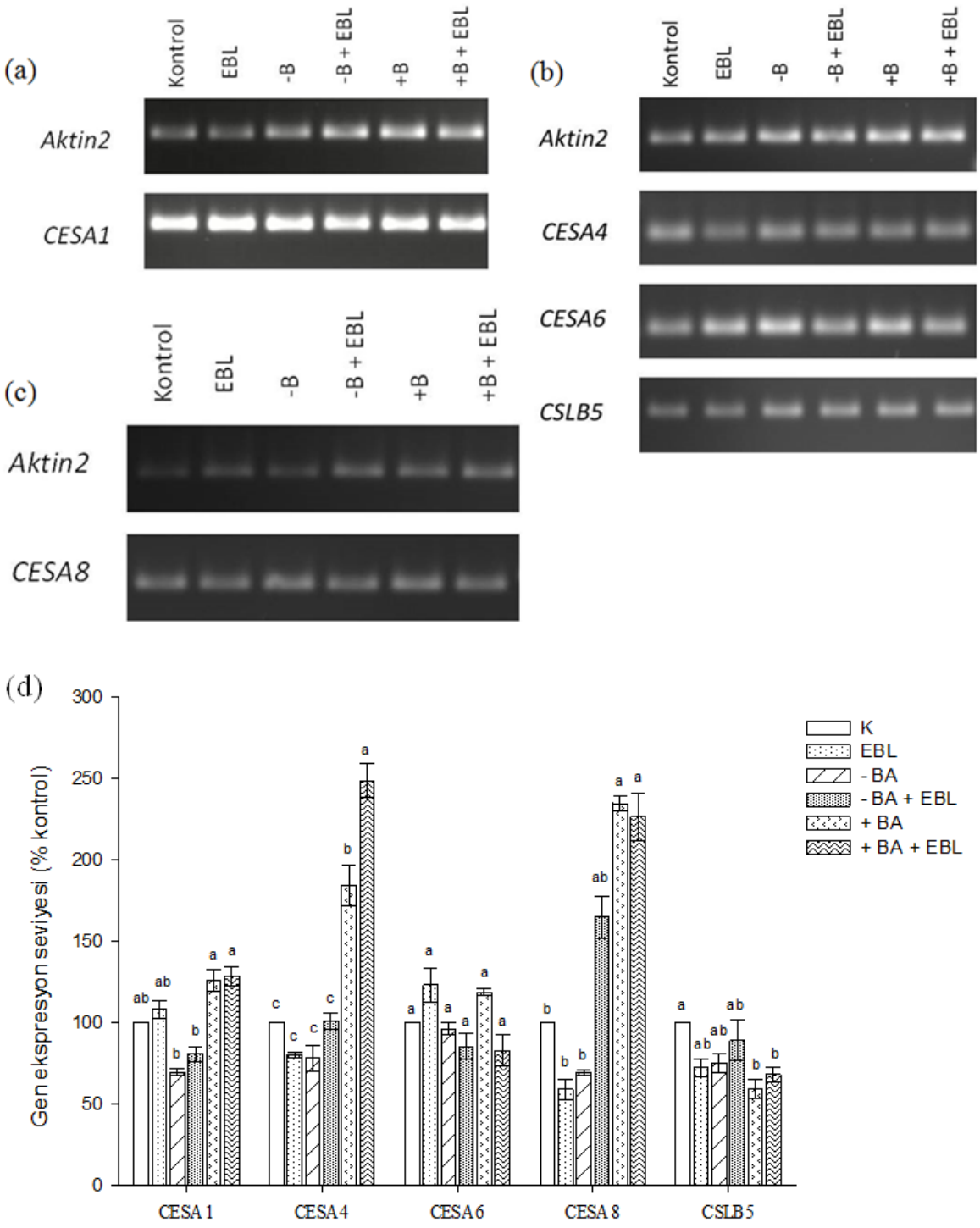
Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan beş haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinde belirlenen 14 gene ait mRNA seviyeleri RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Rozet yaprak ve kök örneklerinde ekspresyon seviyesi araştırılan genlere ait ekspresyon seviye grafikleri ve jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 16-25). Genlere ait jel görüntüleri internal kontrol olan *Aktin2* (housekeeping) genine ait jel görüntüsü ile birlikte verilmiştir. Çalışılan genler arasında primerlerinin bağlanma sıcaklıkları aynı olan genler tekerrürleri ile birlikte aynı anda çalışılmıştır. Her PCR reaksiyonunda mutlaka *Aktin2* geni tekrar edilmiştir. Beş haftalık *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin rozet yaprak ve kök örneklerinde araştırılan genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes) Tablo 7 ve 8'de verilmiştir.

3.2.1.1 Rozet Yaprak Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına maruz bırakılan beş haftalık bitkilerin rozet yapraklarında yapılan RT-PCR analizleri sonucu *CESA1* ve *CESA6* genlerini benzer ekspresyon profilleri göstermiştir. 0 µM ve 3000 µM BA uygulamaları *CESA1* ve *CESA6* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre istatistiki önem taşıyacak şekilde değiştirmemiştir. Bununla birlikte yapılan 1 µM EBL uygulaması tek başına ya da BA içeren ya da içermeyen ortamlarda kontrole göre ekspresyonu değiştirmemiştir (Şekil 16).

Tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması ya da borik asit içermeyen ortama maruz kalan bitkilerde *CESA4* ve *CESA8* genlerinin ekspresyonunda kontrole göre meydana gelen değişimler istatistiki olarak önem taşımamaktadır (Şekil 16). Bununla birlikte 3000 µM BA uygulaması *CESA4* ve *CESA8* geninin ekspresyonunu sırasıyla 1.84 ve 2.34 oranında arttırmıştır (Tablo 7). Yüksek konsantrasyonda BA ile birlikte yapılan 1 µM EBL uygulaması ise *CESA4* ve *CESA8* geninin ekspresyonunu kontrole göre sırasıyla 2.48 ve 2.26 oranında arttırmıştır (Tablo 7) ve bu artışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

24 saat süreyle BA eksikliği uygulaması ve yüksek konsantrasyonda BA uygulaması ile birlikte yapılan EBL uygulaması *CSLB5* geninin ekspresyonunu kontrole göre istatistiki önem arz edecek şekilde azaltmıştır (Tablo 7). Diğer uygulamalar ise *CSLB5* geninin ekspresyonunda kontrole göre önemli bir değişme meydana getirmemiştir (Şekil 16).

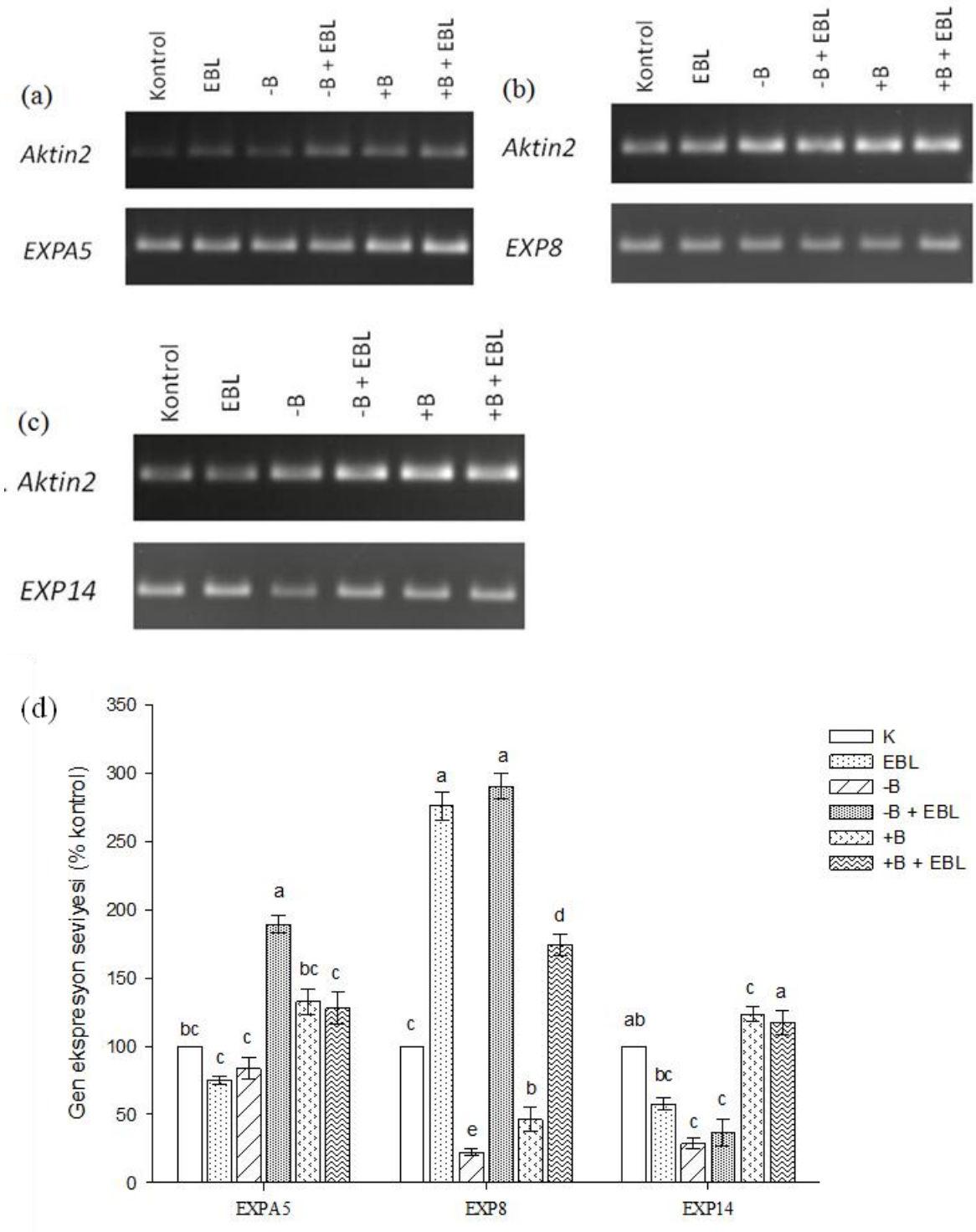


Şekil 16: Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *CESA1* genine ait jel görüntüsü, (b) *CESA4, CESA6 ve CSLB5* genlerine ait jel görüntüsü, (c) *CESA8* genine ait jel görüntüsü ve (d) *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8 ve CSLB5* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Beş haftalık bitkilere yapılan 0 ve 3000 µM BA uygulamaları *EXPA5* geninin mRNA seviyesini kontrol ile kıyaslandığında istatistiki olarak önem arz edecek şekilde değiştirmemiştir (Şekil 17). Benzer şekilde 1 µM EBL tek başına ya da 3000 µM BA uygulaması ile birlikte uygulandığında *EXPA5* geninin mRNA seviyesini değiştirmez iken, 0 µM BA uygulaması ile birlikte yapılan EBL uygulaması kontrole *EXPA5* geninin ekspresyonunu 1.89 oranında arttırmıştır (Tablo 7, Şekil 17).

Tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması *EXP8* geninin ekspresyonunu kontrole göre 2.74 oranında arttırmıştır. 0 µM BA uygulaması *EXP8* geninin ekspresyonunu kontrole göre 4.54 oranında azaltmış, ancak 1 µM EBL ile birlikte uygulandığında ise kontrole göre 2,90 oranında arttırmıştır (Tablo 7, Şekil 17). Tek başına 3000 µM BA uygulaması *EXP8* geninin ekspresyonunu kontrole göre 2.17 oranında azaltmıştır. 3000 µM BA ile birlikte yapılan 1 µM EBL uygulaması ise *EXP8* geninin ekspresyonunu kontrole göre 1.74 oranında arttırmıştır. Kontrole göre yapılan tüm uygulamalarda meydana gelen artma ve azalmalar istatistiki bakımından önemli bulunmuştur (Şekil 17).

EXP14 geninin ekspresyonunu 1 µM EBL uygulaması kontrole göre 1,75 oranında azaltmıştır (Tablo 7). 0 µM BA ve 0 µM BA ile birlikte yapılan EBL uygulaması kontrole göre *EXP14* geninin ekspresyon seviyesi sırasıyla 3.57 ve 2.77 oranlarında azaltmıştır ve bu azalmalar istatistiki önem arz etmektedir (Şekil 17). 3000 µM BA uygulaması ise tek başına ya da EBL ile birlikte uygulandığında *EXP14* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre arttırmıştır fakat bu artış önemli bulunmamıştır (Tablo 7, Şekil 17).

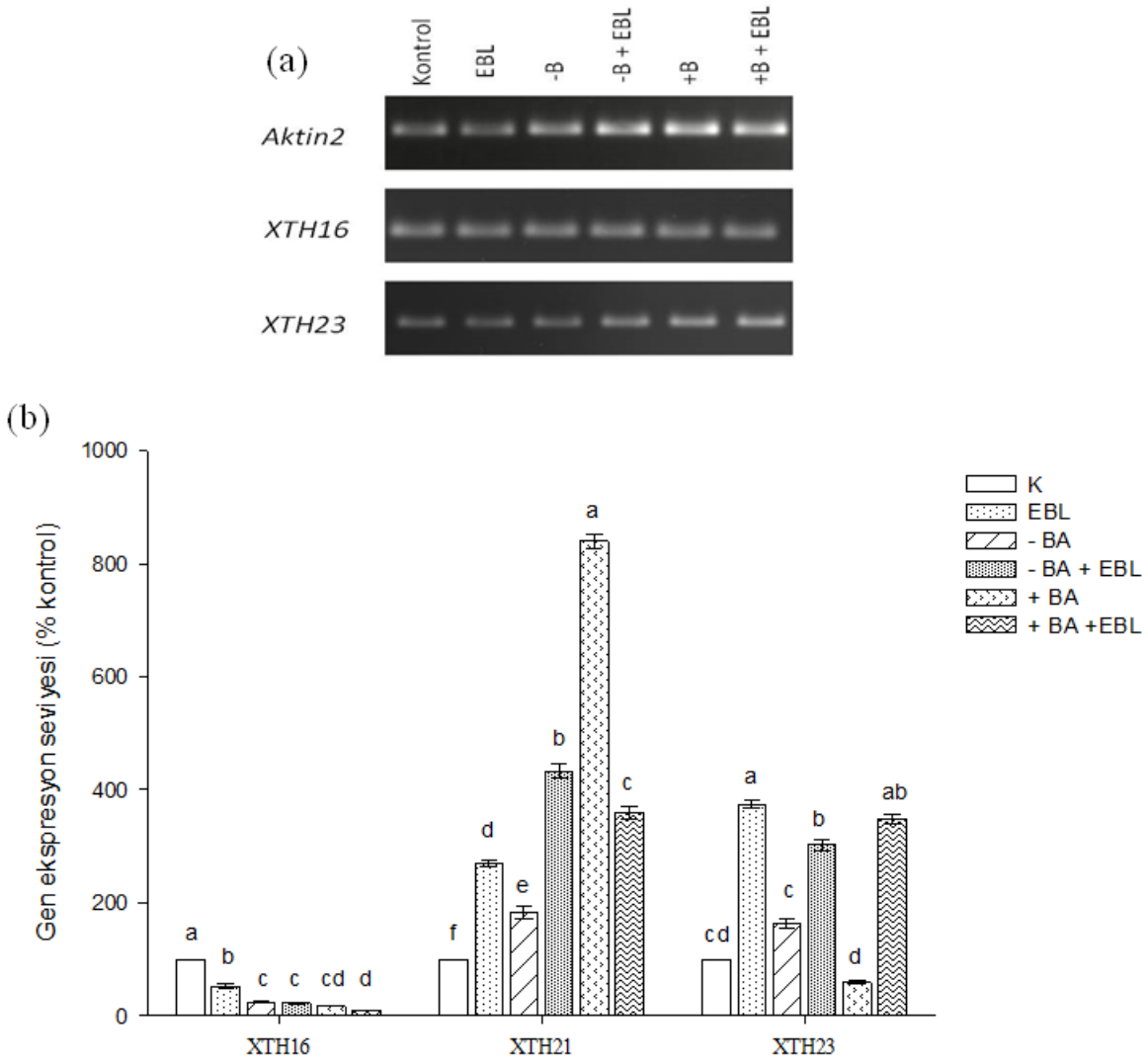


Şekil 17: Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *EXPA5* genine ait jel görüntüsü, (b) *EXP8* genine ait jel görüntüsü, (c) *EXP14* genine ait jel görüntüsü ve (d) *EXPA5, EXP8 ve EXP14* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

24 saat BA ve/veya EBL uygulamalarının beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde *XTH16* geninin ekspresyon seviyesini istatistiki bakımdan önemli oranlarda azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 18). 0 µM BA uygulaması *XTH16* geninin ekspresyonunu seviyesini kontrole göre 4.16 oranında, 3000 µM BA uygulaması ise 5.73 oranında azalmıştır (Tablo 7). Tek başına 1 µM EBL uygulaması ekspresyonu 1.92 oranında azaltırken 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 4.54 ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında 10.38 oranında azaltmıştır (Tablo 7).

BA ve/veya EBL uygulamaları *XTH21* geninin ekspresyon seviyesini ise istatistiki bakımdan önem arz eden oranlarda arttırmıştır (Tablo 7). *XTH21* geninin ekspresyonunu 1 µM EBL uygulaması 2.70 oranında, 0 µM BA uygulaması tek başına 1.83 oranında, 0 µM BA ile birlikte 1 µM EBL uygulaması ise kontrole göre 4.33 oranında arttırmıştır. Tek başına 3000 µM BA uygulaması 8.40 oranında, EBL ile birlikte uygulandığında ise 3.60 oranında ekspresyonu artırmıştır.

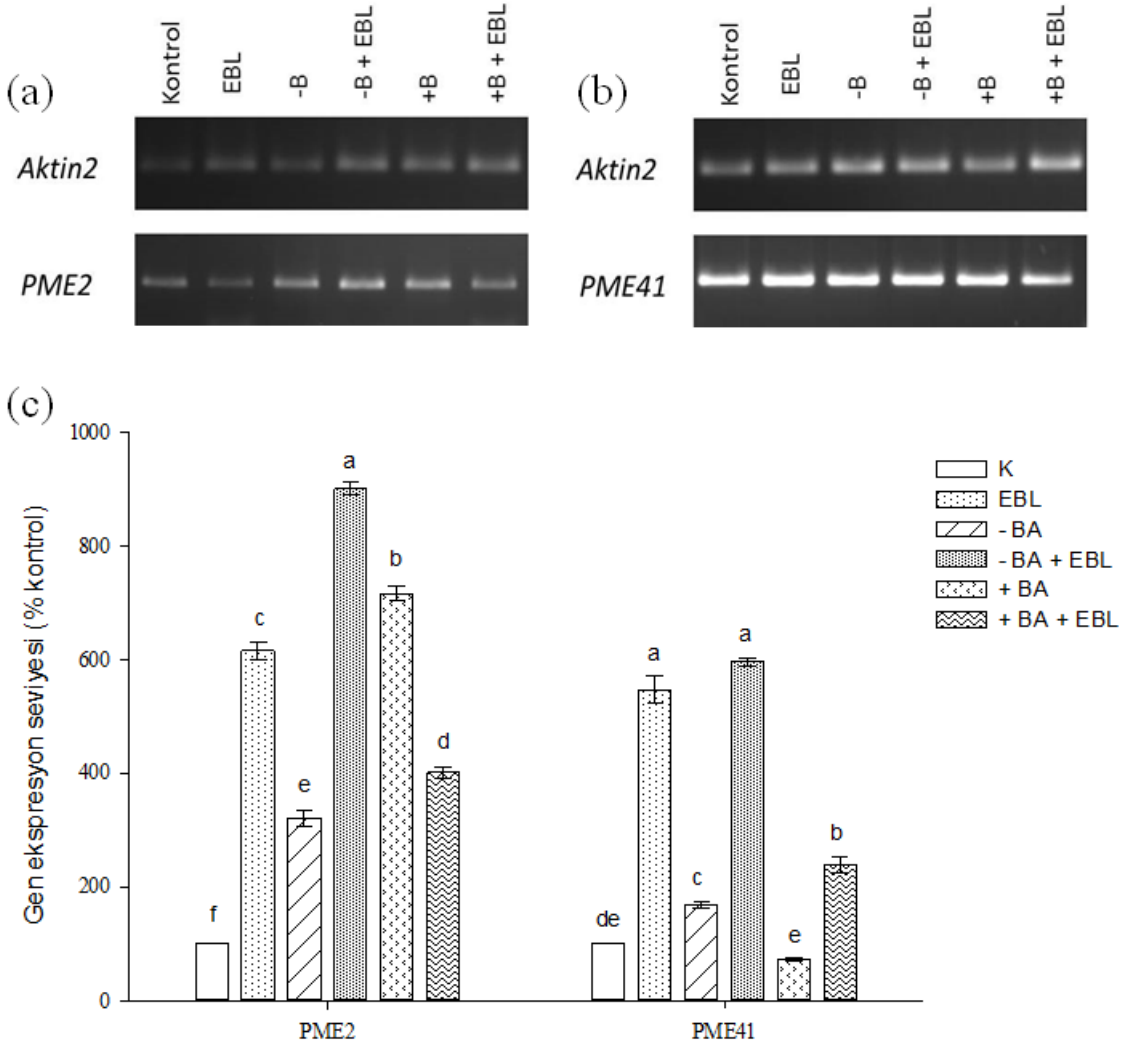
0 ve 3000 µM BA uygulamaları sonucu *XTH23* genin mRNA seviyesi kontrole göre değişmemiştir (Şekil 18). 1 µM EBL uygulaması tek başına *XTH23* geninin mRNA seviyesini 3.73 oranında, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 3.02 ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında kontrole göre 3.46 oranında arttırmıştır ve bu oranlar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Tablo 7).



Şekil 18: Beş haftalık bikilerin rozet yaprak örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz/hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *XTH16 ve XTH23* genlerine ait jel görüntüsü ve (b) *XTH16, XTH21* ve *XTH23* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

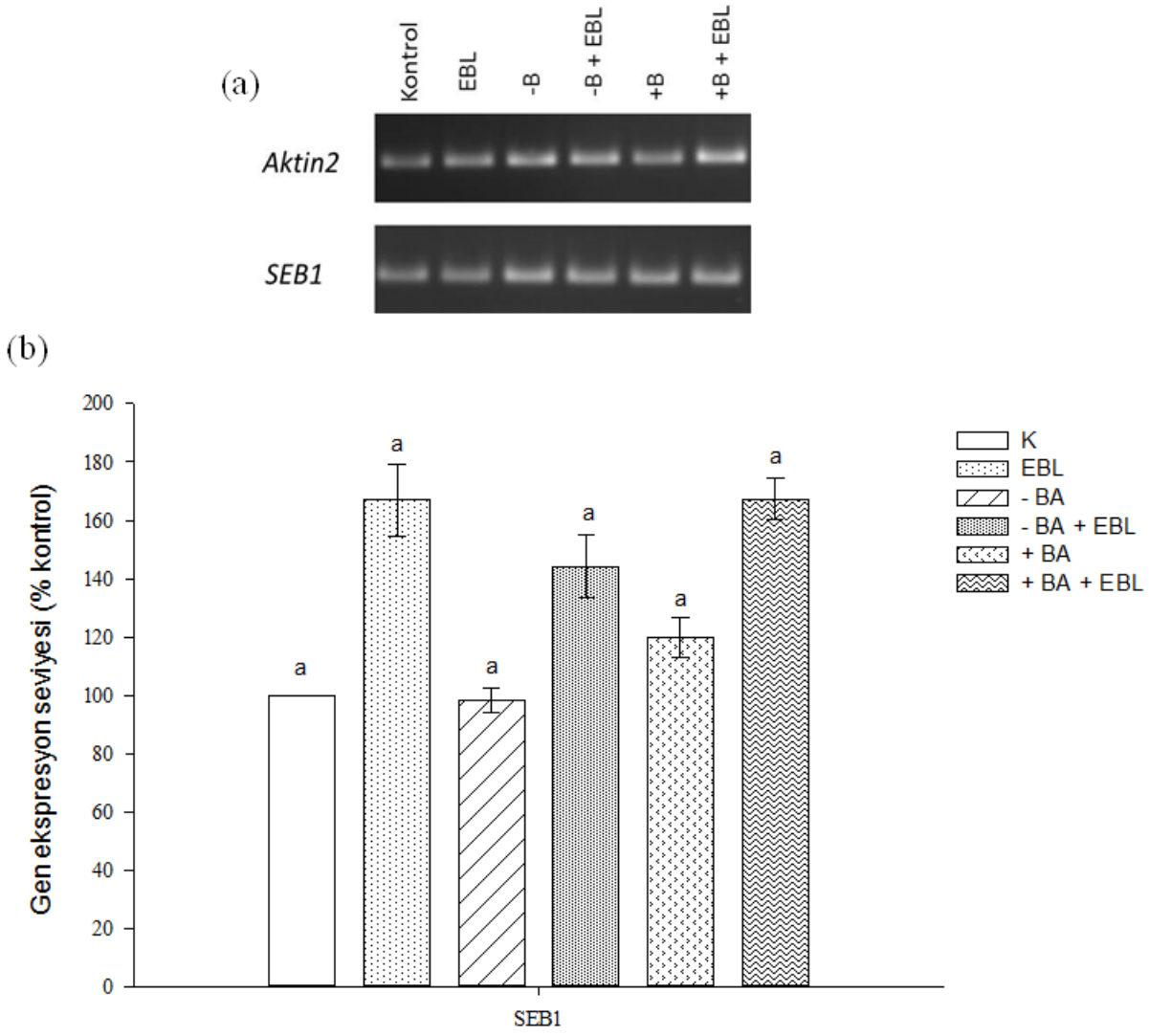
24 saat boyunca yapılan BA ve/veya EBL uygulaması *PME2* geninin ekspresyonunu istatitiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır (Şekil 19). 0 µM BA uygulaması kontrole göre ekspresyonu 3.20 oranında, 3000 µM BA uygulaması 7.15 oranında artırmıştır. 1 µM EBL uygulamasının bitkilerde *PME2* geninin ekspresyonu kontrole göre 6.15 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. EBL, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 8.98 oranında ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 4.00 oranında ekspresyonu arttırmıştır (Tablo 7).

PME41 geninin ekspresyonu 1 µM EBL uygulaması ile 5.47 oranında artmıştır (Tablo 7). 3000 µM BA uygulaması *PME41* geninin ekspresyonunu kontrole göre değiştirmez iken, 0 µM BA uygulaması ekspresyonu arttırmıştır. 1 µM EBL, 0 µM ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise ekspresyonu sırasıyla 5.95 ve 2.38 oranlarında arttırmıştır ve bu artışlar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur.



Şekil 19: Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *PME2* genine ait jel görüntüsü, (b) *PME41* genine ait jel görüntüsü ve (c) *PME2 ve PME41* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

BA ve/veya EBL uygulamalarına maruz bırakılan bitkilerin yapraklarında *SEB1* geninin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 7, Şekil 20).



Şekil 20: Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü. (a) *SEB1* genine ait jel görüntüsü ve (b) *SEB1* ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Tablo 7: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A. thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)

Gen isimleri	Uygulamalar					
	Kontrol	**EBL**	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	1.00 ± 0.05	1.08 ± 0.03	-1.44 ± 0.02	-1.25 ± 0.04	1.25 ± 0.06	1.28 ± 0.05
CESA4	1.00 ± 0.09	-1.24 ± 0.03	-1.29 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.84 ± 0.07	2.48 ± 0.14
CESA6	1.00 ± 0.02	1.22 ± 0.06	-1.04 ± 0.04	-1.17 ± 0.05	1.18 ± 0.06	-1.21 ± 0.01
CESA8	1.00 ± 0.12	-1.72 ± 0.10	-1.44 ± 0.07	1.64 ± 0.22	2.34 ± 0.27	2.26 ± 0.34
CSLB5	1.00 ± 0.09	-1.39 ± 0.06	-1.34 ± 0.04	-1.14 ± 0.08	-1.71 ± 0.03	-1.47 ± 0.03
EXPA5	1.00 ± 0.13	-1.33 ± 0.10	-1.20 ± 0.06	1.89 ± 0.36	1.32 ± 0.13	1.27 ± 0.08
EXP8	1.00 ± 0.08	2.74 ± 0.22	-4.54 ± 0.01	2.90 ± 0.27	-2.17 ± 0.05	1.74 ± 0.14
EXP14	1.00 ± 0.01	-1.75 ± 0.14	-3.57 ± 0.02	-2.77 ± 0.03	1.23 ± 0.15	1.17 ± 0.20
XTH16	1.00 ± 0.05	-1.92 ± 0.12	-4.16 ± 0.01	-4.54 ± 0.03	-5.73 ± 0.00	-10.38 ± 0.02
XTH21	1.00 ± 0.29	2.70 ± 0.49	1.83 ± 0.55	4.33 ± 0.54	8.40 ± 1.27	3.60 ± 0.52
XTH23	1.00 ± 0.05	3.73 ± 0.24	1.62 ± 0.22	3.02 ± 0.29	-1.69 ± 0.04	3.46 ± 0.64
PME2	1.00 ± 0.20	6.15 ± 1.15	3.20 ± 0.15	8.98 ± 2.25	7.15 ± 1.69	4.00 ± 0.95
PME41	1.00 ± 0.08	5.47 ± 0.16	1.68 ± 0.10	5.95 ± 0.40	-1.38 ± 0.05	2.38 ± 0.26
SEB1	1.00 ± 0.25	1.66 ± 0.05	-1.01 ± 0.17	1.44 ± 0.14	1.19 ± 0.08	1.67 ± 0.18

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

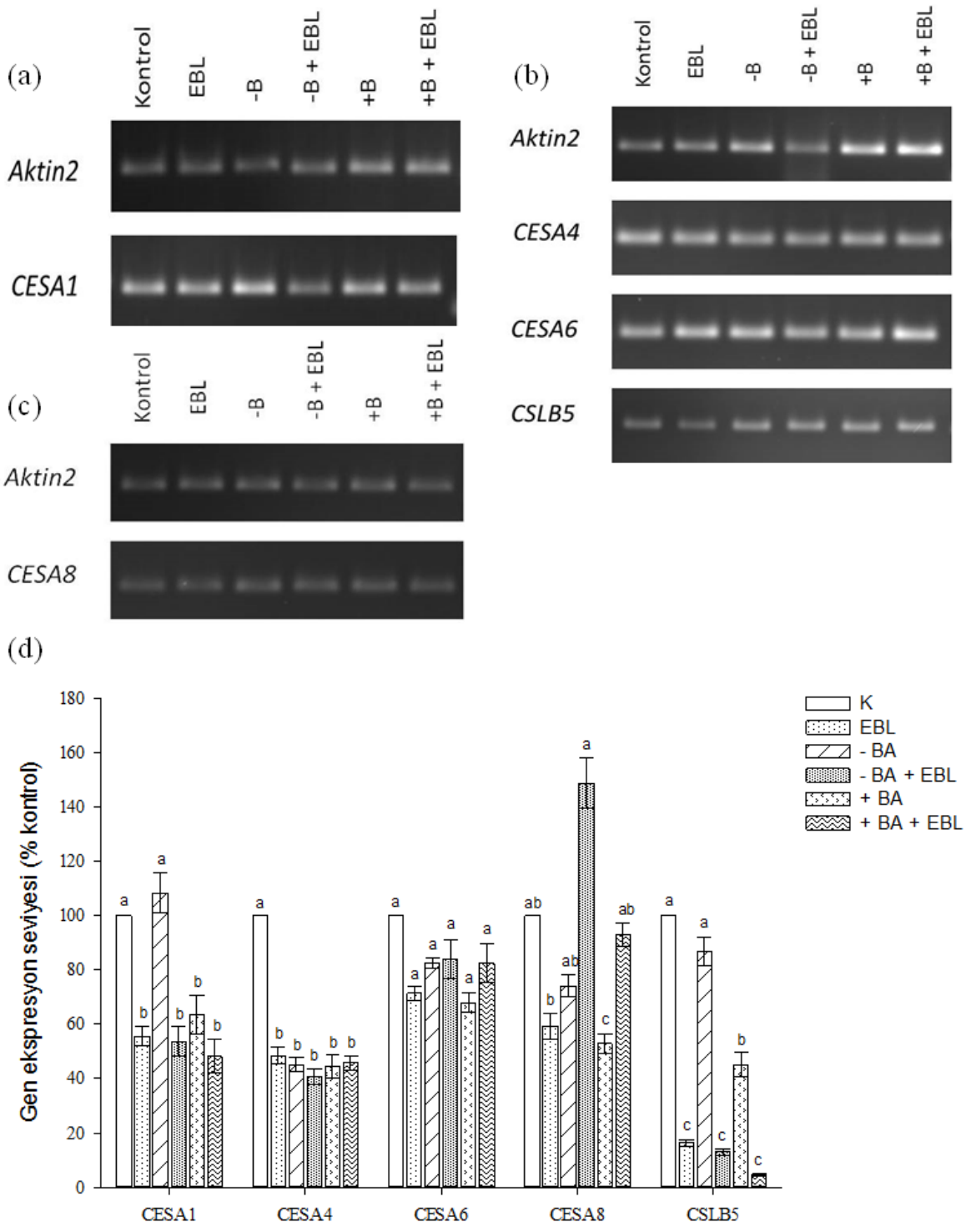
3.2.1.2 Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

24 saat boyunca yapılan 1 µM EBL uygulaması beş haftalık bitkilerin kök dokularında *CESA1* geninin ekspresyonu kontrole 1.80 oranında azaltmıştır ve bu azalma istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Tablo 8). BA bulunmayan ortamda *CESA1* genin ekspresyonu kontrole göre değişmez iken, BA bulunmayan ortama 1 µM EBL ilave edildiğinde genin ekspresyonu kontrole göre 1.88 oranında azalmıştır. 3000 µM BA uygulaması ve 3000 µM BA ile birlikte yapılan EBL uygulaması *CESA1* geninin ekspresyonunu kontrole göre sırasıyla 1.57 ve 2.08 oranlarında azaltmış ve bu azalma istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 8, Şekil 21).

Borik asit ve/veya EBL uygulamaları *CESA4* geninin ekspresyonunu kontrole göre benzer oranlarda azaltmış ve meydana gelen azalmalar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Tablo 8, Şekil 21). Yapılan uygulamalar *CESA6* geninin ekspresyon seviyesinde kontrole göre düşük oranlarda değişiklikler meydana getirmiştir fakat istatistiki önem arz etmemiştir (Tablo 8, Şekil 21).

3000 µM BA uygulaması *CESA8* geninin ekspresyonu kontrole göre 1.90 oranında aza1tmıştır ve bu azalma istatistiki bakımdan önemli bulunurken, yapılan diğer uygulamaların (EBL, -BA, -BA+EBL, +BA+EBL) *CESA8* geninin ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler önemli bulunmamıştır (Şekil 21).

Beş haftalık bitki köklerinde bor eksikliğinin (0 µM BA uygulaması) *CSLB5* geninin ekspresyon seviyesi üzerine etkisi kontrole göre istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur. Yüksek borik asit konsantasyonlarıyla yapılan uygulamalar ise önemli değişikliklere neden olmuştur. Tek başına 1 µM EBL uygulaması *CSLB5* geninin ekspresyonunu 6.15 oranında, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 7.66 oranında azaltmıştır ve bu azalmalar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur. Tek başına 3000 µM BA uygulaması ekspresyon seviyesini 2.22 oranında, 1 µM EBL ile birlikte uygulandığında ise 22.47 gibi kritik bir oranda azaltmıştır (Tablo 8, Şekil 21).

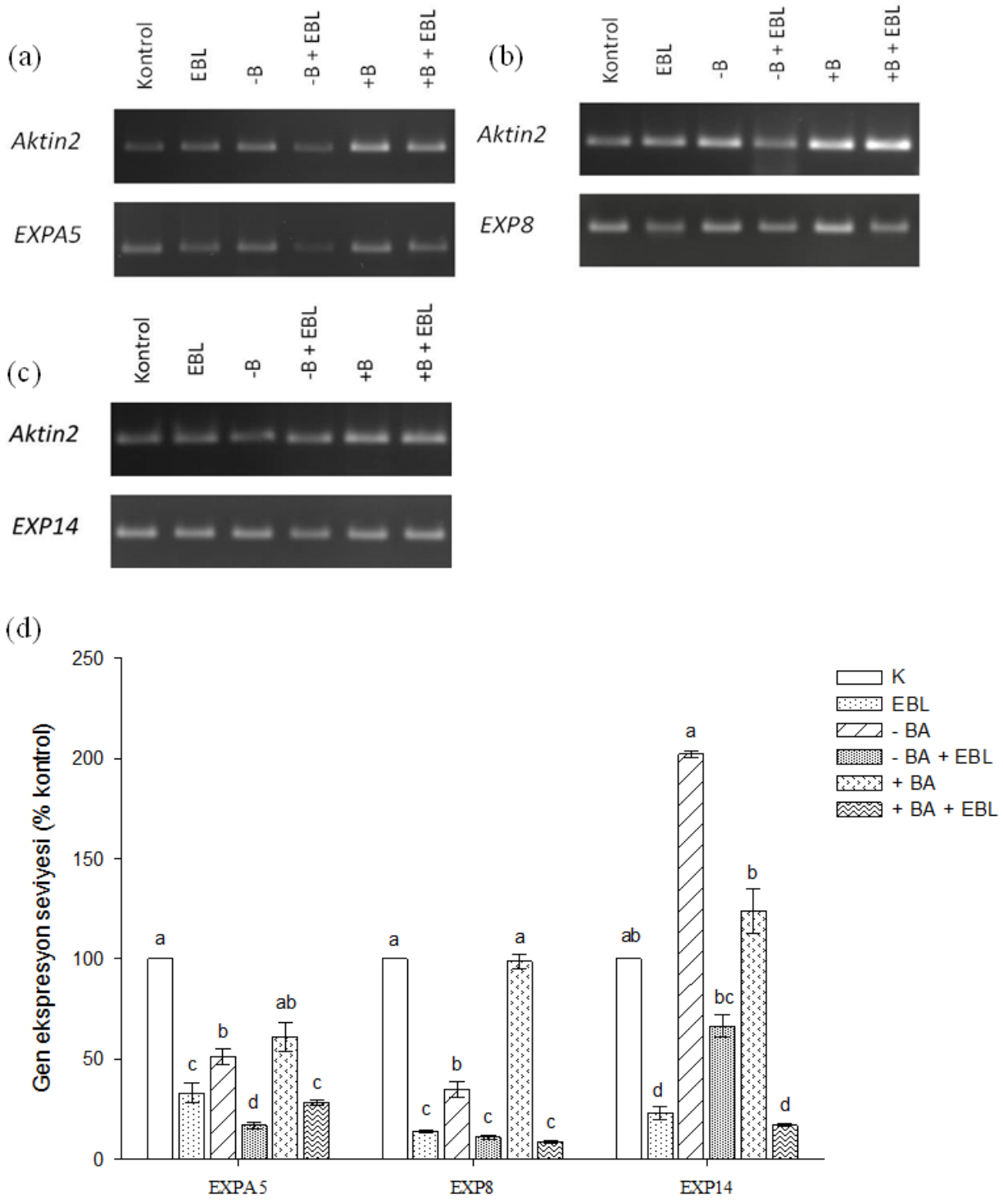


Şekil 21: Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *CESA1* genine ait jel görüntüsü, (b) *CESA4, CESA6 ve CSLB5* genlerine ait jel görüntüsü, (c) *CESA8* genine ait jel görüntüsü ve (d) *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8 ve CSLB5* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

EXPA5 geninin ekspresyonu BA içermeyen ortamda kök örneklerinde 1.97 oranında azalmış ve bu azalma istatistiki önem arz etmektedir. 1 µM EBL uygulaması *EXPA5* geninin ekspresyonunda 3.03 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişmeye neden olmuştur. Bununla birlikte, EBL hormonu 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 6.01 ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında 3.53 oranda önemli azalmalar tespit edilmiştir (Tablo 8, Şekil 22).

Borik asit ve/veya EBL uygulamaları ile ekspresyon seviyesi değişen diğer bir gen *EXP8* geni olmuştur ve *EXPA5* geninin ekspresyonuna benzer ekspresyon profili göstermiştir (Tablo 8, Şekil 21 ve 22). 3000 µM BA uygulaması *EXP8* geninin mRNA seviyesini kontrole göre değiştirmez iken, 0 µM BA uygulaması *EXP8* geninin mRNA seviyesini 2,86 oranında azaltmıştır (Tablo 8). 1 µM EBL hormonu tek başına uygulandığında 7.17, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 9.11 ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 11.28 oranında bir azalmaya sebep olmuştur. Uygulamalar sonucu *EXP8* geninin mRNA seviyesinde meydana gelen tüm değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 22).

EXP14 geninin ekspresyonunda 0 µM BA ve 3000 µM BA uygulamaları sonucu meydana gelen değişimler kontrole göre istatistiki önem taşımamaktadır (Şekil 22). 1 µM EBL uygulaması tek başına ya da 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında *EXP14* geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler meydana getirmiştir (Şekil 22). EBL hormonu tek başına uygulandığında 4.34 oranda, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise ekspresyonu 5.92 oranında azaltmıştır (Tablo 8).

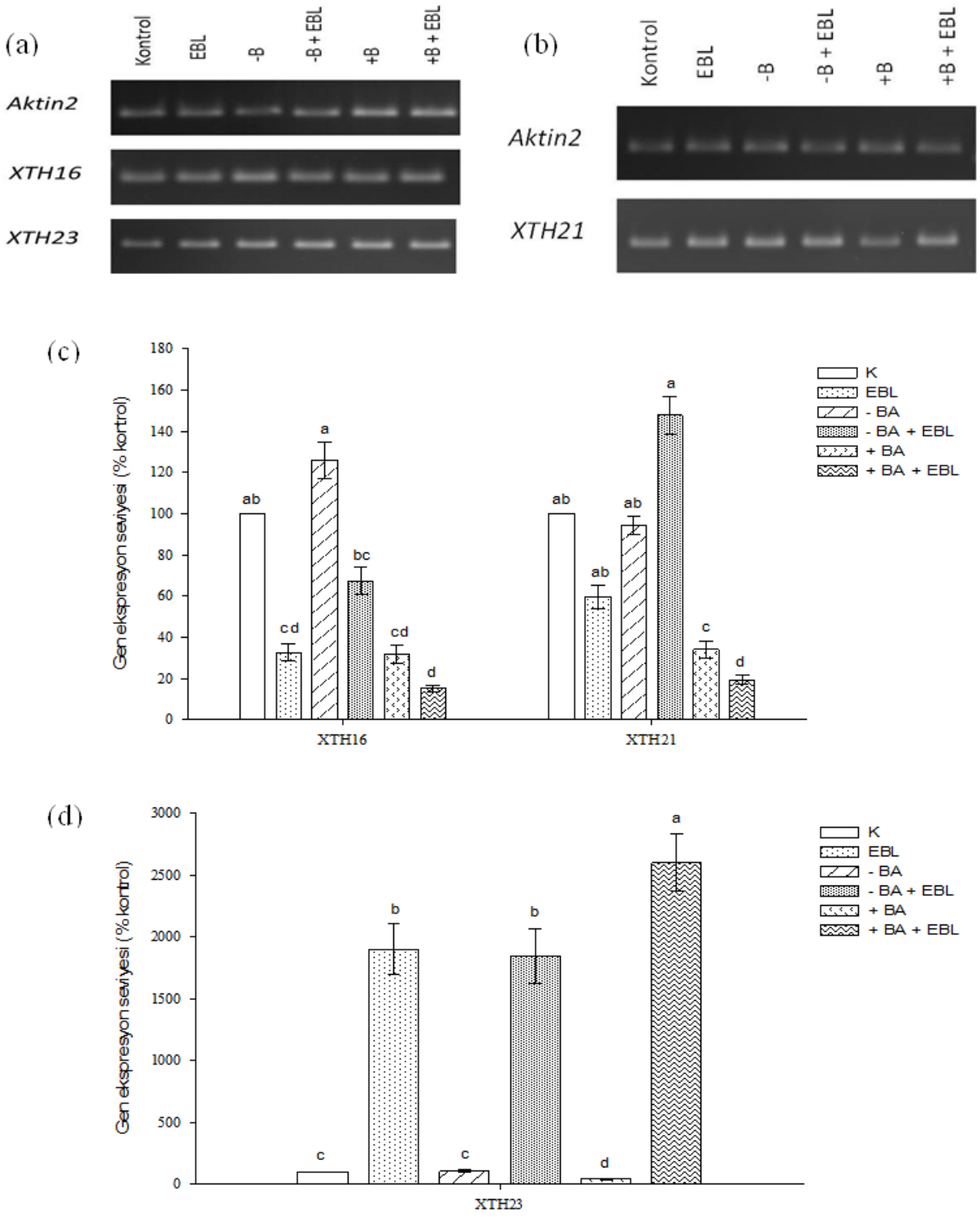


Şekil 22: Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *EXPA5* genine ait jel görüntüsü, (b) *EXP8* genine ait jel görüntüsü, (c) *EXP14* genine ait jel görüntüsü ve (d) *EXPA5, EXP8 ve EXP14* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Tek başına yapılan 1 µM EBL hormonu *XTH16* geninin ekspresyonunu 3.05 oranında azaltırken, 0 µM BA ve 0 µM BA uygulaması ile birlikte yapılan EBL uygulaması genin ekspresyonunu kontrole göre değiştirmemiştir (Tablo 8). 24 saat boyunda yapılan 3000 µM BA uygulaması *XTH16* geninin ekspresyonunu 3.13 oranında, EBL hormonu ile birlikte uygulandığında ise 6.54 oranında azaltmış ve meydana gelen bu azalmalar istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Tablo 8 ve Şekil 23).

XTH21 gen ekspresyonunu tek başına yapılan ya da 0 µM BA ile birlikte yapılan EBL uygulamaları sonucu kontrol ile benzer ekspresyon sonuçları verirken, 3000 µM BA uygulaması *XTH21* gen ekspresyonunu 2.93 oranında azaltmış, 1 µM EBL ile birlikte uygulandığında ise kontrole göre 5.17 oranında azalma tespit edilmiştir (Tablo 8).

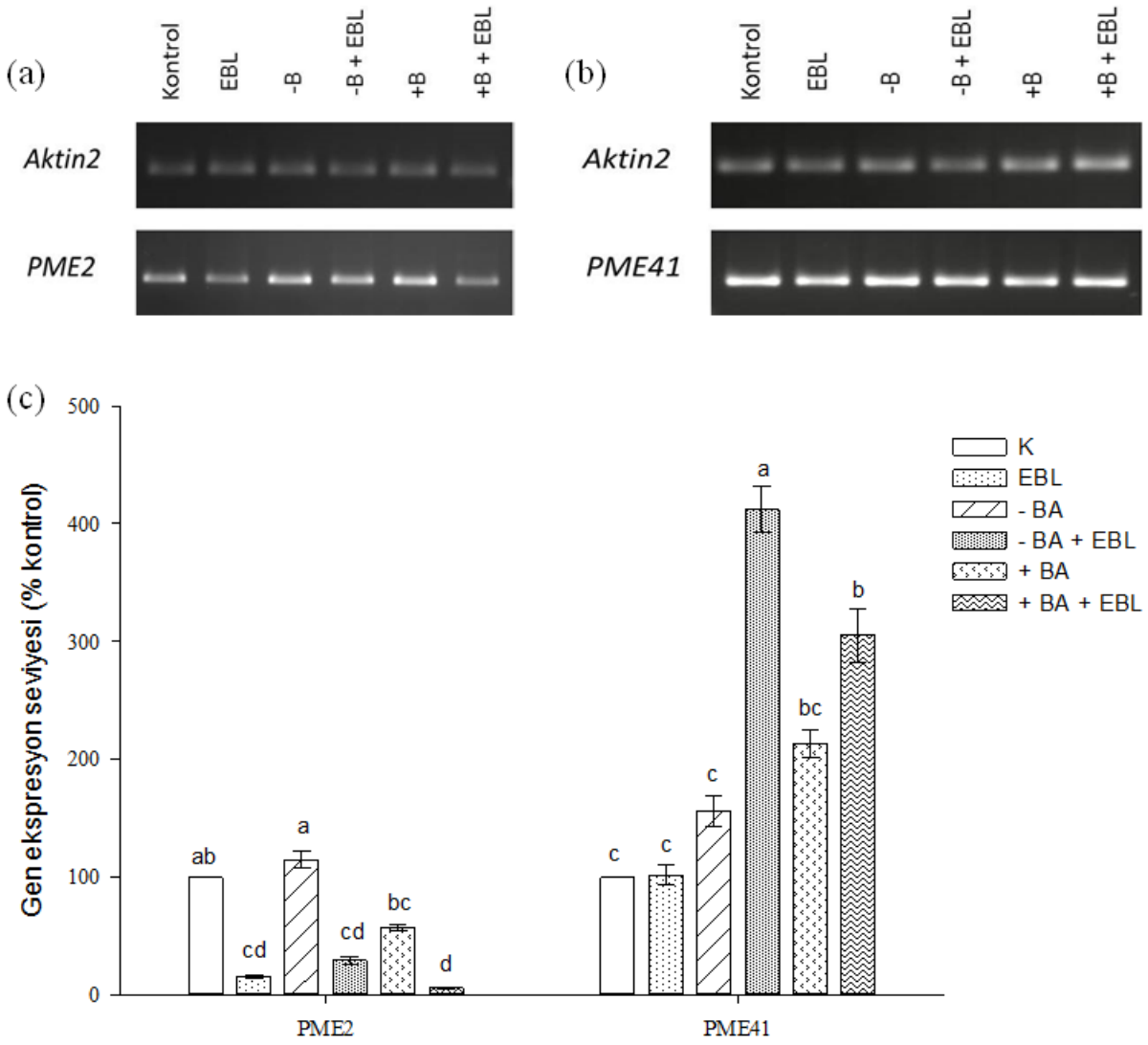
3000 µM BA uygulaması *XTH23* gen ekspresyon seviyesini kontrole göre istatistiki açıdan anlamlı bulunacak derecede azaltmıştır (2.32 oranında) (Şekil 23). 1 µM EBL tek başına uygulandığında *XTH23* geninin ekspresyonunu 19,03 oranında dramatik bir şekilde arttırmıştır. EBL hormonunun iki farklı borik asit konsantrasyonuyla birlikte uygulaması sonucunda da ekspresyonda artışlar tespit edilmiştir. 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 18.45 oranında, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 26.00 oranında istatistiki açıdan da önemli olan artışlar meydana gelmiştir (Tablo 8 ve Şekil 23).



Şekil 23: Beş haftalık bikilerin kök örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *XTH16 ve XTH23* genlerine ait jel görüntüsü, (b) *XTH21* genine ait jel görüntüsü, (c) *XTH16 ve XTH21* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol) ve (d) *XTH23* geninin ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

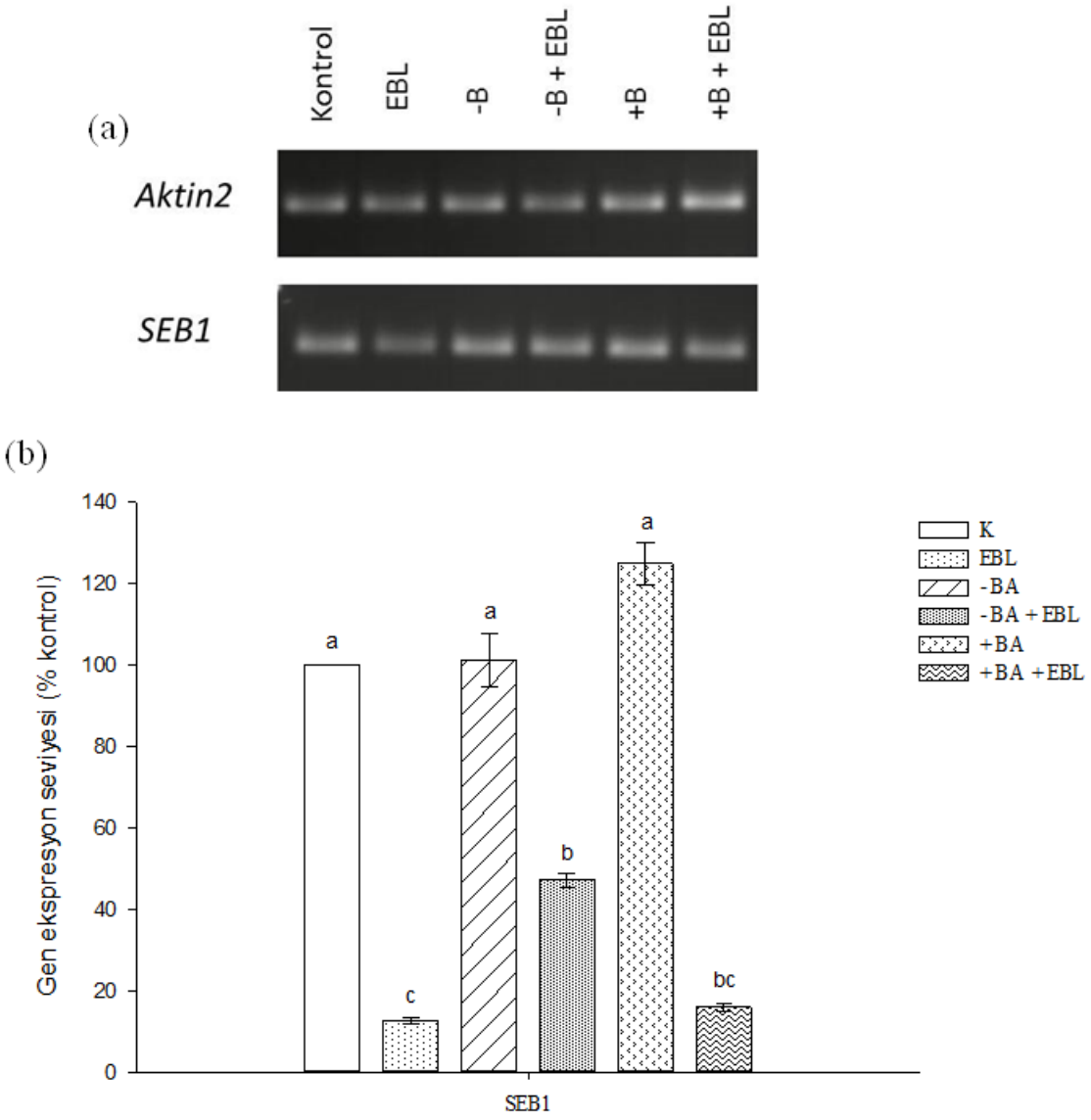
PME2 geninin ekspresyon seviyesi 0 µM ve 3000 µM BA uygulamaları sonucu kontrole göre değişmez iken, 1 µM EBL hormonu tek başına uygulandığında kontrole göre ekspresyonu 6.40 oranında azaltmıştır (Tablo 8). EBL hormonu, 0 µM BA ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında sırasıyla ekspresyonu 3.37 ve 16.83 oranında azaltmıştır. Uygulamalar sonucu oluşan azalmalar istatistiki önem arz etmektedir (Şekil 24).

BA uygulamaları *PME41* geninin ekspresyonunu kontrole göre düşük oranlarda arttırmış, ancak bu artış istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 24). 1 µM EBL uygulaması tek başına kontrole göre *PME41* geninin ekspresyonunu değiştirmemiştir. 1 µM EBL hormonu 0 µM BA ile birlikte uygulandığında ekspresyonu 4.12 oranında, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 3.05 oranında artış sağlamıştır ve bu artışlar istatistiki bakımdan anlamlıdır (Tablo 8 ve Şekil 24).



Şekil 24: Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *PME2* genine ait jel görüntüsü, (b) *PME41* genine ait jel görüntüsü ve (c) *PME2 ve PME41* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

SEB1 geni 0 ve 3000 µM BA uygulaması sonucu kontrole göre benzer ekspresyon seviyesi göstermiştir. 1 µM EBL hormonu hem tek başına hem de BA ile birlikte uygulandığında genin ekspresyon seviyesini kontrole göre azaltmıştır (Tablo 8, Şekil 25). Tek başına hormon uygulaması kontrole göre 7.94 oranında, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 2.12 oranında ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında 6.43 oranında istatistiki bakımdan önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 8, Şekil 25).



Şekil 25: Beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü. (a) *SEB1* genine ait jel görüntüsü ve (b) *SEB1* ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Tablo 8: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)

Gen isimleri	Uygulamalar					
	Kontrol	**EBL**	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	1.00 ± 0.13	-1.80 ± 0.54	1.08 ± 0.09	-1.88 ± 0.11	-1.57 ± 0.04	-2.08 ± 0.02
CESA4	1.00 ± 0.09	-2.06 ± 0.01	-2.22 ± 0.02	-2.46 ± 0.01	-2.25 ± 0.04	-2.18 ± 0.03
CESA6	1.00 ± 0.12	-1.40 ± 0.04	-1.21 ± 0.05	-1.20 ± 0.06	-1.49 ± 0.06	1.21 ± 0.07
CESA8	1.00 ± 0.02	-1.71 ± 0.04	-1.35 ± 0.03	1.48 ± 0.09	-1.90 ± 0.03	-1.07 ± 0.04
CSLB5	1.00 ± 0.09	-6.15 ± 0.01	-1.15 ± 0.07	-7.66 ± 0.20	-2.22 ± 0.05	-22.47 ± 0.40
EXPA5	1.00 ± 0.05	-3.03 ± 0.05	-1.97 ± 0.18	-6.01 ± 0.02	-1.63 ± 0.04	-3.53 ± 0.09
EXP8	1.00 ± 0.13	-7.17 ± 0.11	-2.86 ± 0.07	-9.11 ± 0.02	-1.01 ± 0.09	-11.28 ± 0.02
EXP14	1.00 ± 0.13	-4.34 ± 0.03	2.02 ± 0.19	-1.50 ± 0.03	1.23 ± 0.02	-5.92 ± 0.01
XTH16	1.00 ± 0.13	-3.05 ± 0.03	1.26 ± 0.18	-1.48 ± 0.10	-3.13 ± 0.11	-6.54 ± 0.00
XTH21	1.00 ± 0.09	-1.67 ± 0.03	1.06 ± 0.01	1.48 ± 0.35	-2.93 ± 0.07	-5.17 ± 0.03
XTH23	1.00 ± 0.12	19.03 ± 1.65	1.05 ± 0.14	18.45 ± 0.39	-2.32 ± 0.03	26.00 ± 0.65
PME2	1.00 ± 0.02	-6.40 ± 0.02	1.14 ± 0.16	-3.37 ± 0.06	-1.75 ± 0.05	-16.83 ± 0.01
PME41	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.04	1.54 ± 0.12	4.12 ± 0.41	2.10 ± 0.16	3.05 ± 0.34
SEB1	1.00 ± 0.09	-7.94 ± 0.06	1.01 ± 0.05	-2.12 ± 0.04	1.24 ± 0.09	-6.43 ± 0.08

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

3.2.2 On Haftalık Bitkilerin Rozet Yaprak ve Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinde belirlenen 14 gene ait mRNA seviyeleri RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Rozet yaprak ve kök örneklerinde incelenen genlere ait jel görüntüleri ve mRNA seviyelerini gösteren grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 26-35). Genlere ait jel görüntüleri internal kontrol olan *Aktin2* housekeeping genine ait jel görüntüsü ile birlikte verilmiştir. Çalışılan genler arasında primerlerinin bağlanma sıcaklıkları aynı olan genler tekerrürleri ile birlikte aynı anda çalışılmıştır. Her PCR reaksiyonunda mutlaka *Aktin2* geni kullanılmıştır. On haftalık *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin rozet yaprak ve kök örneklerinde araştırılan genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes) Tablo 9 ve 10' da verilmiştir.

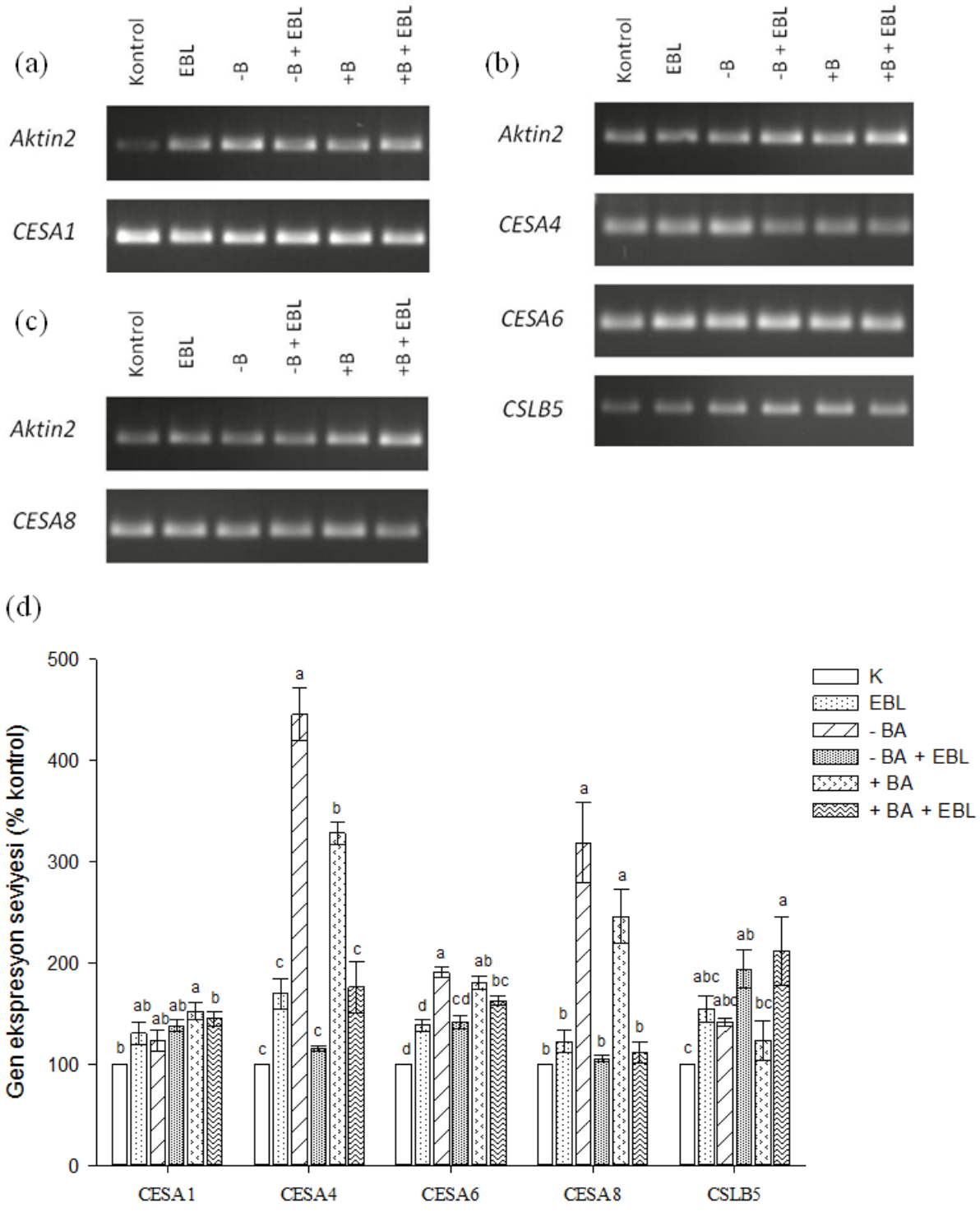
3.2.2.1 Rozet Yaprak Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

On haftalık bitkilere 24 saat boyunca yapılan BA ve/veya EBL uygulamaları yapılmış ve rozet yaprak örneklerinde beş haftalık yaprak örneklerine benzer şekilde *CESA1* geninin ekspresyonunda kontrole göre meydana gelen değişim istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 26).

1 µM EBL hormonunun tek başına ya da iki farklı BA konsantrasyonu ile birlikte uygulanması *CESA4* ve *CESA 8* genlerinin ekspresyonunda istatistiki bakımdan önem arz edecek değişiklikler meydana getirmemiştir (Şekil 26). Bununla birlikte *CESA4* gen ekspresyon seviyesi BA içermeyen ortamda 4.44 oranında, 3000 µM BA uygulaması sonucunda ise 3.28 oranında artmıştır (Tablo 9). *CESA8* geni ekspresyon seviyesi ise BA içermeyen ortamda 3.19 oranında, 3000 µM BA uygulaması sonucunda ise 2.45 oranında artmıştır ve bu artışlar önemli bulunmuştur (Tablo 9, Şekil 26).

CESA6 geninin ekspresyon profili *CESA4* ve *CESA8* genlerine benzer ekspresyon profili göstermiştir. Tek başına ve BA içermeyen ortama ilaveli 1 µM EBL uygulaması *CESA6* geninin ekspresyon seviyesinde meydana getirdiği değişiklik istatistiki açıdan anlamsız bulunurken, BA içermeyen ortam *CESA6* geninin ekspresyonunu 1.91 oranında arttırmıştır (Tablo 9, Şekil 26). Yüksek konsantrasyonda BA içeren ortam ve bu ortama ilaveli EBL hormonu ekspresyonu sırasıyla 1.80 ve 1.62 oranlarında arttırmıştır (Tablo 9).

Tek başına yapılan 1 µM EBL, 0 µM BA ve 3000 µM BA uygulamaları *CSLB5* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre istatistiki açıdan anlamsız olacak şekilde değiştirmiştir (Şekil 26). Fakat 1 µM EBL uygulaması 0 µM BA veya 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında sırasıyla 1.94 ve 2.12 oranlarında istatistiki önem arz edecek şekilde arttırmıştır (Tablo 9).

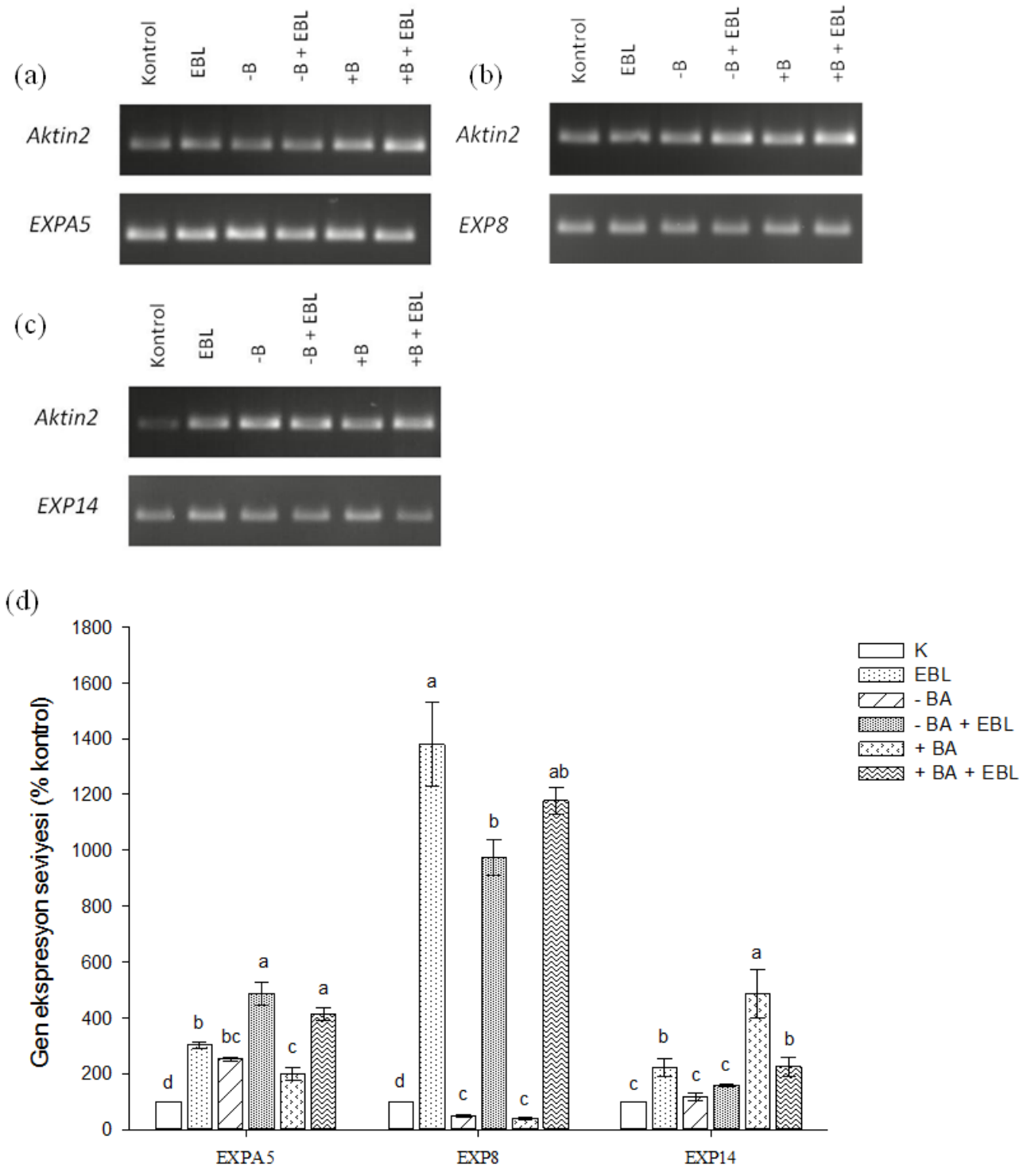


Şekil 26: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *CESA1* genine ait jel görüntüsü, (b) *CESA4, CESA6 ve CSLB5* genlerine ait jel görüntüsü, (c) *CESA8* genine ait jel görüntüsü ve (d) *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8 ve CSLB5* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

24 saat boyunca yapılan EBL uygulamaları on haftalık bitkilerin rozet yapraklarında *EXPA5* geninin ekspresyon seviyesini kontrole 3.01 oranında göre değiştirmiştir. 0 µM BA uygulaması sonucunda 2.52 oranında, 3000 µM BA uygulaması sonucunda ise 1.98 oranında artış tespit edilmiştir (Tablo 9). 0 µM BA ile 1 µM EBL hormonunun birlikte uygulaması kontrole göre 4.87 oranında, 3000 µM BA ile 1 µM EBL hormonunun birlikte uygulaması ise kontrole göre 4,14 oranında arttırmıştır (Tablo 9). Kontrole göre meydana gelen bu artma ve azalmaların tümü istatistiki bakımdan önemli bulunmuştur (Tablo 9, Şekil 27).

On haftalık bitkilerin yapraklarında görülen *EXP8* gen ekspresyon profili beş haftalık bitkilerin yapraklarında görülen ekspresyon profiline benzer sonuçlar vermiştir. 0 µM ve 3000 µM BA uygulamaları kontrole göre *EXP8* geninin ekspresyonunu 2.08 ve 2.50 oranlarında istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde azaltmıştır. EBL hormonu tek başına ya da BA uygulamaları ile birlikte uygulandığında *EXP8* geninin ekspresyonunu dramatik bir şekilde arttırmıştır. 1 µM EBL uygulaması kontrole göre 13.78 oranında, 0 µM BA ile birlikte uygulandığında 9.73 ve 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında 11.77 oranında ekspresyon artışı görülmüştür (Tablo 9, Şekil 27).

BA içermeyen ortamda *EXP14* geninin ekspresyon seviyesinde gözlenen artış istatistiki bakımdan anlamsız bulunmuştur. 3000 µM BA uygulaması *EXP14* geninin ekspresyonunda 4.84 oranında artış sağlamıştır (Tablo 9). 1 µM EBL hormon uygulaması ise tek başına uygulandığında kontrole göre 2.20, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında ise 2.24 oranında istatistiki bakımdan önem arz edecek artış sağlamıştır (Tablo 9, Şekil 27).

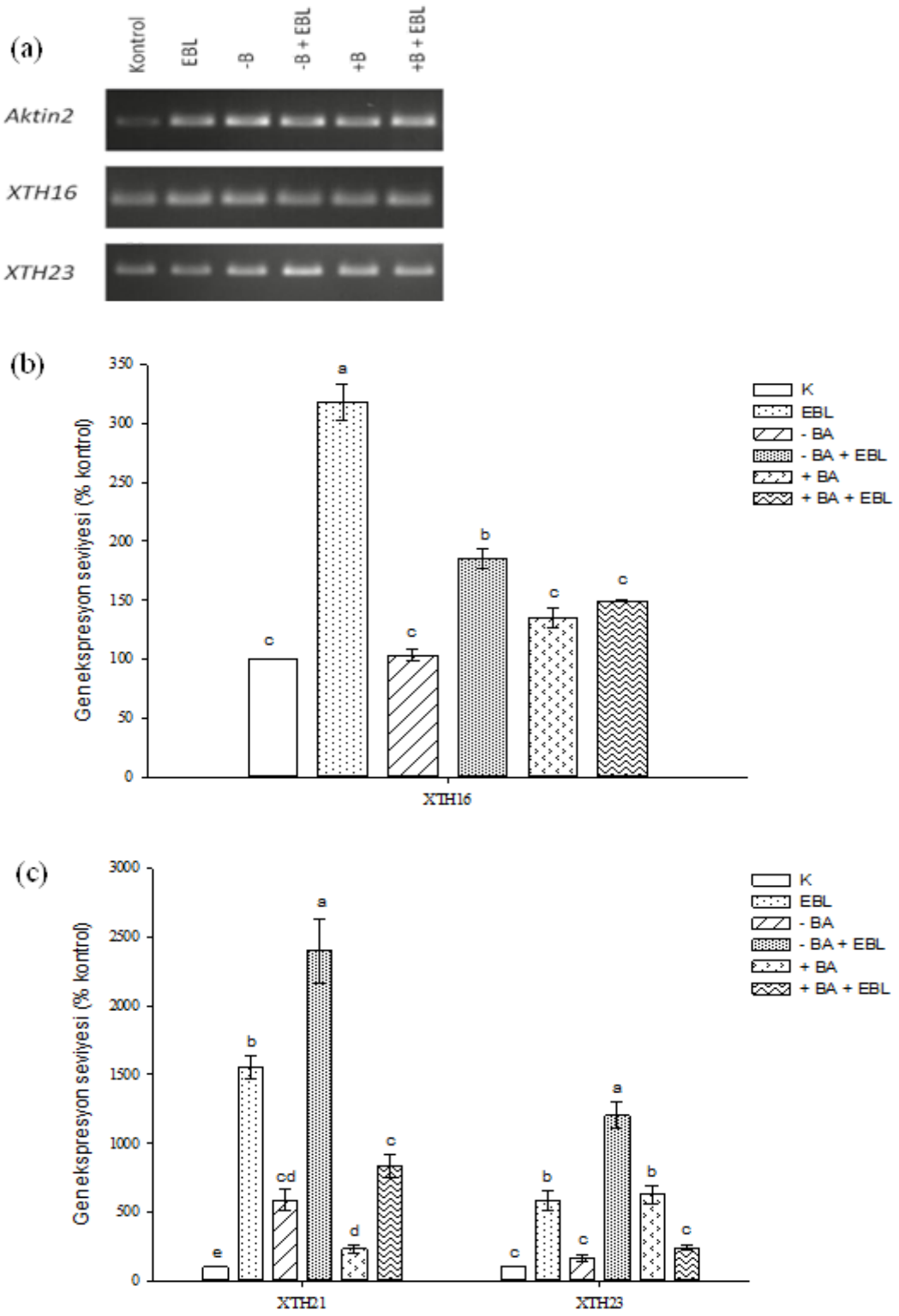


Şekil 27: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *EXPA5* genine ait jel görüntüsü, (b) *EXP8* genine ait jel görüntüsü, (c) *EXP14* genine ait jel görüntüsü ve (d) *EXPA5, EXP8 ve EXP14* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

1 µM EBL hormon uygulaması sonucu *XTH16* geninin ekspresyonunda kontrole göre 3.17 oranında artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte BA içermeyen ortamda *XTH16* geninin ekspresyonu kontrole göre anlamlı bir değişiklik göstermez iken, 1 µM EBL ile birlikte uygulandığında ekspresyonu 1.85 oranında artırmıştır (Tablo 9, Şekil 28).

Yapılan bütün BA ve/veya EBL uygulamaları *XTH21* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre arttırmıştır ve meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 9). Tek başına 0 µM BA ve 3000 µM BA uygulamaları sırasıyla ekspresyonu 5.83 ve 2.30 oranında arttırmıştır. EBL hormonu uygulaması hem tek başına hem de BA uygulamaları ile birlikte yüksek oranda artış meydana getirmiştir. 1 µM EBL tek başına uygulaması *XTH21* geninin ekspresyonunu kontrole göre 15.52 oranında, 0 µM BA ile birlikte 24.00, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında kontrole göre 8.34 oranında anlamlı artışlar tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 28).

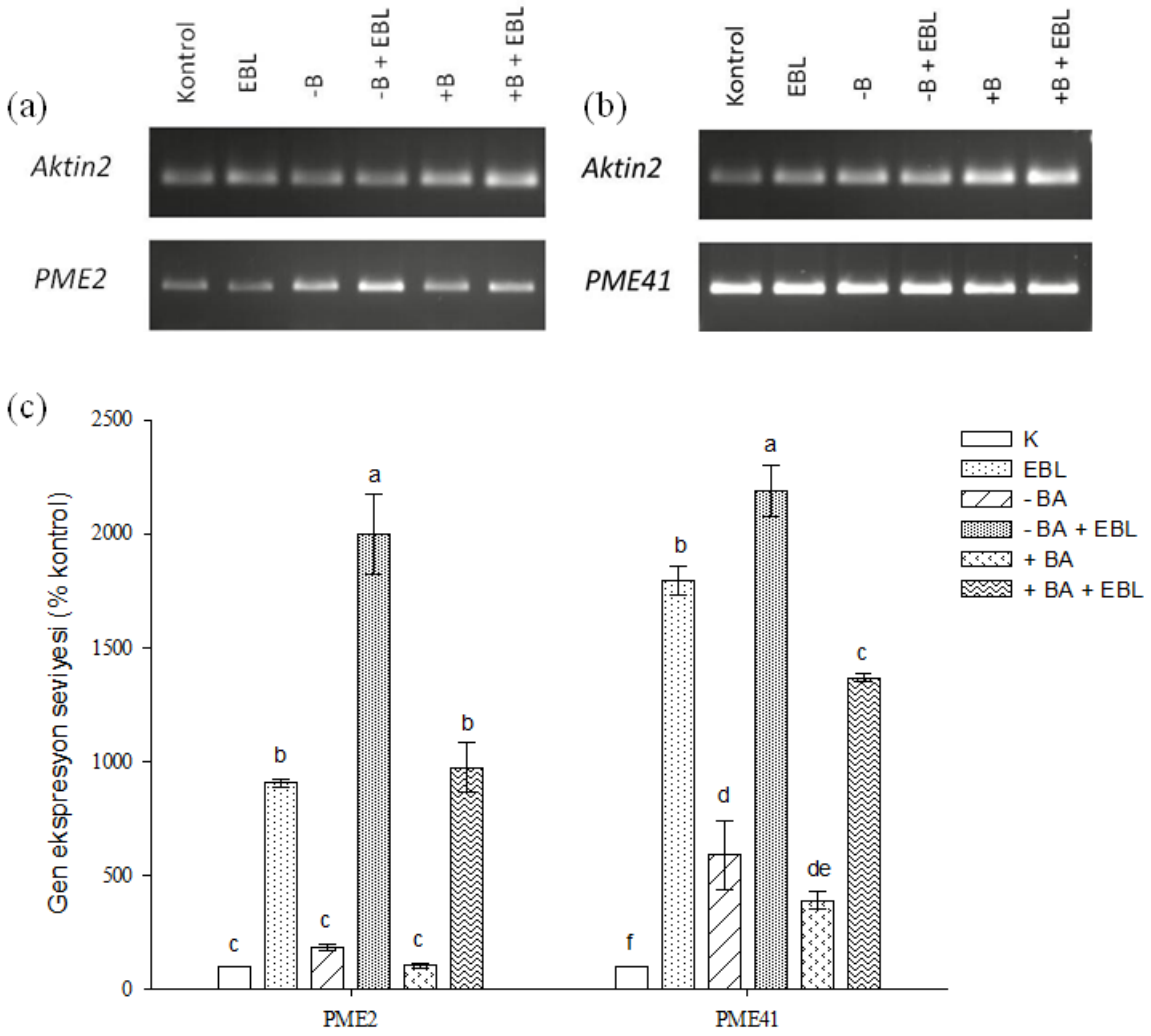
XTH23 geninin ekspresyonu 3000 µM BA uygulaması sonucu 6,27 oranındaki artış meydana gelmiştir. 1 µM EBL uygulaması gen ekspresyon seviyesini kontrole göre 5.86, 0 µM BA ile birlikte yapılan EBL hormonu uygulaması ise 12,02 oranında arttırmıştır (Tablo 9). Kontrole göre tespit edilen ekpresyon artışları istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 28).



Şekil 28: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *XTH16 ve XTH23* genlerine ait jel görüntüsü, (b) *XTH16* geninin ekspresyon seviye grafiği (% kontrol) ve (c) *XTH21 ve XTH23* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

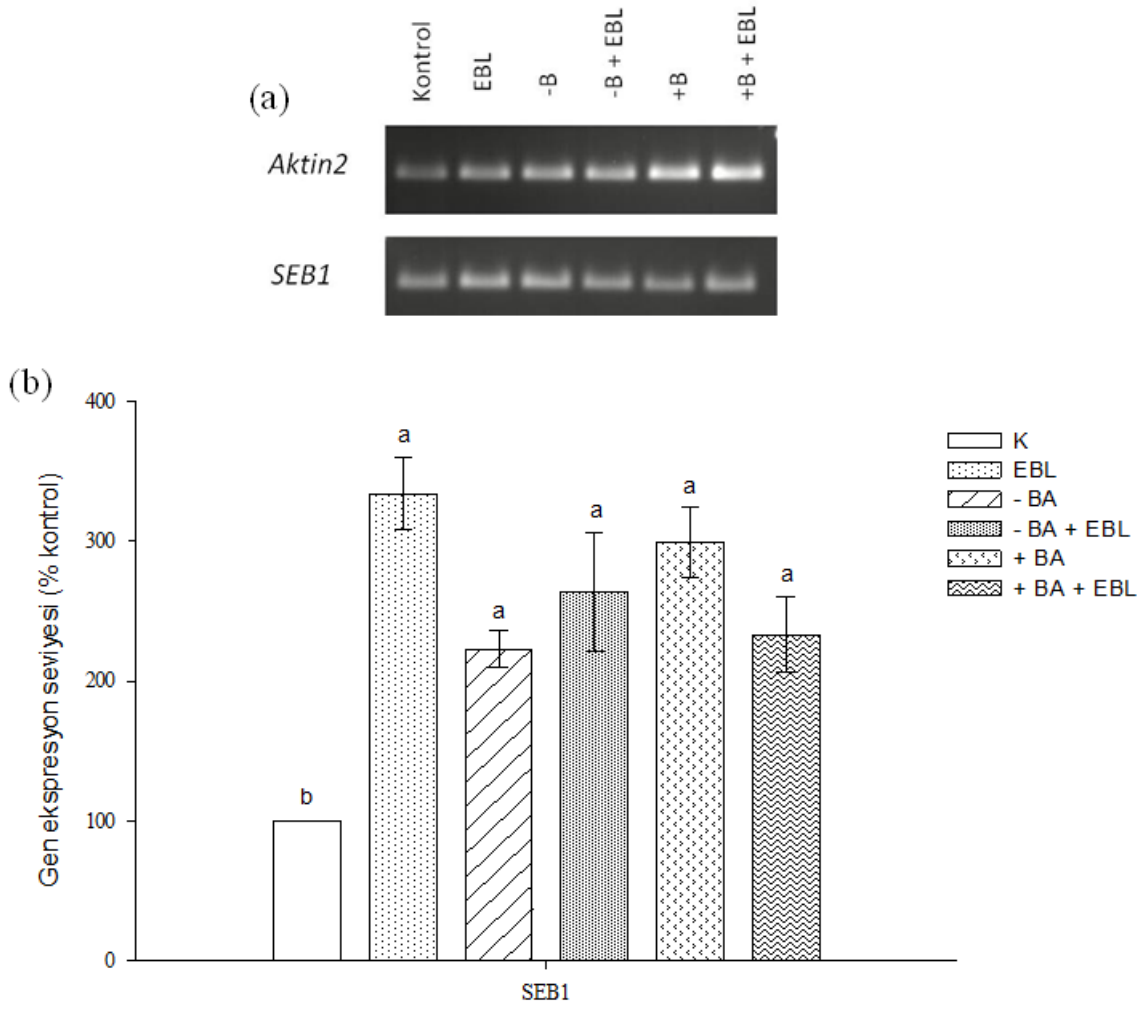
Yapılan uygulamalar arasında 1 µM EBL hormonunun tek başına ya da 0 µM veya 3000 µM BA ile birlikte uygulamaları sonucu *PME2* geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler istatistiki bakımdan anlamlı bulunmuştur (Şekil 29). Tek başına 1 µM EBL uygulaması kontrole göre 9.07 oranında, 0 µM BA ile birlikte uygulamasında 19.96 oranında ve 3000 µM BA ile birlikte uygulamasında ise 9.74 oranında artış sağlamıştır (Tablo 9).

Uygulamalar sonucunda gen ekspresyonu artan diğer bir gen ise *PME41*'dir. 0 ve 3000 µM BA uygulaması genin ekspresyon seviyesi sırasıyla 5.89 ve 3.91 oranında artmıştır (Tablo 9). 1 µM uygulaması tek başına uygulandığından 17.93 oranında artış sağlarken 0 µM BA ile birlikte uygulaması sonucu 21.90, 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında 13.66 oranında artış tespit edilmiştir. Kontrole göre meydana gelen ekpresyon artışları istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 9, Şekil 29).



Şekil 29: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *PME2* genine ait jel görüntüsü, (b) *PME41* genine ait jel görüntüsü ve (c) *PME2 ve PME41* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

On haftalık *A.thaliana* bitkilerinin rozet yaprak örneklerinde *SEB1* gen ekspresyon seviyesi 24 saat boyunca yapılan BA ve/veya EBL uygulamaları sonucunda kontrole göre artış göstermiştir. Meydana gelen artış istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur.



Şekil 30: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü. (a) *SEB1* genine ait jel görüntüsü ve (b) *SEB1* ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Tablo 9: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)

Gen isimleri	Uygulamalar					
	Kontrol	**EBL**	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	1.00 ± 0.08	1.29 ± 0.09	1.23 ± 0.10	1.38 ± 0.05	1.52 ± 0.17	1.44 ± 0.15
CESA4	1.00 ± 0.02	1.69 ± 0.14	4.44 ± 0.07	1.15 ± 0.01	3.28 ± 0.41	1.76 ± 0.15
CESA6	1.00 ± 0.07	1.38 ± 0.12	1.91 ± 0.05	1.41 ± 0.12	1.80 ± 0.21	1.62 ± 0.13
CESA8	1.00 ± 0.09	1.21 ± 0.12	3.19 ± 0.27	1.05 ± 0.09	2.45 ± 0.13	1.11 ± 0.08
CSLB5	1.00 ± 0.04	1.54 ± 0.07	1.41 ± 0.03	1.94 ± 0.13	1.23 ± 0.12	2.12 ± 0.20
EXPA5	1.00 ± 0.11	3.01 ± 0.32	2.52 ± 0.18	4.87 ± 0.40	1.98 ± 0.12	4.14 ± 0.28
EXP8	1.00 ± 0.07	13.78 ± 1.22	-2.08 ± 0.01	9.73 ± 0.27	-2.50 ± 0.06	11.77 ± 0.95
EXP14	1.00 ± 0.09	2.20 ± 0.19	1.17 ± 0.06	1.58 ± 0.21	4.84 ± 0.60	2.24 ± 0.46
XTH16	1.00 ± 0.10	3.17 ± 0.41	1.03 ± 0.07	1.85 ± 0.21	1.34 ± 0.15	1.49 ± 0.09
XTH21	1.00 ± 0.16	15.52 ± 3.55	5.83 ± 0.28	24.00 ± 2.30	2.30 ± 0.28	8.34 ± 0.17
XTH23	1.00 ± 0.07	5.86 ± 0.43	1.63 ± 0.17	12.02 ± 0.68	6.27 ± 0.72	2.38 ± 0.20
PME2	1.00 ± 0.11	9.07 ± 0.88	1.84 ± 0.14	19.96 ± 3.06	1.03 ± 0.12	9.74 ± 2.25
PME41	1.00 ± 0.17	17.93 ± 0.49	5.89 ± 0.47	21.90 ± 1.72	3.91 ± 0.27	13.66 ± 0.74
SEB1	1.00 ± 0.11	3.33 ± 0.07	2.23 ± 0.15	2.63 ± 0.13	2.99 ± 0.19	2.33 ± 0.15

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

3.2.2.2 Kök Örneklerinin RT-PCR Sonuçları

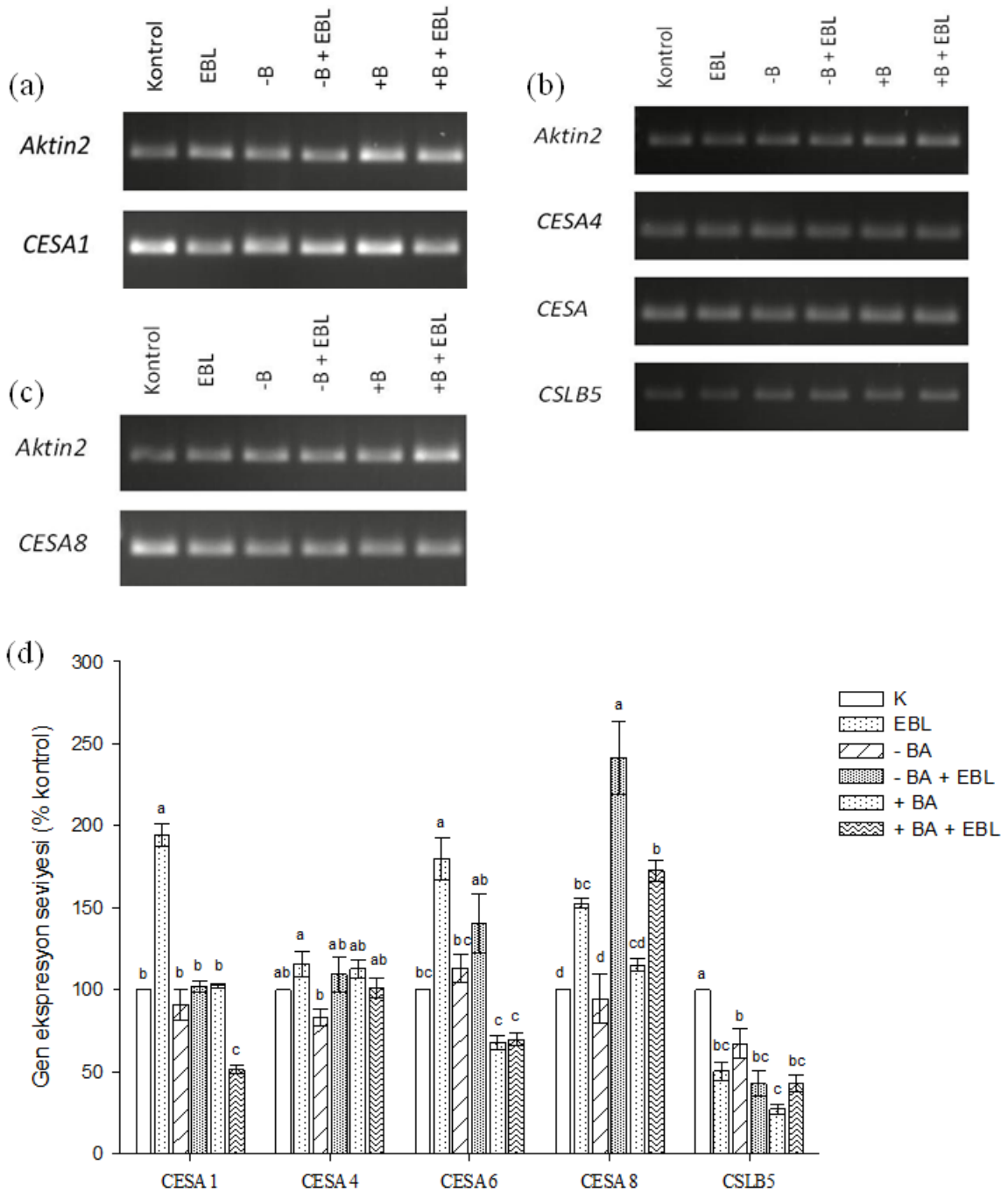
Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan on haftalık bitkilerin kök dokularında Real-Time PCR analizleri sonucunda *CESA1* geninin ekspresyonunun tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması sonucu 1.94 oranında artmıştır (Tablo 10). Bununla birlikte EBL hormonu 3000 µM BA ile birlikte uygulandığında kontrole göre ekspresyonu 1.94 oranında azaltmıştır. *CESA1* geninin ekspresyonunda meydana gelen bu değişimler istatistiki bakımdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 31).

BA ve/veya EBL uygulamaları sonucunda *CESA4* geninde kontrole göre düşük oranlarda artma veya azalma meydana gelmiştir. Fakat bu artma ve azalma oranları istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 31).

1 µM EBL hormon uygulaması sonucu *CESA6* gen ekspresyonunda 1.78 oranında artış tespit edilmiş ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Yapılan diğer uygulamalar ise ekspresyonu kontrole göre anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir (Tablo 10, Şekil 31).

0 µM ve 3000 µM BA uygulaması *CESA8* geninin ekspresyonunda kontrole kıyasla değişme meydana getirmez iken, tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması ekspresyonu 1.52 oranında arttırmıştır (Tablo 10). EBL hormonu BA içermeyen veya içeren ortama ilave edildiğinde ise ekspresyonu sırasıyla 2.41 ve 1.72 oranında istatistiki önem arz edecek şekilde arttırmıştır (Tablo 10, Şekil 31).

1 µM EBL uygulaması *CSLB5* geninin ekspresyonunu kontrole göre 2.01 oranında, 0 µM BA uygulaması 1.48 oranında, 3000 µM BA uygulaması ise 3.64 oranında azalmasını sağlamıştır (Tablo 10). EBL hormonu ilaveli 0 µM BA uygulaması ise ekspresyonu tek başına yapılan 0 µM BA uygulamasına nazaran daha da azaltmıştır (2.34 oranında). 3000 µM BA ve 1 µM EBL kombine uygulaması ise ekspresyonu 2.37 oranında azaltmıştır (Tablo 10, Şekil 31).

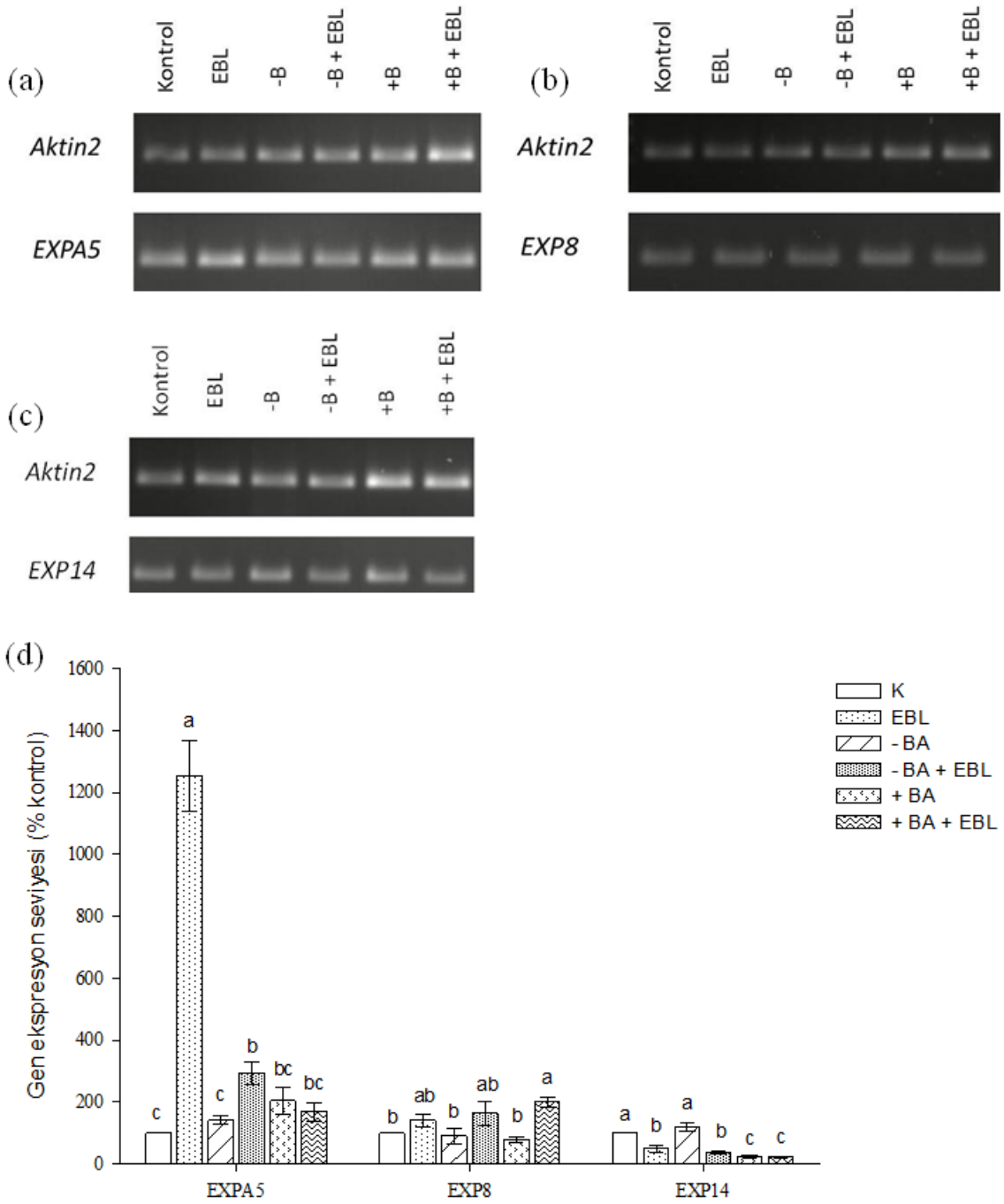


Şekil 31: On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde selüloz sintaz (CESA) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *CESA1* genine ait jel görüntüsü, (b) *CESA4, CESA6 ve CSLB5* genlerine ait jel görüntüsü, (c) *CESA8* genine ait jel görüntüsü ve (d) *CESA1, CESA4, CESA6, CESA8 ve CSLB5* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

24 saat boyunca yapılan 1 µM EBL uygulaması *EXPA5* geninin ekspresyon seviyesini dramatik bir şekilde kontrole göre 12.53 kat arttırmıştır (Tablo 10). 0 µM ve 3000 µM BA uygulaması *EXPA5* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre değiştirmez iken, 0 µM BA ortamına EBL hormonunun ilavesi ekspresyonu 2.93 oranında arttırmıştır (Tablo 10, Şekil 32).

EXP8 geninin ekspresyon seviyesi tek başına yapılan EBL hormonu ya da BA uygulamaları değiştirmez iken, 3000 µM BA ile birlikte yapılan EBL uygulaması kontrole göre ekspresyon seviyesini 2.00 oranında arttırmıştır ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 32).

0 µM BA uygulaması *EXP14* geninin ekspresyonunu kontrole göre değiştirmez iken, 1 µM ile birlikte uygulandığında ekspresyonu 2.60 oranında istatistiki bakımdan anlamlı olacak şekilde azaltmıştır (Tablo 10). 3000 µM BA uygulaması ve 3000 µM BA ile birlikte yapılan 1 µM EBL uygulaması ise ekspresyonu kontrole göre benzer oranlarda azaltmıştır (3.98 ve 4.41 oranında sırasıyla) (Tablo 10, Şekil 32).

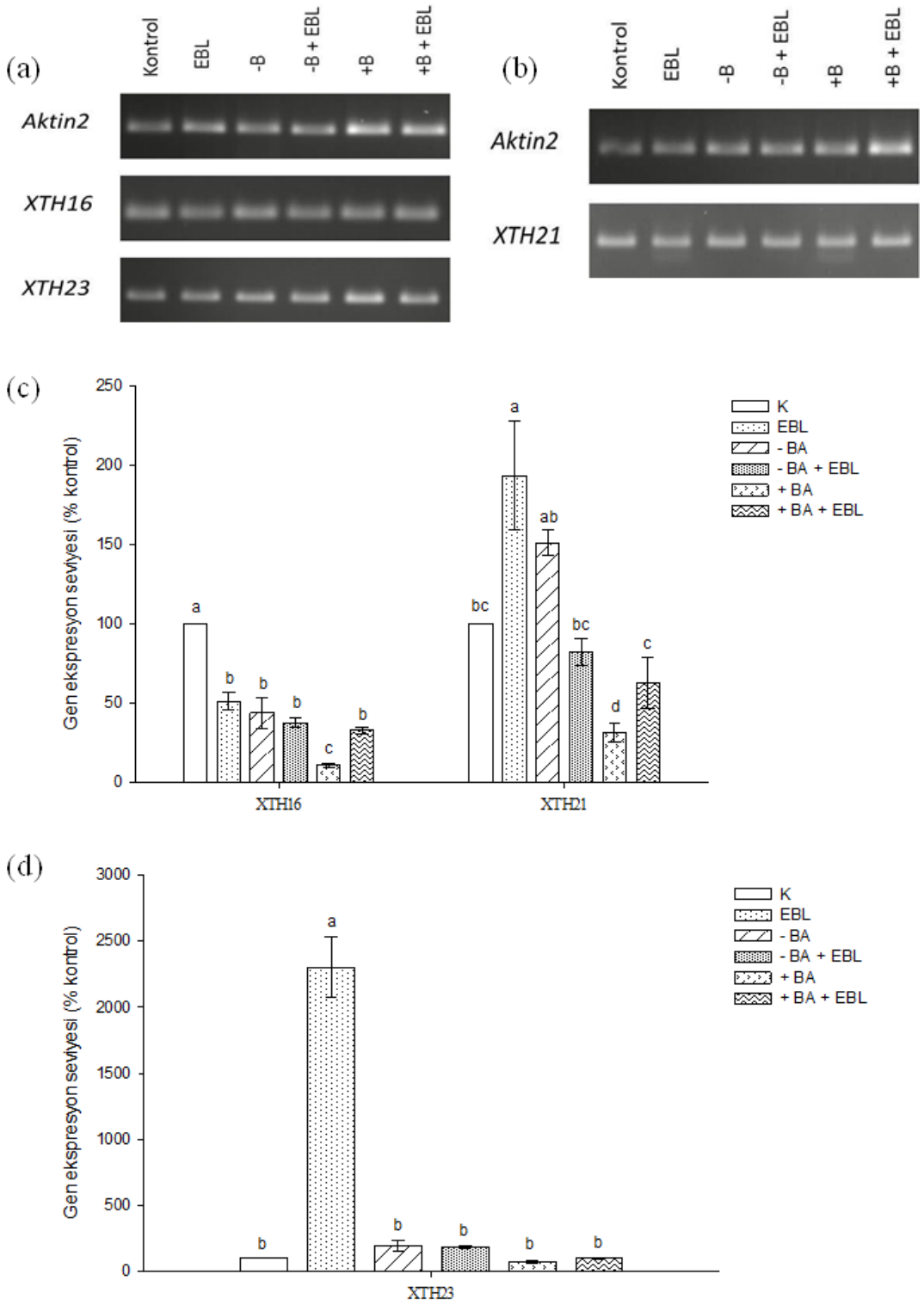


Şekil 32: On haftalık bitkilerin kök örneklerinde ekspansin (EXP) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *EXPA5* genine ait jel görüntüsü, (b) *EXP8* genine ait jel görüntüsü, (c) *EXP14* genine ait jel görüntüsü ve (d) *EXPA5, EXP8 ve EXP14* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

BA ve/veya EBL uygulamaları sonucunda *XTH16* geninin ekspresyonu kontrole göre istatistiki bakımdan anlamlı azalmalar göstermiştir (Şekil 33). 3000 µM BA uygulaması ekspresyon seviyesinde 9.25 oranında dramatik bir azalmaya neden olurken, diğer tüm uygulamalar benzer oranlarda (1.95 ile 3.04 arasında değişen oranlarda) azalmalar göstermiştir (Tablo 10, Şekil 33).

Tek başına yapılan 1 µM EBL uygulamasının *XTH21* geninin ekspresyonunu 1,93 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. 3000 µM BA uygulaması ekspresyonu kontrole göre 3.15 oranında azalmıştır (Tablo 10). Diğer uygulamalar ise kontrole göre istatistiki bakımdan önem arz edecek şekilde değiştirmemiştir (Tablo 10, Şekil 33).

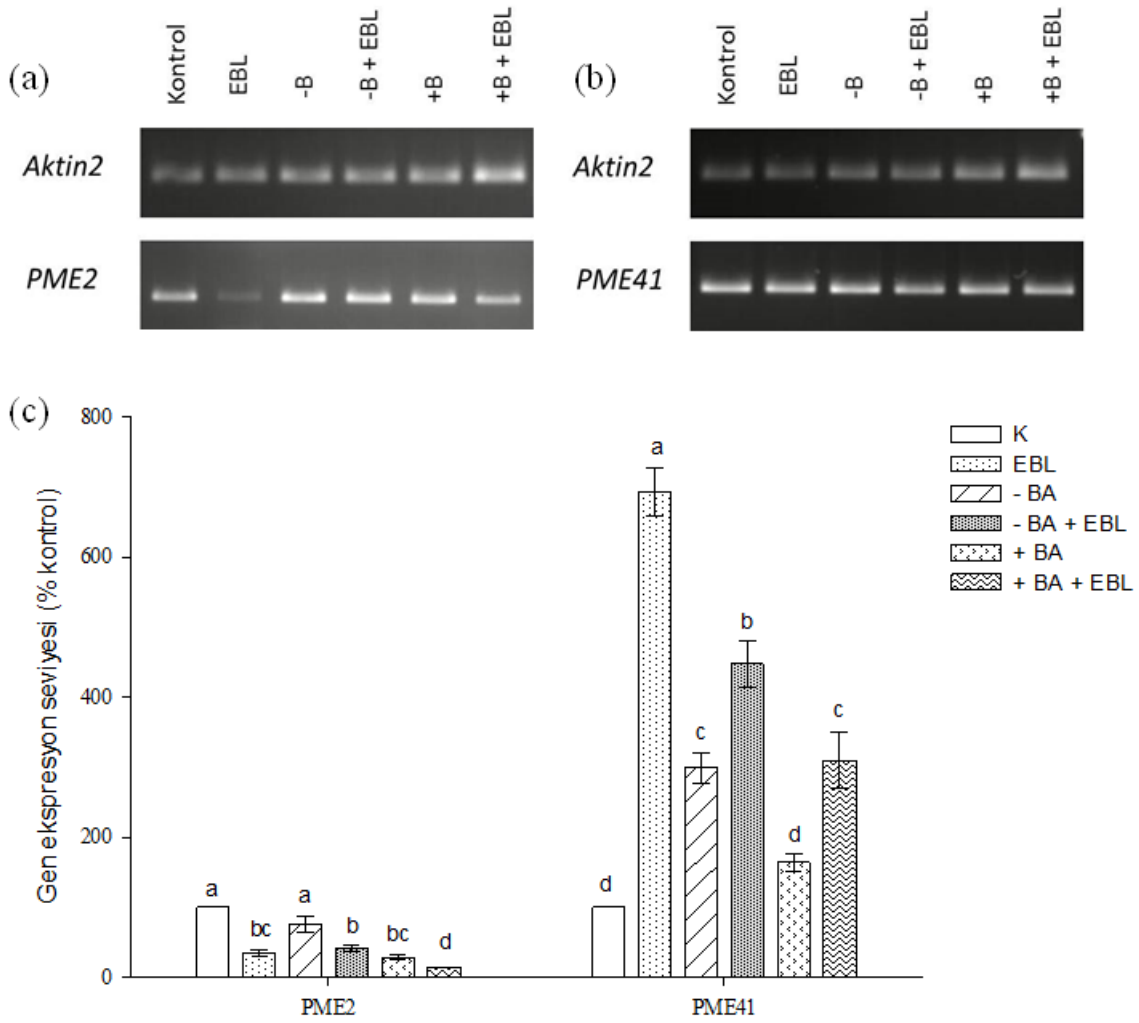
1 µM EBL uygulaması *XTH23* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre 23.01 oranında arttırmıştır. Tek başına BA uygulamaları ya da EBL ilaveli BA uygulamaları *XTH23* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre değiştirmemiştir (Tablo 10, Şekil 33).



Şekil 33: On haftalık bitkilerin kök örneklerinde ksiloglukan endo transglikosilaz /hidrolaz (XTH) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *XTH16 ve XTH23* genlerine ait jel görüntüsü, (b) *XTH21* genine ait jel görüntüsü, (c) *XTH16* ve *XTH21* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol) ve (d) *XTH23* geninin ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

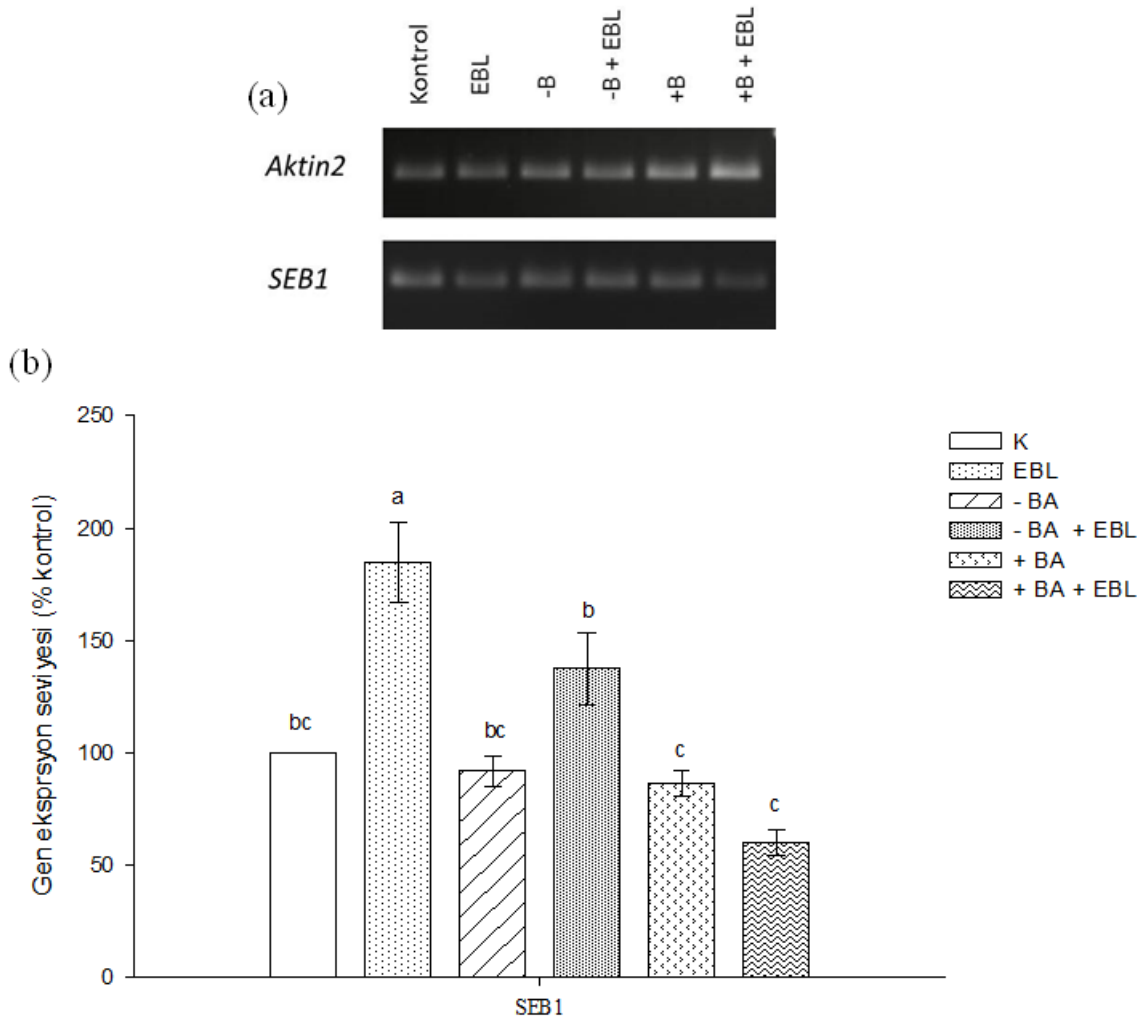
3000 µM BA uygulamaları *PME2* geninin ekspresyonunu kontrole göre 3.54 oranında azaltmıştır (Tablo 10). Tek başına 1 µM EBL uygulaması kontrole göre ekspresyonu 2.92 oranında azaltırken, BA içeren veya içermeyen ortama ilave edildiğinde ekspresyonu tek başına yapılan BA uygulamalarına nazaran daha azaltmıştır. Bu değişimler istatistiki bakımdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 34).

PME41 geninin ekspresyon seviyesi genel olarak yapılan uygulamalar sonucu artış göstermiştir. 3000 µM BA içeren ortamda *PME41* geninin ekspresyon seviyesi kontrole göre değişmez iken, 0 µM BA uygulaması ekspresyonu 2.99 oranında arttırmıştır (Tablo 10). 1 µM EBL uygulaması kontrole göre ekspresyonu 6.93 oranında arttırırken, 0 µM veya 3000 0 µM BA içeren ortama ilave edildiğinde ekspresyonu sırasıyla 4.47 ve 3.09 oranlarında istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırmıştır (Tablo 10, Şekil 34).



Şekil 34: On haftalık bitkilerin kök örneklerinde pektin metil esteraz (PME) gen ailesine ait bazı genlerin ekspresyon seviyeleri ve jel görüntüleri. (a) *PME2* genine ait jel görüntüsü, (b) *PME41* genine ait jel görüntüsü ve (c) *PME2 ve PME41* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

On haftalık bitkilere 24 saat boyunca yapılan EBL uygulaması *SEB1* geninin ekspresyonunun kontrole 1.84 oranında istatistiki bakımdan önemli olacak şekilde arttırırken, diğer uygulamalar ekspresyon seviyesini anlamlı olacak şekilde değiştirmemiştir (Tablo 10, Şekil 35).



Şekil 35: On haftalık bitkilerin kök örneklerinde hücre duvarı proteinini kodlayan *SEB1* gen ekspresyon seviyesi ve jel görüntüsü. (a) *SEB1* genine ait jel görüntüsü ve (b) *SEB1* ekspresyon seviye grafiği (% kontrol). Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Aralık Testi kullanılarak $P < 0.01$ düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir (± standart hata değerleridir).

Tablo 10: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre kat değişimleri (fold changes)

Gen isimleri	Uygulamalar					
	Kontrol	**EBL**	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	1.00 ± 0.13	1.94 ± 0.03	-1.10 ± 0.06	1.02 ± 0.25	1.02 ± 0.04	-1.94 ± 0.04
CESA4	1.00 ± 0.05	1.15 ± 0.11	-1.20 ± 0.03	1.09 ± 0.24	1.12 ± 0.15	1.01 ± 0.06
CESA6	1.00 ± 0.07	1.78 ± 0.10	1.12 ± 0.06	1.40 ± 0.15	-1.47 ± 0.09	-1.44 ± 0.03
CESA8	1.00 ± 0.14	1.52 ± 0.13	-1.05 ± 0.13	2.41 ± 0.24	1.15 ± 0.07	1.72 ± 0.13
CSLB5	1.00 ± 0.04	-2.01 ± 0.05	-1.48 ± 0.08	-2.34 ± 0.05	-3.64 ± 0.03	-2.37 ± 0.05
EXPA5	1.00 ± 0.15	12.53 ± 2.66	1.41 ± 0.28	2.93 ± 0.63	2.04 ± 0.48	1.69 ± 0.45
EXP8	1.00 ± 0.04	1.40 ± 0.19	-1.09 ± 0.17	1.63 ± 0.20	-1.26 ± 0.78	2.00 ± 0.13
EXP14	1.00 ± 0.16	-2.02 ± 0.09	1.18 ± 0.09	-2.60 ± 0.02	-3.98 ± 0.01	-4.41 ± 0.02
XTH16	1.00 ± 0.14	-1.95 ± 0.01	-2.28 ± 0.06	-2.65 ± 0.03	-9.25 ± 0.01	-3.04 ± 0.02
XTH21	1.00 ± 0.18	1.93 ± 0.23	1.51 ± 0.18	-1.21 ± 0.20	-3.15 ± 0.07	-1.59 ± 0.05
XTH23	1.00 ± 0.13	23.01 ± 0.75	1.97 ± 0.13	1.82 ± 0.17	-1.40 ± 0.04	-1.01 ± 0.06
PME2	1.00 ± 0.14	-2.92 ± 0.04	-1.33 ± 0.09	-2.42 ± 0.04	-3.54 ± 0.02	-6.73 ± 0.01
PME41	1.00 ± 0.07	6.93 ± 0.65	2.99 ± 0.26	4.47 ± 0.40	1.64 ± 0.10	3.09 ± 0.07
SEB1	1.00 ± 0.06	1.84 ± 0.18	-1.08 ± 0.08	1.37 ± 0.09	-1.16 ± 0.09	-1.66 ± 0.18

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

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Bitkiler yaşamları boyunca kuraklık, sıcaklık, ağır metal kontaminasyonu, besin eksikliği gibi birçok abiyotik strese maruz kalmaktadır. Stresin genel etkileri bitki türüne, genotipine, yaşına, strese maruz kalma süresi ve stresin yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Fakat stresin hücre duvarı biyosentez metabolizması üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (Gall vd., 2015). Bitki hücre duvarının dinamik yapısı, olağan yapının devam etmesine olanak sağlamakta ve aynı zamanda değişen çevre koşullarında fiziksel bütünlüğünü devam ettirmektedir (Rao ve Dixon, 2017). Stres koşulları altında hücre duvarında meydana gelen değişikliklerin anlaşılması için şu ana kadar iki ana mekanizma önerilmiştir. Birincisi primer hücre duvar plastisitesini sağlayan Rhamnogalakturonan-I'nın dallanma derecesindeki artış ile ilişkili olarak ksiloglukan endotransglukosilaz / hidrolaz (XTH) ve expansin miktarında artış meydana gelmesidir. İkincisi ise hemiselüloz ve lignin birikimiyle sekonder hücre duvarı kalınlaşmasıdır (Gall vd., 2015). Bor gibi topraktaki besin maddelerinin konsantrasyonunda bir dengesizlik olması bitki hücre duvarlarını etkileyen önemli abiyotik stres faktörü olabilmektedir (Tenhaken, 2015). Bor eksikliğinde genelde anormal derecede kalın ve yapısal olarak deforme hücre duvarı gözlenmektedir (Brown, 2002). Ayrıca bor eksikliğinde çeşitli hücre duvarı büyümesinde etkili *XTH*, *PME* ve ekspansin gibi hücre duvarı modifiye edici enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon seviyeleri azalmaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008a,b). Bor toksisitesinde ise anormal hücre duvarı oluşumuna sebep olmakta, hücresel yolakları etkilemekte ve bitki büyümesini engellemektedir (Kasajima ve Fujiwara, 2007).

Fitohormonlar, kimyasal aracılardır ve çevresel uyarıcılara hızlı cevaplar oluşması gibi birçok hücresel sürecin koordine edilmesine olanak sağlamaktadır. Fitohormonların regülasyonu hücre duvarında algılama (sensing) ve olumsuz koşullara karşı adaptif yanıtların yeniden yapılandırması için gerekmektedir (Rao ve Dixon, 2017). Brassinosteroidlerin bitki büyümesindeki etkilerinin yanı sıra strese karşı cevaplarının oluşumundaki rolü yapılan birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur (Divi vd., 2010). Brassinosteroidler, stres koşulları altında, strese yanıtta hücre duvarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Rao ve Dixon, 2017). Bitki hücre genişlemesi ve farklılaşması

sırasında hücre duvar bileşiminde bir dizi olay meydana gelmektedir. BR sinyal yolağı, çeşitli çevre koşullarına uygun hücre duvar özelliklerini sağlamak için hücre duvarının gevşemesini veya sertleşmesinde önemli rol oynamaktadır (Rao ve Dixon, 2017). Yapılan çalışmalar brassinosteroidlerin bitki gelişiminin doğru zamanında ve uygun dozda ekzojen olarak uygulandığında immono modülatörler olarak rol oynadığını göstermiştir (Khripach vd., 2000).

Tez çalışmasında iki farklı büyüme döneminde (5 haftalık ve 10 haftalık bitkiler) bor eksikliği ve toksisitesinin hücre duvarı üzerine etkisi ve EBL hormonunun bor stresi altında hücre duvarı biyosentezi ve yeniden düzenlemesindeki rolü araştırılmıştır. Çalışma kapsamında borik asit ve/veya EBL uygulamalarının beş ve on haftalık *Arabidopsis* bitkilerinin rozet yaprak ve kök örneklerinde hücre duvarı ile ilgili seçilen 14 genin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Arabidopsis thaliana genomun da 10 farklı selüloz sintaz (CESA) geni tanımlanmıştır. Primer hücre duvarında selüloz biyosentezi için *CESA1, CESA3* ve *CESA6* genlerinin aynı anda ekspresyonu gerekli iken sekonder hücre duvarı biyosentezinde *CESA4, CESA7* ve *CESA8* genlerinin aynı anda ifade edilmesi gerekmektedir (Cosgrove, 2005; Lerouxel vd., 2006). Tez çalışmasında ekspresyon seviyesi araştırılan genler arasında hücre duvarında selüloz sentezinde rol alan bazı selüloz sintaz gen ailesi üyeleri (*CESA1, CESA4, CESA6, CESA8 ve CSLB5*) yer almaktadır.

Yaprak dokusunda, yüksek konsantrasyonda BA uygulaması beş haftalık bitkilerde *CESA4* ve *CESA8* genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırırken (Tablo 11 ve 12), on haftalık bitkilerde *CESA4, CESA6* ve *CESA8* genlerinin ekspresyonu hem BA içermeyen hemde yüksek konsantrasyonda BA içeren ortamda arttırmıştır (Tablo 13 ve 14). Bor stresine maruz kalan bitkilerin rozet yapraklarında primer ve sekonder hücre duvarı ile ilgili genlerinin ekspresyonun artması, bor stresi altında bitkinin yaprak kısımlarında hücre duvarı kalınlığını arttırdığını göstermektedir. Bu durum abiyotik stres faktörlerine karşı bitkiler tarafından geliştirilen bir strateji olan selüloz sentez genlerinin ekspresyonunu teşvik ederek sekonder hücre duvarı kalınlığını arttırdığı sonucuna götürmüştür (Gall vd., 2015).

Tablo 11: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık *A. thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları

Gen isimleri	Uygulamalar				
	EBL	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	·	·	·	·	·
CESA4	·	·	·	+	+
CESA6	·	·	·	·	·
CESA8	·	·	·	+	+
CSLB5	·	·	·	-	-
EXPA5	·	·	+	·	·
EXP8	+	-	+	-	+
EXP14	·	-	-	·	·
XTH16	-	-	-	-	-
XTH21	+	+	+	+	+
XTH23	+	·	+	·	+
PME2	+	+	+	+	+
PME41	+	+	+	-	+
SEB1	·	·	·	·	·

Tablo 7'ye göre "-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artmayı, "·" kontrole göre değişiklik olmadığını göstermektedir.

Tablo 12: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 5 haftalık A.thaliana bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole meydana gelen değişim durumları

Gen isimleri	Uygulamalar				
	EBL	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	-	·	-	-	-
CESA4	-	-	-	-	-
CESA6	·	·	·	·	·
CESA8	·	·	·	-	·
CSLB5	-	·	-	-	-
EXPA5	-	-	-	·	-
EXP8	-	-	-	·	-
EXP14	-	·	·	·	-
XTH16	-	·	·	-	-
XTH21	·	·	·	-	-
XTH23	+	·	+	-	+
PME2	-	·	-	·	-
PME41	·	·	+	+	+
SEB1	-	·	-	·	-

Tablo 8'e göre "-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artmayı, "·" kontrole göre değişiklik olmadığını göstermektedir.

Tablo 13: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık A.thaliana bitkilerine ait rozet yaprak örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları

Gen isimleri	Uygulamalar				
	EBL	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	·	·	·	+	·
CESA4	·	+	·	+	·
CESA6	·	+	·	+	+
CESA8	·	+	·	+	·
CSLB5	·	·	+	·	+
EXPA5	+	+	+	+	+
EXP8	+	-	+	-	+
EXP14	+	·	·	+	+
XTH16	+	·	+	·	·
XTH21	+	+	+	+	+
XTH23	+	·	+	+	·
PME2	+	·	+	·	+
PME41	+	+	+	+	+
SEB1	+	+	+	+	+

Tablo 9'a göre "-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artmayı, "·" kontrole göre değişiklik olmadığını göstermektedir.

Tablo 14: Borik asit ve/veya EBL uygulamalarına 24 saat süreyle maruz bırakılan 10 haftalık *A.thaliana* bitkilerine ait kök örneklerinde 14 genin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre meydana gelen değişim durumları

Gen isimleri	**Uygulamalar**				
	EBL	**- BA**	**-BA+EBL**	**+BA**	**+BA+EBL**
CESA1	+	·	·	·	-
CESA4	·	·	·	·	·
CESA6	+	·	·	-	-
CESA8	+	·	+	·	+
CSLB5	-	-	-	-	-
EXPA5	+	·	+	·	·
EXP8	·	·	·	·	+
EXP14	-	·	-	-	-
XTH16	-	-	-	-	-
XTH21	+	·	·	-	-
XTH23	+	·	·	·	·
PME2	-	·	-	-	-
PME41	+	+	+	·	+
SEB1	+	·	·	·	·

Tablo 10'a göre "-" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmayı, "+" kontrole göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artmayı, "·" kontrole göre değişiklik olmadığını göstermektedir.

Tez çalışmasında tek başına yapılan EBL uygulamaları beş ve on haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde *CESA* genlerinin ekspresyon seviyesinde değişiklik meydana getirmez iken, bor toksisitesi *CESA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde değişiklikler meydana getirmiştir (Tablo 11 ve 13). EBL uygulaması beş haftalık bitkilerin yaprak örneklerinde primer hücre duvarı biyosentezinde rol oynayan *CESA1* ve *CESA6* genlerinin ekspresyon seviyesini etkilemez iken, sekonder hücre duvarı biyosentezinde rol oynayan *CESA4* ve *CESA8* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrole göre arttırmıştır. On haftalık bitkilerde ise sadece *CESA6* gen ekspresyon seviyesini kontrole göre arttırdığı tespit edilmiştir (Tablo 11 ve 13).

BR'lerin *Arabidopsis'*te hem trankripsiyonel seviyede hemde transkripsiyon sonrası *CESA* genlerinin ifadelerini düzenleyerek selüloz birikimini arttırdığı bilinmektedir (Rao ve Dixon, 2017). Xie ve arkadaşları (2011), *A. thaliana*'nın yabanıl tiplerine ve BR mutantlarına farklı gelişim aşamalarında brassinosteroid hormonu uygulamışlardır. RT-PCR analizleri sonucunda BR sinyallerinin *Arabidopsis'*te hem trankripsiyonel seviyede hemde transkripsiyon sonrası CESA genlerinin ekpresyon seviyesini arttırarak selüloz birikimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca BR'lerin farklı gelişim aşamalarında farklı *CESA* genlerininin ekspresyonlarını düzenlediğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar, ortamda bulunan BR'lerin primer hücre duvarı büyümesi sırasında *CESA1, CESA3* ve *CESA6* genlerinin, sekonder hücre duvarı büyümesi sırasında ise *CESA4* ve *CESA8* genlerinin promotor bölgelerini uyararak genlerin ekspresyonunu teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır (Xie vd., 2011). Ayrıca BR-sentezlemeyen ve BR-duyarsız mutantların selüloz içeriğinin yabanil tip *Arabidopsis* bitkilerine oranla daha az olduğu saptanmıştır (Xie vd., 2011; Nafisi vd., 2015). Stres koşulları altında ekzojen BR uygulaması sonucu BR reseptör genlerinin yüksek ekspresyonu hücre duvarı bozulmasını önlemek için selüloz sentezi ve birikimine katkı sağlamaktadır (Rao ve Dixon, 2017).

Beş haftalık bitkilere ait kök dokularında bor toksisitesi *CESA1* ve *CESA8* genlerinin ekspresyonunu baskılarken, *CESA4* geninin ekspresyonu hem bor toksisitesi hem de bor eksikliğinde baskılanmıştır (Tablo 12). On haftalık bitki köklerinde *CESA* genlerinin ekspresyonu bor eksikliği veya bor toksisitesinden etkilenmemiştir (Tablo 14). Kök dokularında yapılan ekspresyon analizleri sonucu EBL hormonu tek başına veya BA uygulamalarıyla (0 ve 3000 μM) birlikte beş haftalık bitkilerde *CESA1* ve *CESA4* genlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır (Tablo 12). On haftalık bitkilerde ise *CESA1*,

CESA6 ve *CESA8* genlerinin ekspresyonları tek başına yapılan EBL uygulaması sonucu artarken, BA ile birlikte uygulandığında sadece ekspresyonu artan *CESA8* geni olmuştur (Tablo 14). BR'ler uygulandığı konsantrasyona bağlı olarak kök gelişimini pozitif ya da negatif olarak etkileyebilmektedir. Ekzojen BR uygulaması düşük konsantrasyonlarda kök gelişimini arttıkmakta, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe etmektedir (Surgun vd., 2012). Müssig vd., (2003) tarafınan yapılan çalışmada 0-10 nM arasında farklı konsantrasyonlarda uygulanan EBL hormonunun etkileri kök dokusunda araştırılmış ve yüksek konsantrasyonda EBL hormonunun kök büyümesini olumsuz etkileyerek yavaşlattığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar bor eksikliği ve bor toksisitesi altında bitki köklerinin benzer tepkiler verdiği tespit edilmiştir. Bor stresi altında bitki kökleri stres şartlarından kaçınmak veya tolere edebilmek için hücre uzaması yavaşlamakta, hücre bölünmesi engellenmektedir. Bunun sonucunda kök uzaması gerilemektedir (Wang vd., 2010; Liu vd.,2014). Bu bilgiler doğrultusunda stres şartları altında hücre uzaması yavaşlayacağı için hücre duvarı biyosentezininde yavaşlayacağı dolayısıyla biyosentez genlerinin ekspresyon seviyesinin azalacağı öngörülmektedir. Çalışmamızın sonuçları buna paralel olarak bor eksikliği ve bor toksisitesi altında kök dokusunda selüloz biyosentezinde rol oynayan bazı genlerin baskılandığı göstermektedir.

Yapılan literatür çalışmalarında bor eksikliği veya bor toksisite koşulları altında *CESA1, CESA4, CESA6* ve *CESA8* genleri üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bor stresi bitkinin maruz kaldığı bitki büyüme dönemi ve bitki dokusuna göre *CESA* genlerinin ekspresyonunda farklılıklar göstermiştir. Bununla birlikte *CESA1* ve *CESA6* ile *CESA4* ve *CESA8* genleri bor eksikliği veya bor toksisitesinde de benzer ekspresyon profilleri göstermesi hücre duvarı biyosentez sürecinde birbirleriyle ilişkili olduklarını destekler niteliktedir (Cosgrove, 2005; Lerouxel vd., 2006).

A. thaliana'da bilinen 29 tane selüloz sintaz benzeri (CSL) gen vardır. Bu genler selüloz sintaz genleriyle dizi benzerliği göstermektedir (Somerville vd., 2004; Hazen vd., 2017). CSL proteinlerinin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmış olmasa da bazı çalışmalarda çeşitli hücre duvarı polisakkaritlerinin sentezini katalizledikleri ortaya koyulmuştur (Hamann vd., 2004). *CSL* genlerinin *CESA* genlerine sekans benzerliklerine dayanarak, selülozik olmayan hücre duvarı polisakkaritlerinin β-D-glukan omurgasını polimerize eden sintazları kodladığı önerilmektedir (Cosgrove, 2005; Roberts ve Bushoven, 2007). Haman vd. (2004) normal koşullar altında yetişen *A. thaliana* yabanıl tip (Col-0) bitkisinde

yaptıkları çalışmada mikroarray yöntemiyle *CSLB5* geninin bitkinin kök dokularında yaprak dokularına kıyasla daha yüksek seviyede eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında ekspresyon seviyesi araştırılan diğer bir gen *CSLB5* geni olmuştur. Beş haftalık ve on haftalık bitkilere yapılan uygulamalar sonucunda kök dokusunda benzer ekspresyon profilleri görülmüştür. Bor stresi (0 ve 3000 μM) altında bitki kök dokusunda *CSLB5* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı azalmalar (beş haftalık bitkilerin kök dokusunda 0 μM BA uygulaması hariç) tespit edilmiştir (Tablo 12 ve 14). Bor eksikliği ve bor toksisitesi altında bitki köklerinin benzer tepkiler verdiği ve hücre uzamasını yavaşlatarak kök gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Wang vd., 2010; Liu vd.,2014). Camacho-Cristobal vd., (2008a) tarafından yapılan çalışmada *Arabidopsis* bitkilerinin 6 ve 24 saat boyunca bor eksikliğine maruz kalması sonucunda kök kısımlarında *CSLB5* geninin ekspresyon seviyesinin belirgin derecede azaldığını tespit etmişler ve borun hücre duvarı bileşenlerinin sentezinde doğrudan rol aldığını ortaya koymuşlardır. Bor eksikliği altında kök dokusundan elde ettiğimiz bulgular Camacho-Cristobal vd. (2008a) bulgularını destekler nitelikte olmuştur. Çalışmamızı destekler nitelikteki diğer bir çalışmada *Arabidopsis* bitkilerine yapılan düşük konsantrasyonda (0.1 μM) ve normal konsantrasyonda bor (30 μM) uygulamaları sonucunda kök meristem hücrelerinde *CSLB5* geninin mRNA seviyesinin düşük bor konsantrasyonunda azaldığı tespit edilmiştir (Li vd., 2015). Araştırıcılar düşük bor uygulaması sonucunda *CSLB5* gen ekspresyon seviyesinin azalması, selüloz biyosentezini azaltabileceğini önermişlerdir. Yapılan çalışmalar ve tez çalışmamızda elde edilen bulgular bor eksikliği ve düşük bor konsantrasyonlarının bitki köklerinde *CSLB5* geninin ekspresyonunun azalması yoluyla selüloz biyosentezini azaltabileceğini sonucunu doğurmaktadır. Selüloz biyosentezinde meydana gelen azalma, hücre duvarı özelliklerinde değişikliğe neden olmaktadır (Li vd., 2015). BA uygulamaları (0 ve 3000 μM) ile birlikte yapılan 1 μM EBL hormonu uygulamaları beş ve on haftalık bitkilerin kök dokularında ekspresyon seviyesini tek başına yapılan BA uygulamalarına göre önemli oranlarda azaltmıştır (Tablo 12 ve 14). Bu sonuç, uygulanan EBL hormonu konsantrasyona bağlı olarak kök büyümesini inhibe etmesi yanında bor stresininin meydana getirdiği *CSLB5* gen ifadesi üzerindeki azalmanın etkisini dahada arttırabileceği sonucuna götürmüştür.

Haman vd. (2004) normal koşullar altında 15 ve 50 gün boyunca yetişen *A. thaliana* bitkisinin yaprak dokusunda *CESA* ve *CSL* genlerinin ekspresyon seviyesilerini mikroarray yöntemiyle belirlemişlerdir. Yaprak dokusunda geç dönemde (50 gün) *CSLB5* geninin

ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Haman vd., 2004). Haman vd. (2004) tarafından elde edilen bulgular *CSLB5* geninin bitki gelişminin geç döneminde ifade edilerek hücre duvar biyosentezine katıldığını akla getirmektedir. Yaptığımız çalışmada beş haftalık bitkilerin yaprak dokusunda bor toksisitesi altında *CSLB5* geninin ekspresyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Tablo 11). On haftalık bitkilerin yaprak dokusunda ise tek başına yapılan bor uygulamaları bir değişiklik meydana getirmez iken bor stresleri ile birlikte yapılan EBL hormonu uygulamaları kontrole göre ekspresyon seviyesini artırmıştır (Tablo 13).

Bitki hücre duvarı yapısının modifikasyonu, abiyotik stres faktörünün algılanması üzerine bir savunma yanıtı olarak gerekmektedir (Tenhaken, 2015). İki grup enzim olan ksiloglukan transferaz / hidrolaz (XTH) ve ekspansinler hücre duvarının gevşemesine katılmaktadır. XTH ve ekspansin mRNA düzeylerinin BR aracılı regülasyonu, hücre duvarının sertliğini değiştirmek için ksiloglukan ve selüloz mikrofibriller arasındaki etkileşimin değişmesine neden olabilmektedir (Rao ve Dixon, 2017). Ekspansinler bitkilerde hücre büyümesinde ve stres cevabının oluşumunda duvar genişlemesini uyaran proteinlerdir. Hücre büyümesi sürecinde ekspansinler, selüloz mikrofibriller ile duvar matriksinde bulunan selülozik olmayan glikanlar arasındaki hidrojen bağını koparark, hidrolitik bozunma olmadan hücre duvarı gevşemesinde rol oynarlar. *A. thaliana* genomunda şimdiye kadar tanımlanan 36 ekspansin geni bulunmaktadır (Camacho-Cristobal vd., 2008a; Park vd., 2010). Ekspansin genlerinin düzenlenmesi hakkındaki bilgiler çok sınırlı olsa da birçok durumda gen ekspresyonunun bitki büyüme hormonları tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca çevresel tetikleyicilerinde ekspansin genlerinin ekspresyonunu teşvik ettiği bulumuştur (Wieczorek vd, 2006). BR'ler ekzojen olarak uygulandığında ekspansin proteinlerini de kapsayan hücre duvarı modifiye edici enzimleri kodlayan birçok genin ekspresyonunu teşvik etmektedir (Müssig vd., 2002). Çalışmamızda borik asit ve/veya EBL uygulanan beş ve on haftalık bitkilerin rozet yaprak ve kök örneklerinde ekspansin gen ailesi üyelerinden *EXPA5, EXP8 ve EXP14* genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Park vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada *A. thaliana* yabanil tip bitkisinde *EXPA5* geninin ekspresyonunun köke kıyasla rozet yapraklarda yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir. Araştırıcılar, ekzojen uygulanan 0.1 μM brassinolid uygulamasının *A.thaliana* fidelerinde *EXPA5* gen ekspresyonunu arttırdığını tespit etmişler. BR mutantları ile yapılan

çalışmalar sonucunda *EXPA5* geninin ekspresyonunun BR'lere duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. BR hormonunun *EXPA5* gen ifadesini nasıl düzenlediğini açıklayabilmek için yabanıl tip ve BR mutant (*bri1-301, det2, bzr1-1D, bzr1-1D x expA5-1*) bitkilerinde yaptıkları analizler sonucunda *A. thaliana*'da *EXPA5* geninin, BR sinyal yolağı bileşeni olan BZR1 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen bir gen olduğunu ortaya koymuşlardır (Park vd., 2010). Çalışmamızda 1 µM EBL uygulamaları sonucunda *EXPA5* geninin ekspresyonunda uygulanan bitki dönemine ve dokuya göre farklı ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir. Beş haftalık bitkilerin yapraklarında genel olarak yapılan tüm uygulamalar (bor içermeyen ortama EBL ilavesi hariç) *EXPA5* geninin ekspresyon seviyesini kontrol uygulamasına göre değiştirmez iken (Tablo 11), on haftalık bitkilerin yaprak örneklerinde BA içermeyen ve içeren ortamlar *EXPA5* geninin ekspresyonunu kontrole göre 2.52 - 1.98 oranlarında arttırıken, EBL ilavesi ekspresyonun 4.87-4.14 kat artmasına neden olmuştur (Tablo 13). On haftalık bitkilerin kök dokusunda ise ekpresyon seviyesi 1 µM EBL uygulaması tek başına ve bor içermeyen ortamla birikte uygulandığında artarken (Tablo 14), beş haftalık bitkilere ait kök dokusunda tek başına yapılan 1 µM EBL ve BA uygulamaları ekspresyonun azalmasına neden olurken, birlikte uygulandıklarında ekspresyonu daha da azalmasına neden olmuşlardır (Tablo 12). Bu durum BR hormonunun uygulama zamanına bağlı olarak etkisininin değiştiği ve BR'lerin etilen üretimini uyarmasıyla açıklanabilir (Khripach vd., 2000; Park vd., 2010). *A.thaliana'*da yapılan bir çalışmada ekzojen BR uygulamasının bitki kök ve sürgünlerinde etilen üretimini teşvik ettiği ve uygulanan hormon konsantrasyonuyla paralel olarak etilen üretiminin arttığını tespit etmişlerdir (Arteca ve Arteca, 2001). Bununla birlikte *A.thaliana*'da etilen üzerine yapılan bir çalışmada, cDNA-AFLP ve cDNA-mikroarray yöntemleri kullanılarak yapılan transkriptom analizleri ile *EXPA5* gen ekspresyonunun etilen tarafından baskılandığını gösterilmiştir (Paepe vd., 2004).

Ekspansin ailesine ait ekspresyon seviyesi araştırılan diğer bir üyesi *EXP8* genidir. Yapılan literatür çalışmasında bor eksikliği ve yüksek bor konsantrasyonunun neden olduğu stres şartları altında *EXP8* gen ekspresyonunun nasıl düzenlendiğini açıklayan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu kapsamda tez çalışmasında elde edilen bulgular yenilik taşımaktadır. Yapılan çalışmada tek başına bor eksikliğine maruz bırakılan beş haftalık bitkilerin kök dokusunda kontrole göre *EXP8* geninin transkript seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 12). Tek başına yapılan bor eksikliği ve bor toksisitesi uygulamaları ise beş ve on haftalık bitkilerin rozet yaprak dokusunda *EXP8* geninin ekspresyonunun

azalmasına neden olmuştur (Tablo 11 ve 13). Hücre büyümesi ve hücre duvarının gevşemesinde rol oynayan ekspansinler kök uzaması, kök saçaklarının oluşumu ve gelişimi ve yaprak organogenezi gibi gelişim süreçlerinde rol oynamaktadır (Wieczorek vd., 2006; Wei vd., 2011). Bitki büyüme süreçlerinde rol oynayan ekspansinlerin miktarında meydana gelen artış ve azalmaların bitki büyümesini etkileyebileceği tahmin edilmektedir (Li vd., 2003). Bitkiler stres şartlarından kaçınmak veya tolere edebilmek için çeşitli morfolojik stratejiler geliştirmişdir ve hücre uzamasını yavaşlatarak büyümenin azalması bu stratejilerdir biridir (Gall vd., 2015). Bitkilerin geliştirebileceği olası strateji doğrultusunda bor stresininin hücre duvarı modifikasyonununda rol oynayan *EXP8* geninin ekspresyonunu azalttığı ön görülmektedir.

Hücre yüzeyinde BR sinyali algılandığında sinyal iletim yolağı aktif hale gelir ve sinyal yolağı elemanlarından HBI1 (HOMOLOG OF BEE2 INTERACTING WITH IBH1, At2g18300) duvar modifiye edici *EXP8* geninin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Böylelikle hücre uzamasını teşvik etmektedir (Clouse, 2014). Tez çalışması kapsamında EBL hormonu beş haftalık bitkilerin kök dokusunda bor eksikliği ve bor toksisitesinde görülen *EXP8* genine ait ekspresyonu daha da baskılamıştır (Tablo 12). Brassinosteroidler, stres faktörlerine karşı yanıt oluşmasında ve stres şartlarına tolerans gösterebilen hücre duvarı özelliklerini sağlamak için hücre duvarının gevşeme veya sertleşmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. (Divi vd., 2010; Rao ve Dixon, 2017). Hücre duvarı gevşemesinde rol oynayan ekspansin genlerinin stres şartları altında ekspresyonunun azalması, duvarın sertleşmesine neden olmaktadır. Ekzojen uygulanan EBL hormonu bor stresine direk maruz kalan kök dokusunda bitkinin tolerans mekanizmasını destekleyerek *EXP8* gen ekspresyonunu daha da baskılamış ve duvar sertliğine katkı sağlamıştır. Beş haftalık bitkilerin rozet yaprak dokusunda ise EBL hormonu *EXP8* gen ekspresyonunu teşvik etmiştir (Tablo 11). Bor eksikliği ve yüksek bor konsantrasyonlarının ekspresyonda neden olduğu azalma etkisini ortadan kaldırmış, transkript seviyesini kontrole göre arttırarak hücre duvarı uzamasına katkı sağlamıştır. On haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde yapılan araştırma sonucunda EBL hormonunun *EXP8* gen ekspresyonunu teşvik ettiği (Tablo 13), meydana gelen artışların oransal olarak beş haftalık bitkilere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hormonunun uygulanma zamanına göre etki durumunun değiştiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, bor eksikliği ya da bor toksisitesine maruz kalan bitkilere yapılan EBL

hormonu uygulamasının bor stres toleransına katkı sağladığı ve bor stres koşulları altında yaprakta hücre duvarı uzamasını teşvik ettiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Tez çalışmasında ekspansin ailesine ait ekspreyonu araştırılan diğer bir gen *EXP14* olmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda brassinosteroidlerin *EXP14* gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmamış, fakat BR'lerin ekspansin gen ailesi farklı üyelerinin ekpresyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Müssig vd., 2002). Beş ve on haftalık bitkilerin kök dokusunda bor eksikliği *EXP14* geninin ekspresyonunda bir değişiklik tespit edilmez iken bor toksisitesi on haftalık bitkilerin kök dokusunda gen ekspresyonunu baskılamıştır (Tablo 12 ve 14). Yapılan bir çalışmada ise 3 haftalık *A.thaliana* bitkileri 6 ve 24 saat süreyle bor eksikliğine maruz kalması sonucunda kök kısımlarında *EXP14* ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1,7 ve 2,7 kat oranında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Camacho-Cristobal vd., 2008a). Camacho-Cristobal vd. (2008a) tarafından yapılan çalışma bulguları ile tez çalışmasında bor eksikliğinde elde edilen bulgular birbirinden farklıdır. Bu farklılığın, bitkinin bor eksikliğine maruz kaldığı bitki gelişim döneminden kaynaklandığı öngörülmektedir. Ayrıca tez çalışmasında bor toksisitesi altında on haftalık bitkilerin stres faktörüne direk maruz kalan kök dokusunda duvar modifikasyonunda rol oynayan *EXP14* gen ekspresyonunun baskılanması sonucunda duvar gevşeme mekanizmasında değişiklik meydana geleceğinden hücre uzamasını yavaşlayacağı sonucu çıkarılabilir. 1 μM EBL hormonu tek başına ya da borik asit konsantrasyonlarıyla (0 ve 3000 μM) birlikte uygulandığında beş ve on haftalık bitki kök kısımlarında *EXP14* transkript seviyesini genel olarak kontrole göre azaltmıştır (Tablo 12 ve 14). Beş haftalık bitkilere ait köklerde *EXP14* geninin ekpresyonunu on haftalık bitkiler ile kıyaslandığında kontrole göre daha yüksek oranlarda baskılamıştır. Brassinosteroid hormonunun bitki gelişiminin uygulanma zamanına bağlı immunomodülatör etkisinin değiştiği bilinmektedir (Khripach vd., 2000). Bu durum EBL hormonunun *EXP14* gen ekspresyonu üzerine düzenleyici etkisinin uygulanma zamanına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Beş haftalık bitkilere ait yaprak örneklerinde *EXP14* geninin ekspresyonu borun olmadığı koşullarda azalırken (Tablo 11), on haftalık bitkilerin yaprak örneklerinde bor toksisite koşullarında ekspresyonda artma gözlenmiştir (Tablo 13). Bununla birlikte borik asit ile birlikte yapılan EBL uygulamaları *EXP14* geninin ekspresyonunu tek başına yapılan borik asit uygulamalarına nazaran genel olarak değiştirmemiştir (Tablo 11 ve 13).

Hücre duvarının başlıca elemanları arasında yer alan ksiloglukanın, modifikasyonu ksiloglukan endo transglikosilaz / hidrolaz (XTHs) enzimi tarafıdan gerçekleşmektedir. Bu nedenle XTH gen ailesi üyeleri hücre duvarı modifikasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. XTH genlerinin ekspresyonunun bitkilerde uzama bölgelerinde ve/veya hücre genişlemesinin son bulduğu ancak duvarın yeniden şekillendiği duvar oluşumun aktif olduğu bölgelerde yüksek olduğu saptanmıştır (Cosgrove, 2005). Tez çalışmasında borik asit ve/veya EBL uygulaması sonucunda XTH gen ailesi üyelerinden *XTH16, XTH21* ve *XTH23* genlerinin ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır.

Bor eksikliği ve toksistesi beş haftalık bitkilerin yaprak dokusunda *XTH16* geninin ekspresyonunu baskılamıştır (Tablo 11). Beş haftalık bitkilerin kök dokusunda yapılan analizler bor toksisitesinin *XTH16* geninin ekspresyonunu kontrole göre 3 kat düşürdüğü tespit edilmiştir. On haftalık bitkilerin köklerinde ise hem bor eksikliği hemde bor toksisitesi ekspresyonun azalmasına neden olmuştur (Tablo 14). 2008 yılında yapılan bir çalışmada *A. thaliana* köklerinde bor eksikliğininin hücre duvarı ilişkili bazı genler üzerine etkisi araştırılmış ve *XTH16* gen ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Camacho-Cristobal vd., 2008a). Bor eksikliği altında hücre duvarı modifiye edici enzimlerin ekspresyonunun yetersiz olması, hücre duvarı gevşeme durumunu değiştirmektedir. Hücre duvar modifikasyonunda rol oynayan XTH genlerinin transkript seviyesinin azalması da, ksiloglukanlar ile çapraz bağlı mikrofibril ağının yeniden düzenlenmesini ve hücre duvarının gerilme özelliğini etkileyebilmektedir (Camacho-Cristobal vd., 2008a). Bor toksisitesinin *XTH16* gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamış olmaması ve elde edilen bulgularda bor eksikliği ve bor toksisitesinin *XTH16* gen ekspresyon seviyesini benzer şekilde etkilemesi bor stresinin *XTH16* gen ekspresyonunda benzer yolaklar izlediğini düşündürtmektedir. Bu çıkarımla, bor stresi (bor eksikliği ve toksisitesi) altında bitkinin duvar modifikasyonunda rol oynayan *XTH16* gen ekspresyonu baskılanarak duvarın yeniden düzenlenmesinde bir takım değişiklikler meydana geleceği öngörülmektedir.

Hücre yüzey reseptörleri tarafından algılanan BR'lerin oluşturduğu sinyalin Arabidopsis ve soya fasulyesinde duvar modifikasyonunda rol oynayan birtakım XTH genlerinin ekspresyonunu anlamlı olacak şekilde değiştirdiği ortaya koyulmuştur (Rao ve Dixon, 2017). Beş ve on haftalık bitkilere 24 saat boyunca yapılan tek başına yapılan 1 µM EBL uygulaması kök örneklerinde *XTH16* geninin ekspresyonunu baskılamıştır (Tablo 12 ve

14). Bununla birlikte beş haftalık bitkilerin kök dokusuna bor toksisitesi 3 kat (3.13) oranında bir azalma meydana getirirken, EBL uygulması bu oranı 6 kata (6.54) çıkarmıştır. Beş haftalık bitkilerin yaprak dokularında da tek başına yapılan EBL uygulaması *XTH16* geninin ekspresyonu azaltırken on haftalık bitkilerin yapraklarında ekspresyonu teşvik etmiştir (Tablo 11 ve 13). Buna ilaveten beş haftalık bitkilerin yaprak dokusunda borun toksik olduğu koşullar altında ekspresyon 5 kat (5.73) azalırken, EBL uygulaması ile birlikte bu oran 10 kat (10.58) olmuştur. Yapılan bir çalışmada, XTH genlerinin farklı bitki organlarında ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş olup, dokuya spesifik ekspresyon gösterdiği ortaya koyulmuştur (Yokoyama ve Nishitani, 2001). Bizim çalışmamızda bununla birlikte EBL etkisinin bitki büyüme dönemine göre de değiştiği ortaya koyulmuştur. 5 haftalık bitkilerin yapraklarında bor toksisitesi EBL ile birlikte uygulandığında ekspresyonu 10 kat daha azalmasına neden olurken, kök dokusunda bu oran 6 kat olmuştur. Bitkinin bor toksisitesine karşı yanıtında stres hücre duvarı modifikasyonu ile ilgili olan *XTH16* geninin ekspresyonu azaltmıştır bununla birlikte, EBL hormonu söz konusu genin ekspresyonunun daha da azalarak savunma mekanizmasını desteklemiş olabileceği öngörülmektedir.

Tez kapsamında, ekspresyon seviyesi araştırılan diğer bir gen *XTH21* geni olmuştur. Beş haftalık hem de on haftalık bitkilerin kök dokusunda borun yüksek konsantrasyonda olduğu koşullarda *XTH21* geninin ekspresyonu kontrole göre önemli oranlarda azalmıştır (Tablo 12 ve 14). Bu durum toksik bor stresine direk maruz kalan bitki köklerinin büyümeyi yavaşlatarak stres tolerans stratejisini desteklemektedir. Ayrıca sadece bor toksisitesinde ekspresyon değişim görülmesi önem arz etmektedir.

Yaprak dokusunda tek başına yapılan EBL ve bor uygulamaları *XTH21* geninin ekspresyonunu arttırıken, EBL hormonu bor stresleri (bor eksikliği ve bor toksisitesi) ile birlikte uygulandığında beş ve on haftalık bitkilerde ekspresyonu dramatik oranlarda arttırmıştır (Tablo 11 ve 13). Normal şartlar altında büyüyen bir bitkide *XTH21* genine ait mRNA seviyesi diğer XTH gen ailesi üyelerine göre daha düşük bulunmaktadır (Yokoyama ve Nishitani, 2001). BR hormonu, XTH genlerinin ekspresyonunu teşvik etmektedir (Rao ve Dixon, 2017). Yapılan bir çalışmada ise 20 günlük *A.thaliana* fidelerinde 2 saat boyunca 1 μM brassinolide uygulamasının *XTH21* geninin ekspresyon seviyesini kontrole göre değiştirmediği tespit edilmiştir (Yokoyama ve Nishitani, 2001).

Tez çalışmasında, borik asit ve/veya EBL uygulamarı sonucunda XTH gen ailesinden *XTH23* gen ifadesinin değişimleri araştırılmıştır. Bor eksikliği iki grup bitkinin kök dokusunda *XTH23* geninin ekspresyon seviyesini değiştirmemiştir (Tablo 12 ve 14). Fakat bor toksisitesinde beş haftalık bitkilerin kök örneklerinde *XTH23* transkript seviyesinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 12). Bununla birlikte yapılan analizler sonucunda sadece on haftalık bitkilerin rozet yaprak örneklerinde borun toksik olduğu koşullarda *XTH23* gen ekspresyon seviyesi oldukça artmıştır (Tablo 13).

Çalışmamızda tek başına yapılan EBL hormonu 5 ve 10 haftalık bitkilerin köklerinde ekspresyonu sırasıyla 19.03 ve 23.01, yapraklarında ise sırasıyla 3.73 ve 5.86 oranlarından arttırmıştır. 2001 yılında yapılan bir çalışma ile *XTH23* gen ekspresyonunun ekzojen uygulanan bitki büyüme hormonlarıyla düzenlendiği, bitki büyüme hormonları arasında en fazla 1 μM brassinolide uygulaması sonucu ekspresyonunun teşvik edildiği tespit edilmiştir (Yokoyama ve Nishitani, 2001). Bununla birlikte, farklı bir çalışmada *XTH23* geninin ekspresyon seviyesinin yaprak, gövde ve çiçek kısımları ile karşılaştırıldığında kök dokusunda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Yokoyama ve Nishitani, 2001).

EBL hormonu, beş haftalık bitkilerin köklerinde ve her iki grup bitkinin yaprak dokusunda *XTH23* geninin transkript seviyesinin önemli oranlarda artmasına neden olmuştur (Tablo 11,12 ve 13). BR hormonun *A. thaliana* 'da farklı dokularda *XTH23* geninin ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmış olmakla birlikte, ilk defa bu çalışmada EBL hormonu bir stres ile birlikte uygulanmıştır.

Hücre duvarı biyosentezi sırasında pektin polisakkartleri pektin metilesteraz enzimleri (PME) tarafından de-esterefiye edildikten sonra duvar yapısına katılabilmektedir. PME'ler enzimatik aktivitesi sayesinde bitki gelişim sürecinde veya stres durumunda hücre duvarı genişleşmesi ve hücre duvarı oluşumu gibi hücre duvarının yapısal ve işlevsel özelliklerinin düzenlenmesinde rol almaktadırlar (Richard vd., 1994; Wolf vd., 2003). Abiyotik stres şartları altında hücre uzaması nispeten devam ettirebilmek için primer hücre duvarı pektin miktarında bir artış meydana gelmektedir. Pektin polisakkaritleri sentezlendikten sonra pektin metil esteraz (PME) enzimi tarafından de-esterefiye edilerek hücre duvarı yapısına katılmaktadır. Stres koşulları altında PME gen ekspresyonu ve enzim aktivitesi artmaktadır (Gall vd., 2015). Normal ve stres şartları altında *Arabidopsis* bitkisinde BR sinyali, pektin bağımlı hücre duvarı bütünlüğünü kontrol etmek için metil

esterli pektin polisakkaritlerinin modifikasyonundan sorumlu PME aktivitesi ile ilişkilidir (Rao ve Dixon, 2017).

Tez çalışmasında bor eksikliği ve toksik bor seviyesinin neden olduğu stres koşulları altında *PME2* ve *PME41* genlerinin ekspresyonu ve ekspresyon seviyesi üzerine EBL hormonunun etkisi araştırılmıştır. Tek başına yapılan EBL veya borik asit uygulamaları beş haftalık bitkilerin yapraklarında *PME2* gen ekspresyon seviyesini artırırken, kombine uygulamaları ekspresyonu daha da arttırmıştır (Tablo 11). On haftalık bitkilerde ise bor eksikliği ve toksisitesi *PME2* ekspresyon seviyesinde değişiklik meydana getirmez iken, EBL ile birlikte uygulandıklarında, ekspresyonu yüksek oranlarda arttırmıştır (Tablo 13). *A. thaliana* fidelerinde yapılan bir çalışmada PME aktivitesine müdehale edilmesi sonucu (PMEI over ekpresyonu ya da EGCG kimyasal inhibitorü) hücre duvarı pektin miktarının azalmasına ve bu azalmaya bağlı olarak tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizma ile BRI1 reseptörünün PME'lerinde dahil olduğu duvar modifikasyonundan sorumlu ajanların ekpresyonunu indüklediği tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmayla BR sinyallenmesinin PME gen ekspresyonunu uyardığı ortaya konulmuştur (Wolf vd., 2012).

Kök dokusunda ise yaprak dokusundan tamamen farklı bir ekspresyon profili tespit edilmiştir. Tek başına yapılan EBL uygulamaları her iki grup bitkinin *PME2* gen ekspresyonunu azaltmış, on haftalık bitkilerde ise yüksek konsantrasyonda borik asit uygulaması ekspresyonun azalmasına neden olmuştur (Tablo 12 ve 14). Salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde yaplan bir çalışmada yüksek bor konsantrasyonunda (5 mM) erken gözlenen etki, kök uzamasının baskılanması olmuştur. Söz konusu çalışmada bor toksisitesine maruz kalan bitki köklerinde *PME2* gen ekspresyonunun kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Wang vd., 2010). Borik asit eksikliği veya toksisitesi ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise *PME2* transkript seviyesini belirgin oranlarda hem beş hem on haftalık bitkilerde azaltmıştır (Tablo 11-14). *Arabidopsis* fidelerinde soğuk ve donma stresine tepki olarak BR'lerin PME gen ekpresyon seviyesini teşvik ettiğini ve hücre duvar sertliğini arttırmak için PME aktivitesini tetiklediği gösterilmiştir (Qu vd., 2011).

Pektin metilesteraz gen ailesine ait ekspresyon seviyesi incelenen diğer bir gen *PME41*'dir. *PME41* geninin ekspresyon seviyesi beş ve on haftalık bitkilerin yaprak ve kök dokularında EBL uygulaması ile artmış (beş haftalık bitkilerin kök dokuları hariç), bor stresleri ile birlikte yapılan EBL uygulanması ise ekspresyonu daha da arttırmıştır (Tablo

11-14). Qu vd. (2011) *Arabidopsis* fidelerinde soğuk stresinin PME aktivitesini arttırdığını, soğuk stresi ile birlikte yapılan EBL (1 μM) uygulamasının ise *PME41* gen ekspresyonunu ve PME aktivitesini daha da arttırdığını saptamışlardır. Yabanıl tip ve BR-duyarlı mutantlar (*bzr1-1D, bri1-116* heterezigot ve homozigot*) A. thaliana* bitkilerinde yaptıkları analizler ile soğuk stresi altında PME aktivitesinin düzenlenmesinin BR sinyal yoluna bağlı olduğunu ve soğuk stresine karşı BR'lerin pozitif etkisini ortaya koymuşlardır (Qu vd., 2011). Stres şartları altında PME genlerinin ekspresyonun uyarıldığı bilinmektedir (Gall vd., 2015). Fakat yapılan literatür çalışmasında bor stresi altında *PME41* gen ekspresyonunun nasıl düzenlendiğini açıklayan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu kapsamda tez çalışmasından elde edilen bulgular yenilik arz etmektedir.

Plazma membranında bulunan *SEB1* (COBRA-like protein-7 procursor, *COLB7*) proteini hücre büyümesi ve hücre duvarı biyosentezinde selüloz mikrofibrillerinin organizasyonunda rol oynamaktadır. Bitkilerin rozet yaprak ve kök kısımları dahil olmak üzere bütün organlarında sentezlendiği tespit edilmişir (URL-3, 2015). Müssig vd., (2002) yaptıkları çalışmada ekzojen brassinosteroid uygulamasının bitkide *SEB1* gen ekspresyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Beş haftalık bitkilerin kök dokusunda EBL hormonu, hem tek başına hem de bor stresleri ile birlikte uygulandığında *SEB1* gen ekspresyonunu baskılarken (Tablo 12), on haftalık bitkilerin yapraklarında ekspresyonu arttırmıştır (Tablo 13). EBL hormonunun bitki büyüme dönemine farklı sonuçlar verdiği ve dokuya spesifik *SEB1* gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Yapılan literatür taramasında bor stresinde *SEB1* geninin ekspresyonunun nasıl düzenlendiği üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Farklı gelişim dönemlerinde (beş ve on haftalık) bor eksikliği ve yüksek bor konsantrasyonuna maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin kök ve yaprak dokularında bor stresinin hücre çeperi üzerine etkileri ve brassinosteroidlerin stres yanıtında hücre çeperi modifikasyonlarının düzenlenmesindeki rolü RT-PCR tekniği ile transkripsiyonel seviyede araştırılmıştır. Bor stresine yanıtta hücre çeperi biyosentez ve modifikasyonunda rol oynayan genlere ait mRNA seviyelerinin dokuya ve bitkinin strese maruz kaldığı gelişim dönemine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bor eksikliği ve yüksek bor konsantrasyonunun araştırılan bazı genlerin ekspresyon seviyelerini benzer şekilde etkilediği tespit edilmiştir.

Hücre duvarının yeniden düzenlenmesinin BR sinyal yolağı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. BR'ler bitkilerde hücre duvarı genişleme proteinleri ve selüloz, lignin ve pektin gibi duvar bileşenlerini etkilemektedir (Rao ve Dixon, 2017). Yapılan çalışma BR'lerin bor stresi yanıtında hücre duvarı üzerine etkilerini aydınlatmaya yönelik ilk çalışma olma özelliğindedir. Bor stresi ile birlikte EBL uygulamaları sonucunda hücre duvarı ile ilişkili gen ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler bitkilerde bor stresine karşı tolerans mekanizmasında BR'lerin katkı sağladığını göstermektedir.

Bitki hücre duvarında bor stresi ve bor-brassinosteroid etkileşimi üzerine yapılan ilk çalışma özelliğine sahip tez çalışması, BR aracılı hücre duvarı homeostasinin anlaşılmasına katkı sağlamakla birlikte bitkilerde transgenik yaklaşımlarla bor stres toleransını arttırmak amacıyla yapılan çalışmalara destek sağlayacak niteliktedir. Bununla birlikte BR'lerin hücre duvarı üzerine etkilerinin tam olarak aydınlatılabilmesi için proteomik vb. ileri araştırma teknikleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Arteca, M.J. ve Arteca, N.R. (2001). Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plant. *Physiologia Plantarium,* 112: 104-112.

Aquea, F., Federici, F., Moscoso, C., Vega, A., Jullian, P., Haseloff, J. ve Arce-Johnson, P. (2012). A molecular framework for the inhibition of *Arabidopsis* root growth in respınse to boron toxicity. *Plant, Cell and Environment,* 35: 719-734.

Başalp, A., Öncel, I. ve Koç, E. (2011) Bor (B) toksisitesine toleranslı ve duyarlı buğday fidelerinde bazı fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 15(3):135-141.

Baykal, A.,Ş. ve Öncel, I. (2006). Buğday fidelerinin bor toksisitesine toleransında çözünür fenolik ve çözünür protein miktarındaki değişmeler. *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Fen Bilimleri Dergisi,* 27 (1): 13-25.

Bayrak, H., Önder, M. Ve Gezgin, S. (2005). Bor uygulamasının nohut (*Cicer arietinum L.*) çeşitlerinde verim ve bazı verim unsurlarına etkileri. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi,* 19(35): 66-74.

Behnamnia, M., Kalantari, K. M. ve Ziaie, J. (2009) The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress, *Turk J Bot,* 33: 417-428.

Belkhadir, Y. ve Chory, J. (2006). Brassinosteroid signaling: A paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science,* 314: 1410-1411.

Blewins, G.D. ve Lukaszewski, M.K. (1998). Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* 49:481–500.

Breusegem, V.F. ve Dat, F.J. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology,* 144: 384-390.

Brown, H.P., Bellaloui, N., Wimmer, A.M.,Bassil, S.E., Ruiz, J., Hu, H., Preffer, H., Dannel, F. ve Röhheld, V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biology,* 4: 205-223.

Burton, A.R. ve Fincher, B.G. (2014). Plant cell engineering: applications in biofuel production and improved human health. *Current Opinion in Biotechnology,* 26:79-84.

Büyük, İ., Aydın-Soydam, S. ve Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi,* 69(2): 97-110.

Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, S.B. ve Sangwan, S.R. (2001). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana.* II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bul1* mutant. *Planta,* 212: 672-683.

Camacho-Cristobal, J.J., Herrera-Rodriguez, B.M., Beato, M.V., Rexach, J., Navarro-Gochicoa, T.M., Maldonado, M.J. ve Gonzalez-Fontes, A. (2008a). The expression of several cell wall-related genes in Arabidopsis roots is down-regulated under boron deficiency. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 351-358.

Camacho-Cristobal, J.J., Rexach, J. ve Fontes, G.A. (2008b). Boron in plants: deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1247-1255.

Cavalier, M.D., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabotina, A.O., Hahn, G.M., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, V.N. ve Keegstra, K. (2008). Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant Cell*, 20: 1519-1537.

Cho, T.H. ve Cosgrove, J.D. (2000). Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana,PNAS,* 97: 9783-9788.

Choi, D., Cho, T.H. ve Lee, Y. (2006). Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum,* 126: 511–518.

Clouse, S. (2014). Signaling: brassinosteroid signaling. *Molecular Biology.*

Cosgrove, J.D. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature,* 6: 850-861.

Cosgrove, J.D. ve Jarvis, C.M. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science,* 3.

Davis, P.H. (1965). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands.* Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburg., 489-490s.

Degenhardt, B. ve Gimmler, H. (2000). Cell wall adaptations to multiple envirpnmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany,* 51 (344): 595-603.

Delmer, P.D. ve Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell,* 7: 987-1000.

Demirtaş, A. (2005). Bitkide bor ve etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 36 (2): 217-225.

Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, F.K. ve Krishna, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Molecular Biology* 40: 333–342.

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

Doğan, G., Sabah, E. ve Erka, T. (2005). Borun çevresel etkileri üzerine Türkiye'de yapılan bilimsel araştırmalar. *Türkiye 19. Uluslararası Madencilik Ktiiiffrexi ve Fuarı, , IMCET2005*. İzmir. Türkiye, 09-12 Haziran 2005.

Endler, A. ve Persson, S. (2011). Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant,* 4(2): 199-211.

Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, F.R., Canut, H. ve Jamet, E. (2006). Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Methods,* 2(10).

Fujiwara, T., Hirai, M.Y., Chino, M., Komeda, Y. ve Naito, S. (1992). Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol,* 99: 263-268.

Gall, H., Philippe, F., Domon, M.J., Giller, F., Pellouxand, J. ve Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress, *Plants,* 4: 112-166.

Ghanti, F., Morito, A. ve Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Science and Plant Nutrition,* 48(3): 357-364.

Ghanti, F., Morito, A. ve Yokota, H. (2005). Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. *Plant Science,* 168: 397-405.

Goldbach, H. ve Wimmer, A.M. (2007). Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure?. *Journal Plant Nutrition Soil Science,* 170: 39-48.

Gökdoğan, Y.E. ve Bürün, B. (2015a). Ekolojik bir problem olarak toprak tuzluluğu ve bitkilerdeki etkileri. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi,* 6: 70-76.

Gökdoğan, Y.E. ve Bürün, B. (2015b). 24-Epibrassinolid ön uygulaması yapılmış domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tohumlarının nacl stresi koşullarında çimlenmesi ve fide gelişimi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi,* 15: 18-27.

Hamann, T., Osborne, E., Youngs, L.H., Misson, J., Nussaume, L. ve Somerville, C. (2004). Global expression analysis of CESA and CSL genes in *Arabidopsis. Cellulose,* 11: 279-286.

Handford, G.M., Baldwin, C.T., Goubet, F., Prime, A.T., Miles, J., Yu, X. Ve Dupree, P. (2003). Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana. Planta,* 218: 27-36.

Hazen, P.S., Scott-Craig, S.J. ve Walton, D.J. (2017). Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant Physiology,* 128: 336-340.

Hu, H., Brown, H.P. ve Labavitch (1996). Species variability in boron requrement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany,* 47(295): 227-232.

Kagale, S., Divi, K.U., Krochko, E.J., Keller, A.W. ve Krishna, P. (2007). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta,* 225:353–364.

Kaul, S., Koo, L.H., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T. ve ark. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature,* 408: 796-815.

Kasajima, I., ve Fujiwara, T. (2007). Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. *Plant Biotechnology,* 24: 355-360.

Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology,* 154: 483-486.

Khripach, V., Zhaninshii, V., ve Groot, A. (2000). Twenty tears of brassinosteroide: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany,* 86: 441-447.

Koç, A. (2015). Pamuklu Tekstil Atıklarından Selüloz Eldesi, Metil Selüloz Sentezi, Karakterizasyonu Ve Kullanım Alanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi (yayımlanmış), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 63 s.

Krishna, P., Prasad, D.B. ve Rahman, T. (2017). Brassinosteroid action in plant abiotic stress tolerance. *Brassinosteroids:Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology,* 1564.

Kwon, H., Yokoyama, R. ve Nishitani, K. (2005). A proteomic approach to apoplastic proteins ınvolved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 46(6): 843–857.

Lerouxel, O., Cavalier, M.D., Liepman, H.A. ve Keegstra. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Current Opinion in Plant Biology,* 9: 621-630.

Li, Y., Jones, L. ve McQueen-Mason, S. (2003). Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology,* 6: 603-610.

Li, K., Kamiya, T. ve Fujiwara, T. (2015). Differantial Roles of PIN1 and PIN2 in root meristem maintenance under low-B conditions in *Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiology,* 56(6): 1205–1214.

Liepman, H.A., Wightman, R., Geshi, N., Turner, R.S. ve Scheller, V.H. (2010). Arabidopsis-a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal*, 61: 1107-1121.

Liu, Y., Lu, S., Zhang, J., Liu, S. ve Lu, Y. (2007). A xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in *Arabidopsis.Planta,* 226: 1547-1560.

Liu, G., Dong, X., Liu, L., Wu, L., Peng, S. ve Jiang, C. (2014). Boron deficiency is correlated with changes in cell wall structure that lead to growth defects in the leaves of navel orange plants. *Scientia Horticulturae,* 176: 54-62.

Livak, K..J. ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis og Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCr and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods, 25: 402-408.

Matoh, T. (1997). Boron in plant cell walls. *Plant and Soil,* 193: 59-70.

McCartney, L., Marcus, E.S. ve Knox, P.J. (2005). Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry,* 53(4): 543-546.

Mendu, V., Stork, J., Harris, D. ve DeBolt, S. (2011). Cellulose synthesis in two secondary cell wall processes in a single cell type, *Plant Signaling and Behavior,* 6 (11): 1638-1643.

Meinke, W.D., Cherry, M.J., Dean, C., Rounsley, D.S. ve Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science,* 282: 662.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science,* 7(9): 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. Ve Breusegem, V.F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Science,* 9(10): 490-498.

Müssig, C., Fischer, S. ve Altmann, T. (2002). Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol,* 129: 1241-1251.

Müssig, C., Shin, G. ve Altmann, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis. Plant Physiol,* 133: 1261-1271.

Nable, O.R., Banuelos, S.G. ve Paull, G.J. (1997). Boron toxicity. *Plant and Soil,* 193: 181-198.

Nafisi, M., Fimognari, L. ve Sakuragi, Y. (2015). Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry,* 112: 63-71.

Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, A.N. ve Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-basd transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in Plant Science,* 6.

Nakaya, M., Tsukaya, H., Murakami, N. ve Kato, M. (2002). Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells to *Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiolgy,* 43 (2): 239-244.

O'Neill, A.M., Eberhard, S., Albersheim, P. ve Darvill, G.A. (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science,* 294: 846-849.

Paepe, D.A., Vuylsteke, M., Hummelen, V.P., Zabeau, M. Ve Straeten, D.V.D. (2004). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to etylene in *Arabidopsis. Tne Plant Journal,* 39: 537-559.

Park, H.C., Kim, T., Son, S., Hwang, J., Lee, C.S., Chang, C.S., Kim, H.S., Kim, W.S. ve Kim, S. (2010). Brassinostreoids control AtEXPA5 gene expression in *Arabidopsis thaliana. Phytochemistry,* 71 : 380–387.

Pauly, M., Albershim, P., Darvill, A. ve York, S.W. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal,* 20 (6): 629-639.

Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, N.J., Höfte, H., Laufs, P., Pelloux, J. ve Mouille, G. (2008). *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Current Biology,* 18: 1943-1948.

Pelloux, J., Rusterucci, C. ve Mellerowicz, J.E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *TRENDS in Plant Science,* 12(6): 267-277.

Persson, S., Paredez, A., Caroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., Khitrov, N., Auer, M. ve Somerville, R.C. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *PNAS,* 104 (39): 15566-15571.

Princi, P.M., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F. ve Abenavoli, R.M. (2016). Boron toxicity and tolerance in plants: recent advancesand future perspectives, Chapter 5. In *Plant Metal Interaction*, Eds.; Ahmad, P., Elsevier, pp. 115-147.

Qu, T., Liu, R., Wang, W., An, L., Chen, T., Liu, G. ve Zhao, Z. (2011). Brassiosteroids regualte pectin methylesterase activity and *AtPME41* expression in *Arabidopsis* under chilling stress. *Cryobiology,* 63, 111-117.

Raiola, A., Camardella, L., Giovane,A., Mattei, B., Lorenzo, D.G., Cervone, F. ve Bellincampi, D. (2004). Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Letters,* 557: 199-203.

Rao, X. ve Dixon, R. (2017). Brassinosteroid mediated cell wall remodelling in grasses under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science.* 8.

Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R. ve Graham, R.D. (2004). A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell and Environment,* 25: 1405-1414.

Richard,L., Qin, L., Gadal, P. ve Goldberg, R. (1994). Molecular cloning and characterisation of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* (L.). *FEBS Letters,* 355: 135-139.

Roberts, W.A. ve Bushoven, T.J. (2007). The cellulose synthase (*CESA*) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol. ,* 63: 207-2019.

Roessner, U., Patterson, H.J., Forbes, G.M., Fincher, B.G., Langridge, P. ve Bacic, A. (2006). An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. *Plant Physiology,* 142: 1087-1101.

Sampedro, J. ve Cosgrove, J.D. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology,* 6 (242).

Showalter, M.A. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell,* 5: 9-23.

Singh, P.A., Tripathi, K.S., Nath, P. ve Sane, P.A. (2011). Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes, RbXTH1, and RbXTH2. *Journal of Experimental Botany,* 62(14): 5091-5103.

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. ve Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science,* 306: 2206-2211.

Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 22:53-78.

Spurr, R.A. (1957). The effect of boron on cell-wall structure in celery. *American Journal of Botany,* 44 (8): 637-650.

Surgun, Y., Yılmeaz, E., Çöl, B. ve Bürün, B. (2012). Altıncı grup bitki hormonu: brassinısteroidler. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi,* 8(1): 27-46.

Surgun, Y., Çöl, B. ve Bürün, B. (2016a). 24-Epibrassinolide ameliorates the effects of boron toxicity on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh by activating an antioxidant system and decreasing boron accumulation. *Acta Physiol Plant,* 38:71.

Surgun, Y., Çöl, B. ve Bürün, B. (2016b). Differential expression analysis of boron transporters and some stress-related genes in response to 24-epibrassinoldie and boron by semi-quantitative RT-PCR in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *GENETİKA,* 48 (2): 547-563.

Taiz, L. ve Zeiger, E. (2008). *Bitki Fizyolojisi*, Çeviri editörü: Türkan İ., Bölüm 15: Hücre Çeperleri: Yapısı, Biyogenezi ve Genişlemesi, s:314-336, Palme Yayıncılık, Ankara.

Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science,* 5: 771.

URL-1 (2017). Dünya bor rezervleri hakkında bilgi. http://www.enerji.gov.tr/tr-TR/Sayfalar/Bor, T.C Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Erişim Tarihi: 25 Mayıs 2017.

URL-2 (2017). Primer dizayn programı. http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/ , Erişim Tarihi: 1 Ocak 2017.

URL-3 (2015). The Arabidopsis Information Resource, http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=128801&type=locus, Erişim Tarihi: 1 Haziran 2017.

Vanholme, R., Acker, V.R. ve Boerjan, W. (2010). Potential of *Arabidopsis* systems biology to advance the biofuel field. *Trends in Biotechnology,* 28(11): 543-547.

Wang, B., Shi, L. ve Li, Y. (2010). Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber *(Cucumis sativus* L.*)* seedlings. *Planta,* 231: 1301-1309.

Wei, C.P., Zhang, Q.X., Zhao, P. ve Wang, C.X. (2011). Regulation of stomatal opening by the guard cell expansin *AtEXPA1*. *Plant Signaling & Behavior,* 6(5): 740-742.

Weng, J., Li, X., Bonowitz, D.N. ve Chapple, C. (2008). Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology,* 19: 166-172.

Wieczorek, K., Golecki, B., Gerdes, L., Heinen, P., Szakasits, D., Durachko, M.D., Cosgrove, J.D., Kreil, P.D., Puzio, S.P., Bohlmann, H. ve Grundler, W.M.F. (2006). Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana. The Plant Journal,* 48: 98-112.

Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T ve Greiner, S. (2003). İdentification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis. FEBS Letters,* 555:551-555.

Wolf, S., Mravec, J., Greiner,S., Mouille, G. ve Höfte, H. (2012). Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Current Biology,* 22: 1732–1737.

Xie, L., Yang, C. ve Wang, X. (2011). Brassinosteroids can regualte cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis. Journal of Experimental Botany,* 26: 1-12.

Yokoyama, R. ve Nistitani, K. (2001). A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall constructio in spesific organs of *Arabidopsis. Plant and Cell Physiology,* 42(10):1025-1033.

Yusuf, M., Khan, A.T. ve Fariduddin Q. (2017). Brassinosteroids: Physiologicalrolesand its signalling in plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics,*2: 241-260.

Zhang, X., Wei,P., Xiong, Y., Yang, Y. ve Chen, J. (2011). Overexpression of the *Arabidopsis* α-ekspansin gene AtEXPA1 accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elatic modulus. *Plant Cell Rep* , 30:27–36.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	:	Rabia İŞKİL
Doğum Yeri ve Tarihi	:	BARTIN / 14.12.1993

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi	:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2011-2015.
Yüksek Lisans Öğrenimi	:	Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, Tezli YL, 2015- 2017.
Bildiği Yabancı Diller	:	İngilizce
Projeler	:	Yüksek Konsantrasyonda Krom, Kurşun ve Çinko Uygulamalarının Çilek (*Fragaria x ananassa*) Bitkisinde Genotoksik, Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Araştırılması, B.Ü.BAP, (2016-2017), Araştırmacı.
Yayınlar	:	Ünver Y., Kaysim G.M., Solak K., **İşkil R**., Kılıç D., Karakurt C.M., Fındıkkıran E.N. (2016). Recombinant Honey Bee Prepromelittin Production by *Pichia pastoris*, International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS), 21-23 Nisan, Antalya, Türkiye (Sözlü sunu). Surgun Acar Y., **İşkil R**., Bürün B. (2017). Safran (*Crocus sativus* L.) Bitkisinde Biyoteknolojik Çalışmalar, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7 (2): 259-268.

İş Deneyimi

Stajlar	:	Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Nörobiyoloji Laboratuvarı, 23 Haziran-8 Ağustos 2014.

İletişim

E-Posta Adresi : rabia.iskil@gmail.com

Tarih : 03/07/2017 (Tez sınav tarihi)