



T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI MİKTARLARDA BOR UYGULANAN  
*Puccinellia distans* BİTKİSİNDE ENERJİ  
METABOLİZMASI VE TAŞIMA İLE İLİŞKİLİ  
GENLERİN QRT-PCR ANALİZİ

Fatma AKIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı

Şubat-2018  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI MİKTARLARDA BOR UYGULANAN *Puccinellia distans* BİTKİSİNDE ENERJİ METABOLİZMASI VE TAŞIMA İLE İLİŞKİLİ GENLERİN QRT-PCR ANALİZİ

Fatma AKIN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2018, 45 Sayfa

Jüri

Danışman: Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Sait GEZGİN

Yrd. Doç. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ

Abiyotik ve biyotik stres faktörleri verimi önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir. Kurak ve yarı kurak bölgelerde B (bor) toksisitesi, yağışlı iklimin hâkim olduğu bölgelerde ise B noksanlığı verimi düşürmektedir. *Puccinellia distans* tuz ve B toksisitesine tolerans gösteren ve Türkiye’de bor madenleri civarında yaşayabilen hiperakümülatör bir bitkidir. Bu bitkinin B stresi toleransı hakkında moleküler düzeyde yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu mekanizmayı anlayabilmek için GeneFishing™ teknolojisini kullanarak farklı düzeylerde anlatım yapan gen fragmentleri izole edilmiştir. Bu çalışmada *P. distans* bitkisi 0; 2,5; 250; 500 ve 1000 ppm B dozlarına muamele edilmiştir. İzole edilen fragmentlerden NAC transkripsiyon faktörü ve PsaG’nin QRT-PCR ile validasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitkilerde stres varlığında prolinin biyosentezi artmaktadır. Prolinin biyosentezinde görev alan iki önemli enzim (P5CR ve  $\delta$ -OAT), P5CR ve  $\delta$ -OAT genleri tarafından kodlanmaktadır. Homolog BOR2 genleri *HvBOR2* ve *TaBOR2* ise bor stresi altında B taşınmasında çalışmaktadır. *P. distans* yaprak örneklerinde P5CR ve  $\delta$ -OAT ve kök örneklerinde ise *HvBOR2* ve *TaBOR2*’nin gen ifade miktarları Real time PCR metodu ile ölçülmüştür. Prolin ve BOR2 hakkında elde edilen sonuçlar, literatür ile uyumludur.

**Anahtar Kelimeler:** Bor, Bor noksanlığı, Bor toksisitesi, Bor Taşıyıcıları, Enerji metabolizması, Hiperakümülatör, *Puccinellia distans*, Prolin.

## ABSTRACT

### MS THESIS

# QRT-PCR ANALYSES OF GENES INVOLVED IN ENERGY METABOLISM AND TRANSPORT IN *Puccinellia distans* GROWN UNDER DIFFERENT LEVELS OF BORON APPLICATIONS

Fatma AKIN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
SELÇUK UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION

Advisor: Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2018, 45 Pages

Jury

Advisor: Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Sait GEZGİN

Asst. Prof. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ

Abiotic and biotic stress factors have a significant negative effect on crop yield. B toxicity in arid and semi-arid regions, and B deficiency in high rainfall region constrain the crop yield. *Puccinellia distans* is a hyperaccumulator plant that is able to live nearby to Boron mining sites and it is tolerant to high B concentrations and salinity. However, there is insufficient molecular research regarding the tolerance mechanism of *P. distans*. In order to understand this mechanism, differentially expressed genes, using GeneFishing™ technology, were isolated. In this study, *P. distans* was subjected to 0, 2.5, 250, 500 and 1000 ppm boron dosages. The isolated gene fragments: NAC transcription factor and PsaG, were validated by using QRT-PCR. Under stress conditions, the enzymes P5CR and  $\delta$ -OAT which are encoded by genes of the same name, work towards by increasing the amount of biosynthesized proline, while under boron stress the homolog *BOR2* genes: *HvBOR2* and *TaBOR2* mediate in the transportation of boron. Real time PCR was used to measure the expression levels of *P5CR* and  *$\delta$ -OAT* in the leaf samples and *HvBOR2* and *TaBOR2* in the root samples of *P. distans*. The results regarding proline and BOR2 were inlined with the literature.

**Keywords:** Boron, Boron deficiency, Boron toxicity, Boron transporter, Energy metabolism, Hyperaccumulator, *Puccinellia distans*, Proline.



Anneme ...

## ÖNSÖZ

*“Hayatta hiçbir şey korkmak için değil anlaşılmaq için vardır. Şimdi vakit daha fazla anlama zamanı, öyleyse daha az korkmalı.”* Önsözümde Marie Curie'nin bizlere bilimin yolunda deniz feneri olacak nitelikte olan şu sözlerle başlamak istedim.

Çok şanslıyım ki gerçekten çok iyi bir danışman hocayla akademik hayatımın başında yollarımız keşişti. Sadece tez sürecimde değil, yüksek lisansa başladığımdan günden itibaren ondan çok şey öğrendim. Akademik ahlak, ilkeli olmak ve bu ilkelere sahip çıkmak, cesur bir bilim insanı nasıl olunur, azimli olmak, problemler karşısında sebat ederken bir yandan araştırmacı ruhunu canlı tutmak ve sayamayacağım diğer özelliklerin tek bir bünyede toplanabildiğini gördüm. İşte bu karaktere sahip olan danışman hocam Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya bana vermiş olduğu desteklerden ve ilgiden dolayı minnettarım.

Tez çalışmam süresince ne zaman arasam yardımcı olan, yeri geldiğinde kimyasal paylaşan İstanbul Kültür Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Özge Çelik'e çok teşekkür ederim.

Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü öğretim üyeleri başta Prof. Dr. Sait Gezgin ve Doç. Dr. Mehmet Hamurcu'ya bana olan destekleri için teşekkür ederim.

Berber güzel anılar biriktirdiğimiz arkadaşlarımın isimlerini anmazsam bu önsöz eksik kalır. Özellikle iyi bir ekiple çalışmanın, tecrübe ve bilgi birikimini paylaşmanın zevkini tatmama vesile olan laboratuvar arkadaşlarım Noyan Eken, Kamer Gülcan, Pamela Aracena Santos, Hatice Süslü, Arş. Gör. Nur Koç'a ve Ayşegül Korkmaz'a varlıkları ve arkadaşlıkları için çok teşekkür ederim. Deney yaparken sıkıştığım noktalarda zihnimin açılmasına yardımcı olan tecrübelerini paylaşan Moleküler Biyolog arkadaşlarım Zuhal Tunç-Zengin, Yasemin Gürbüz, Yasemin Yıldızhan, Emine Dindar, Burçin Acar, Buket Bozkurt ve Adem Kocaman'a teşekkür ederim. Varlıkları için Lale Cansu Tutar, İnci Dursundağ, Sevde Selcan Karakaş, Gülşah Sackmann ve Merve Kalıntaş'a teşekkür ederim.

Bürokratik işlerin sorunsuzca yürümesinde çalışan ve hep yardımcı olan S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, BAP Koordinatörlüğü ve Ziraat Fakültesi dekanlık çalışanlarına çok teşekkür ederim. 2140072 no'lu 1003 çağrılı proje kapsamında burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a ve 17401119 no'lu proje kapsamında tez projemi maddi anlamda destekleyen BAP koordinatörlüğüne de ayrıca teşekkür ederim.

Hayata duruşu ile kendime örnek olarak aldığım Av. Serpil Parlak'a maddi ve manevi desteği için çok teşekkür ederim. Tüm zorluklar karşısında cesur olmayı, sevdikleri için fedakârlık edebilmeyi, ayaklarının üstünde durabilmeyi ve her şeye rağmen kocaman gülümsemeyi canım annemden başka kimseden öğrenemedim. Anneme ve kardeşime bana vermiş oldukları destek ve duydukları inanç için sonsuz minnettarım.

Fatma AKIN  
KONYA-2018

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ.....</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>1</b>
1.1. Tez Çalışmasının Amacı.....	2
1.2. Bor (B).....	3
1.3. Bor Elementi ile Diğer Canlı Gruplarında Yapılan Çalışmalar .....	4
1.4. Türkiye’de Bor Rezervleri ve Türkiye Topraklarında Bor Durumu .....	4
1.5. Bitkilerde Bor Alımı, Bor Stresi ve Fitoremediasyon.....	5
1.6. <i>Puccinellia distans</i> (Jacq.) Parl.....	10
1.7. Farklı Düzeylerde Anlatım Yapan Genlerin Belirlenmesi .....	12
1.8. Bor Stresinde Bitkilerde Çalışan Taşıyıcı Proteinler .....	13
1.9. Glutamin Sentetaz ve Prolin İlişkisi.....	15
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
2.1. Bitkinin Yetiştirilmesi ve Bor Uygulamaları.....	18
2.2. Bor Stresine Tepki Veren Genlerin Farklılık Anlatım Yolu ile Belirlenmesi ..	18
2.3. Bitki Yaprak ve Kök Örneklerinden RNA İzolasyonu .....	19
2.4. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	20
2.5. cDNA çevrimi.....	21
2.6. DEG Fragmentlerinin Validasyonunda Kullanılan Primerler .....	21
2.7. Tez Çalışmasında Kullanılan Diğer Primerler .....	22
2.8. Real time-PCR Reaksiyonları.....	22
2.9. Real time PCR Sonuçlarının Analizi.....	23
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>24</b>
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>31</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>44</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

B: Bor  
B(OH)<sub>3</sub>: Borik Asit  
B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>: Borat  
°C: Santigrat  
dS m<sup>-1</sup>: desi Siemens/metre  
mM: mili molar  
N: Azot  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Amonyum  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrit

### Kısaltmalar

ABD: Amerika Birleşik Devletleri  
ACP: Annealing Control Primers  
bç: Baz çifti  
BOREN: Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü  
CaCl<sub>2</sub>: Kalsiyum Klorür  
C<sub>q</sub>: Quantification cycle  
C<sub>t</sub>: threshold cycle  
cDNA: complementary DNA  
DEG: Differentially expressed genes  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
dk: Dakika  
FAO: Food and Agricultural Organisation  
GS: Glutamin sentetaz  
GOGAT: Glutamat sentaz  
GDH: Glutamat dehidrogenaz  
NaCl: Sodyum Klorür  
ppm: Parts per million (milyonda bir)  
ROS: Reaktif Oksijen Türleri  
RNA: Ribonükleik asit  
ng: Nano gram  
µl: Mikro litre

## 1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bor (B), bitkilerin vejetatif ve generatif gelişimlerini etkileyen, metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan bir mikro besin elementidir. Borun bitki metabolizmasındaki kesin rolü tam olarak bilinmemesine rağmen yetersiz veya aşırı miktarda B alımına bağlı olarak bitkilerde çok sayıda metabolik bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Blevins ve Lukaszewski, 1998). B'un bitkilerde en iyi bilinen rolü, hücre duvarında Ramnogalakturonan II (RGII) pektinlerini borat diester bağları ile çapraz bağlamasıdır (Kobayashi ve ark., 1996).

Bitkilerde B alımı, toprakta veya sulama sularında bulunan B içeriğinden ve özellikle topraklardaki drenajın yetersizliğinden etkilenmekte ve bitkilerin B ihtiyacı toprak ve iklim koşulları arasındaki ilişki, bitki türü ve varyetesinden etkilenmektedir (Gupta, 1993). Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde ortaya çıkan B toksisitesi kültür bitkilerinde ciddi verim kayıplarına ve verim kalitesinde düşüşe neden olmaktadır. Türkiye topraklarına benzerlik gösteren Güney Avustralya topraklarında, Cartwright ve ark. (1984) B toksisitesi kaynaklı olarak arpa bitkisinde verimin %17 oranında düştüğünü belirtmişlerdir. B noksanlığı problemi ise dünyada oldukça yaygın olup 80'den fazla ülkede 132 kültür bitkisini etkilediği rapor edilmiştir (Shorrocks, 1997). Wei ve ark. (1998) kolza tarımının yapıldığı Çin'in güneydoğusunda B noksanlığının %40'lık verim düşüşüne neden olduğunu belirtmişlerdir. B noksanlığı, B'la zenginleştirilmiş gübrelerin toprağa ve yaprağa uygulanması ile düzeltilebilmektedir fakat B toksisitesini ortadan kaldırmak çok daha meşakkatli ve masraflı bir süreçten oluşmaktadır. Diğer tuzlu topraklarla (NaCl, CaCl<sub>2</sub>) kıyaslanınca, B'lu toprakların ıslah süreci daha yavaş gerçekleşmektedir. pH'nın yükselmesi ve dolayısıyla toprakta B adsorpsiyonunun artması, alkali ve nötr topraklarda B'un yıkanarak uzaklaşmasını zorlaştıran en önemli sebeplerden biridir. Toprakta B'un uzaklaştırılması için gerekli olan su miktarı, tuzlu topraklardan tuzun (NaCl) uzaklaştırılması için gerekli olan su miktarına göre 3 kat daha fazladır (Keren ve Bingham, 1985; Mengel ve ark., 2001). Bu da pratikte konvansiyonel yöntemlerle B'un topraktan arındırılmasını imkansız kılar.

Bitkiler, türler arasında ve tür içindeki genotipler arasında B stresine karşı farklı düzeylerde tolerans cevabı oluşturmaktadır. Daha iyi tolerans gösterenler tolerant, daha az tolerans gösterenler ise duyarlı olarak gruplandırılmaktadırlar (Gupta, 1993). Son 15 sene içinde, B stresine uğrayan bitkilerde toleransı artırmaya yardım eden bor taşıyıcı proteinlerin çalışma mekanizmasını moleküler düzeyde anlamaya yönelik çok sayıda



araştırma gerçekleştirilmiştir (Takano ve ark., 2002; Takano ve ark., 2008; Reid ve Fitzpatrick, 2009; Pallotta ve ark., 2014; Chatterjee ve ark., 2017). Bu mekanizmayı moleküler düzeyde anlamının B tolerant bitkilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca B ve tuz streslerinin bitkiye birlikte vermiş olduğu zarar tek bir stresin verdiği zarardan daha şiddetli olabilmektedir (Alpaslan ve Gunes, 2001). Bu noktada, B ve tuzlu toprakların ıslahı için sunulan bir çözüm yolu hiperakümülatör bitkilerin kullanıldığı fitoremediasyona başvurulmasıdır. Türkiye’de bor madenlerinin bulunduğu arazilerde toprak koşullarına adaptasyon göstermiş olan bazı hiperakümülatör bitkiler bulunmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2004). *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl., Türkiye’de çorak çimi olarak bilinen, tuzlu ve yüksek konsantrasyonda B’lu topraklara adaptasyon göstermiş olan ve belli oranda birikim de sağlayan bir hiperakümülatör bitkidir (Elçi ve Bostancıoğlu, 1981; Hamurcu ve ark., 2016).

Tarım arazilerinde verim kaybına neden olan B toksisitesi problemini düzeltmenin meşakkatli ve pahalı olması göz önüne alındığında doğal şartlarda B toksisitesine adaptasyon göstermiş olan bitkilerin adaptasyon mekanizmasını hem fizyolojik hem de moleküler düzeyde anlamak önem arz etmektedir. Bu adaptasyonun arkasında yatan mekanizmanın anlaşılıp kültür bitkilerine ıslah yolu ile aktarılması ve kültür bitkilerinin B toksisitesine adaptasyonunu artırmaya yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Yüksek düzeyde tuz ve bor içeren topraklarda metabolik faaliyetlerini devam ettirebilen monokotil *P. distans* bitkisi, yine monokotil olan majör tahıl grubu bitkiler için tuz ve B stresi toleransını araştırmak için dikotil model organizma olan *Arabidopsis thaliana* yerine bir model organizma olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir (Keskin, 2010).

### 1.1. Tez Çalışmasının Amacı

Fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde incelemeleri gerçekleştirilmiş (Keskin, 2010; Hamurcu ve ark., 2016) olan *P. distans* bitkisinde moleküler düzeyde yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla farklı B dozlarına maruz bırakılan *P. distans* bitkisinin yaprak ve kök örneklerinden farklı düzeylerde anlatım yapan genleri (differentially expressed genes=DEG) tespit etmek amacıyla Gene Fishing™ DEG Premix Kit (Seegene, Korea) kitinden faydalanılmıştır. Bu tez çalışmasında ise elde edilen enerji metabolizmasıyla ilişkili DEG bantlarının validasyonu, ayrıca farklı

dozlarda B'a maruz kalmış kök ve yaprak örneklerinde prolin biyosentezinin ve B'un taşınmasıyla ilişkili genlerin ifade düzeyleri Real time q-PCR yoluyla tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada farklı B konsantrasyonlarında yetiştirilmiş *P. distans*'ın kök ve yaprak organlarında bitkinin verdiği tepkilerin farklı düzeylerdeki gen ifadeleri ölçülmek istenmiştir. Bitkilerde sadece tek bir stres faktörüne karşı tolerans mekanizmasına sahip olmak bitkiler için yeterli değildir. Bitkiler çoğu zaman birden fazla stres faktörü ile başa çıkmak zorunda kalabiliyorlar. Hem B hem de tuz stresine yüksek derecede tolerans sergileyen *P. distans*'ın bu tolerans mekanizmasını anlamak özellikle bitkisel gıda ürünlerinin başını çeken buğdaygiller familyası grubundaki bitkilerde B stresi tolerans yeteneği kazandırmaya yönelik ıslah çalışmalarına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

## 1.2. Bor (B)

Bor elementi (B), bitkilerin büyüme ve gelişmelerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan iz elementlerden biridir. İz elementler arasında yarı metal olan tek besin elementi B'dur. Periyodik cetvelde 3A grubunda yer almakta olan B elementi Silisyum, Germanyum ve Arsenik'in de içinde olduğu metaloid grubuna dâhildir. B elementinin bitkiler için gerekli olduğu 1900'lü yılların başında Katherine Warington'un fasulye bitkisinde yaptığı çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır (Warington, 1923). Fizyolojik pH koşulları altında, B yüklü olmayan borik asit olarak bulunmaktadır (Reid, 2007). B elementi bitkiler dışında mayalar, bakteriler, diatomlar, bazı yeşil alg türleri için de besin elementi konumundadır (Loomis ve Durst, 1992; Broadley ve ark., 2012). ABD Tarım Bakanlığı, B'ü günlük öğünde alınması gereken elementler arasına 2001 yılında dâhil etmiştir (Anonymous, 2001).

Bor çok çeşitli alanlarda kullanıma sahip olan bir elementtir: Cam ve seramik, yapı malzemeleri ve çimento, temizlik ürünleri, metalürji ve malzeme, sağlık, kozmetik ve enerji sektöründe geniş bir yelpazede kullanım alanı sunmaktadır. Bitkiler için önem arz eden B'un noksanlığı durumunda tarım arazilerine gübre yolu ile takviyesi yapılmakta veya floemde şeker alkollerini taşıyan bitkilerde yapraklardan gübreleme (foliar) yolu ile bitkinin B ihtiyacı giderilebilmektedir (Brown ve Shelp, 1997)

### 1.3. Bor Elementi ile Diğer Canlı Gruplarında Yapılan Çalışmalar

B'un kanser biyolojisi çalışmalarında anti-kanser ajanı olarak kullanımını, bağışıklık sistemini desteklediğine dair ve yüksek dozajda borik asit uygulamasının kanser hücre hatlarında otofajiyi indüklediğine dair literatürde çalışmalar mevcuttur (Eckhert ve ark., 2007; Meacham ve ark., 2007; Spears ve Armstrong, 2007; Al-Ali ve Gonzalez-Sarmiento, 2017).

Kütahya'da, Hisarcık bölgesinden toplanan topraklarda yapılan analizler sonucunda 450 mM düzeyinde B'a kadar dayanıklılık gösterebilen ve büyümeleri için B'a ihtiyaç duyan bakteri hatları izole edilmiştir (Ahmed ve ark., 2007).

B'un ayrıca diğer mineraller, vitamin D ve hormonlar ile etkileşime girerek kemik gelişimine katkı sağladığı ve kemik kompozisyonunu güçlendirdiğini gösterilmiştir (Nielsen ve Stoecker, 2009; Hakki ve ark., 2010; Hakki ve ark., 2013).

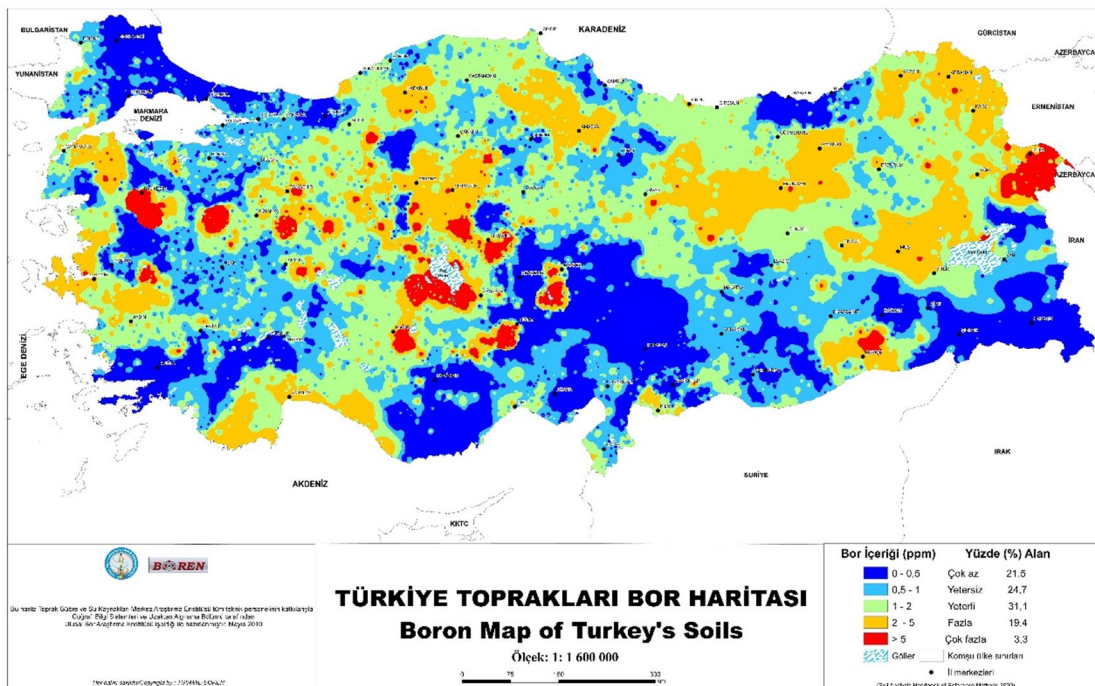
İnsan diyetinde günlük alımı 1 mg olarak tavsiye edilen B'un (Nielsen, 2014) insanlarda fertillliği etkilemediği ve ciddi bir sağlık problemine yol açmadığı B madenlerine yakın civarda ve içme sularında 29 ppm düzeyinde B olan bölgede yaşayan 3 nesil ailelerde yapılan anketler sonucunda tespit edilmiştir (Şaylı ve ark., 2003).

### 1.4. Türkiye'de Bor Rezervleri ve Türkiye Topraklarında Bor Durumu

Dünya B rezervlerinin %72,8'i Türkiye'de bulunmaktadır (Anonim, 2014). Bor rezervleri açısından Türkiye'yi Rusya (%7,6), ABD (%6,1), Çin (%3,6) ve Şili (%3,1) ile takip etmektedir. Türkiye'de B yatakları özellikle Kırka/Eskişehir, Bigadiç/Balıkesir, Kestelek/Bursa ve Emet/Kütahya'da bulunmaktadır (Anonim, 2014). Kurulu kapasitelerin bölgelere göre dağılımına bakıldığında Türkiye (%47,2), ABD (%26,2), Güney Amerika bölgesi (%13,4) ve Asya bölgesi (%13,2) paya sahiptirler. Boren Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü desteği ile hazırlanmış olan ve Türkiye topraklarının B durumunu ortaya koyan harita Şekil 1.4.1'de verilmiştir. Bu haritaya göre Türkiye topraklarının yalnızca %31,1'inde yeterli düzeyde, %46,2'sinde çok az ve yetersiz, %22,2'sinde fazla veya toksik düzeyde B içerdiği saptanmıştır.

Türkiye'deki tarım arazileri varlığı yaklaşık 26,3 milyon ha'dan oluşmaktadır. Türkiye'de tarım arazilerinin üretim deseninde en fazla yer kaplayan (yaklaşık %75)

tahılların üretiminde önemli bir merkez olan Orta Anadolu topraklarında B toksisitesi problemi arpa ve buğday verimini düşürmektedir. Konya, Afyon, Karaman, Aksaray, Niğde, Nevşehir ve Kayseri illerinin topraklarında B durumunu anlamak için Gezgin ve ark. (2002)'nin yapmış olduğu çalışma sonucunda bu bölgedeki toprakların %18'inin, özellikle tahıllar için kritik değer olan  $3 \text{ mg kg}^{-1}$ 'den fazla B içerdiği rapor edilmiştir. Tahıl ambarı olarak bilinen Orta Anadolu topraklarında verimin düşmesine neden olan B toksisitesi probleminin ciddiyeti göz önüne alındığında bu sorunun çözümü için atılacak her türlü adım büyük önem taşımaktadır.



Şekil 1.4.1 Türkiye Toprakları Bor Haritası (boren.gov.tr'den alınmıştır). Erişim tarihi: 01/02/2018

### 1.5. Bitkilerde Bor Alımı, Bor Stresi ve Fitoremediasyon

Bitkilerde B alımı, topraktaki B konsantrasyonu ve B'un bitkiler açısından elverişliliği ile yakından ilişkilidir. Topraklarda bulunan B'un elverişliliği özellikle pH, tuz içeriği, organik madde, kireç, toprak tekstürü ve değişebilir katyonlardan etkilenmektedir (Gezgin ve ark., 2002). Bu nedenle sulama suyu ve topraklardaki suyun içeriği bitkilerin alabileceği B'un yararlılığını doğrudan etkilemektedir. Kuru koşullarda ise köklere olan kütle akımı düştüğü için B alımı kısıtlanmaktadır. Toprağın pH'sı arttıkça, bitkilerin topraktan B alım düzeyi genelde düşmektedir (Gupta, 1993). Özellikle pH'nın 5'ten 9'a doğru çıkması sonucunda toprak solüsyonundaki B

konsantrasyonu düşerken toprak tarafından B'un adsorpsiyonu artmaktadır (Mengel ve ark., 2001).

Bitkiler, topraktaki B'u çoğunlukla ayrışmamış borik asit ( $B(OH)_3$ ) olarak alırlar. Ayrışmamış ve yüksüz durumda olan borik asit suda ve lipitte çözünebilir olduğu için bitki hücrelerinin mebranlarından geçebilme özelliğine sahiptirler (Mengel ve ark., 2001). Borik asitin toprak solüsyonunda ayrışmamış olması sonucunda bitkiler B'u kökleri aracılığı ile pasif taşınım ile alabilmektedir (Hu ve Brown, 1997). Borik asitin biyolojik membranlardan geçme özelliği diğer çözünebilir maddeler ile karşılaştırıldığında  $Na^+$  iyonlarına göre 10 kat, üreye göre ise 4 kat daha büyükken, suyun ise borik aside göre 50 bin kat daha büyüktür (Reid, 2014).

Bitkilerin besin elementleri alımında noksan, yeterli veya toksik düzeylerden bahsederken kesin rakamlar yerine aralıklar belirtilir. Yeterli miktarda besin element alımı verimle birlikte azami düzeyde kaliteli ürün elde etmek için önemlidir. Toksik/yeterli düzeyde B konsantrasyonu oranı diğer pek çok besin elementine göre çok daha düşüktür. Bu yüzden aynı bitkide tek bir sezonda hem toksik hem de noksanlık belirtileri görülebilir (Gupta, 1993). Ayrıca, bitkilerde B çoğunlukla pasif yolla taşındığı için yaşlı yapraklardan genç yapraklara B elementinin taşınımı kolayca gerçekleşmemektedir. B ihtiyacı aralığı ise bitkilerin organlarında farklılık gösterebilmektedir. B'un yetersiz alındığı durumlarda bitkilerin vejetatif gelişiminde herhangi bir sıkıntı görülmemekle birlikte, meyve ve tohum gelişimleri daha fazla sekteye uğrayabilmektedir (Mengel ve ark., 2001).

B'un alımı bitkiler arasında da önemli düzeyde farklılık göstermektedir. Sadece bitki türleri arasında değil ayrıca aynı tür içinde genotipler arasında da bu farklılıklar gözlenebilmektedir. B ihtiyacı durumuna göre bitkiler 3 gruba ayrılabilirler:

1. B'a en az ihtiyaç duyan (monokotil bitkilerden buğdaygiller familyası)
2. İlk gruba göre daha fazla B ihtiyacı duyan (buğdaygiller familyası dışında kalan monokotil ve dikotil bitkiler)
3. B'a en fazla ihtiyaç duyan latex üreten bitkiler (Mengel ve ark., 2001).

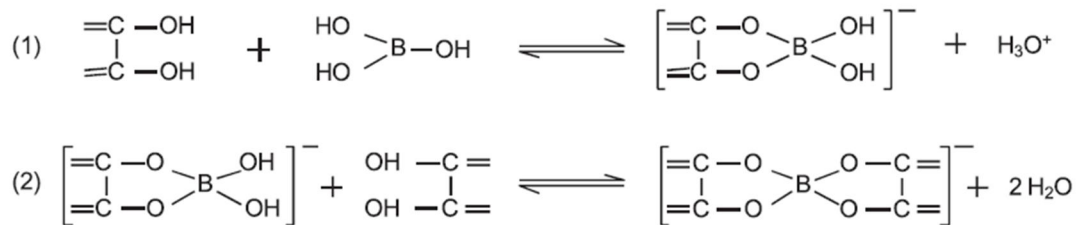
Bitkilerde B'un taşınması türler arasında değişkenlik göstermektedir. Bu açıdan bazı bitkilerde B taşınması daha kısıtlyken diğer bazı bitkilerde ise B'un daha mobil (hareketli) olduğu söylenebilir (Gupta, 1993). Bitkilerde besin elementlerinin taşınması ksilem ve floem aracılığı ile iletim demetlerinde gerçekleşmektedir. İletim demetlerinde taşınmayı sağlayan anahtar molekül ise sudur. Bitkilerin çoğunda transpirasyon oranının yönlendirmesi ile B'un yapraklara taşınması gerçekleşmektedir. Bu tür bitkilerde

yapraktaki B'un dağılımı da homojen değildir, özellikle yaprak uçlarında B birikimi gerçekleşmektedir. Aynı nedenden dolayı yaşlı yapraklarda B birikimi genç yapraklara göre daha fazla gerçekleşmektedir (Mengel ve ark., 2001). B'un kökten gövdeye yukarı doğru taşınması su akımının yardımıyla ksilem cansız hücrelerinde gerçekleşmektedir. Gün içinde bitki yapraklarında gerçekleşen su kaybı ile bir akım gücü oluşmaktadır. Öncelikle ksilem translokasyonu, bitkide transpirasyonun en yoğun olduğu bölgeye, çoğunlukla yapraklara doğru olmaktadır. Floem translokasyonu ise transpirasyondan bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Floem akım yönü ise büyüme bölgeleri, genç yapraklar ve kolayca su kaybetmeyen meyve ve tohuma doğru gerçekleşmektedir (Brown ve Shelp, 1997). B elementinin aslında immobil bir element olduğu düşünülmekteydi. *Cucurbita sp.* (kabak) ve *Lycopersicon esculentum* (domates) genç yapraklarında aniden B takviyesi kesildiğinde B noksanlık belirtileri göstermeye başlayınca, bu durum B'un immobil bir element olduğuna dair bir temel oluşturmuştur. Elma gibi fotosentez ürünü şeker alkolü olan bitkilerde ise B'un taşınmasında aktif rol oynayan transpirasyon akımı değildir. Yaprakta şeker alkolü miktarının artması ile B-polyol kompleksleri oluşmakta ve bunun neticesinde B'un bitkide kolayca hareket edebildiği gösterilmiştir. Elma yapraklarında ise örneğin aynı şartlarda yetişmiş bir cevizde göre daha homojen bir B dağılımı göstermektedir. Kereviz, havuç, fasulye karnabahar mannitol üreten; elma, erik, armut ve kayısı ağaçları ise fotosentez sonucunda sorbitol üreten bitkilerdir (Brown ve Shelp, 1997; Mengel ve ark., 2001). Bor, sorbitol ve mannitol şeker alkollerini ile B-polyol kompleksleri oluşturabilmekte ve böylece şeker alkollerince zengin olan bitkilerde B kolayca taşınmaktadır (Brown ve Shelp, 1997).

Bor elementinin ne bir enzimin bileşenini oluşturduğuna ne de enzimlerin aktivitelerini doğrudan etkilediğine dair bir kanıt bulunmaktadır. B'un bitkilerdeki fonksiyonu henüz tam anlaşılmamakla birlikte B'un varsayılan bazı rollerini Parr ve Loughman (1983) şu şekilde sıralamıştır: Şeker taşınımı, hücre duvarı sentezi, lignifikasyon, hücre duvarı yapısı sağlamlığının korunması, karbonhidrat metabolizması, RNA metabolizması, indol asetik asit (IAA) metabolizması, fenol metabolizması ve membran yapısının stabilitesi (Broadley ve ark., 2012).

Borik asit, diol ve polyoller ile tepkimeye girip monoester veya diester gibi kompleks bileşikler oluşturma yeteneği ile öne çıkmaktadır (Şekil 1.5.1). Özellikle şeker alkollerini ve üronik asit gibi cis-diol yapılanmasına sahip olan bileşikler ile borik asit kompleksleri oluşturabilmektedir (Broadley ve ark., 2012; Pappin ve ark., 2012).

Bununla birlikte cis-diol yapılanmasına sahip olmayan glikoz, früktoz, galaktoz veya türevleri kararlı borat bileşikleri oluşturamazlar. En kararlı borat diester bileşikler ise bitkilerde hücre duvarı yapısına da katılan apioz ve pentoz ribiz ile oluşmaktadır (Loomis ve Durst, 1992; Broadley ve ark., 2012).



Şekil 1.5.1. Borik asit, dioller ve polyoller ile monoester(1) veya diester(2) oluşturabilmektedir

Gelişmiş bitki gruplarında, bünyelerinde barındırdıkları B'un önemli oranda bir kısmı hücre duvarı pektinleriyle ilişkili olarak hücre duvarlarında cis-diol ester bileşikleri halinde bulunmaktadır. Bu durum bitkilerin B ihtiyacı miktarı ile bitki yapısı arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Örneğin dikotil bitkiler, monokotil olan buğdaygiller ile karşılaştırıldığında dikotillerin hücre duvarlarında cis-diol yapılanmayla ilişkili maddelerin oranı, pektin bileşikler poligalakturonanların daha fazla olmasından dolayı, dikotil bitkiler B'a daha fazla ihtiyaç duymaktadır (Loomis ve Durst, 1992; Broadley ve ark., 2012). Kobayashi ve ark. (1996) bitkilerde bulunan toplam B'un monomerik Ramnogalakturonan II (RGII) pektinlerinin dimerik B-RGII bileşiklerinin oluşmasında rol oynadığını göstermiştir. Aynı zamanda gelişmiş bitkilerin hücre duvarında bu yapının sağlamlığının devamı için  $Ca^{+2}$  (kalsiyum) iyonlarına da ihtiyaç olduğunu Kobayashi ve ark. (1999) rapor etmişlerdir.

Tuz stresinin de görüldüğü, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde kendini gösteren B toksisitesinin ana sebepleri, sulama sularında B içeriğinin fazla olması ve drenaj sıkıntısı olarak sıralanabilir. Bitkilerde B toksisite belirtileri hemen hemen birbirine benzemektedirler. Gövde büyümesinde düşüş ve devamında yaprakların kenarlarında veya uçlarında başlayan kloroz, toksisitenin ilerleyen zamanlarında nekroza dönüşmektedir. Bununla birlikte B, çoğu bitki yapraklarında homojen bir dağılım göstermemektedir. Bu yüzden toksisite belirtileri, monokotil bitkilerde ilk önce yaprak uçlarında, dikotil bitkilerde ise yaprak kenarlarında kendini göstermeye başlamaktadır. (Gupta, 1993).

Dünyada 80'den fazla ülkede yaygınlık gösteren B noksanlığı özellikle yoğun yağış alan bölgelerde B'un  $B(OH)_3$  olarak yıkanması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kireçli ve yüksek kil içeren topraklarda pH artışı,  $B(OH)_4^-$  'ün oluşması, anyon adsorpsiyonunun artması noksanlığa neden olan ana sebepler olarak sıralanmaktadır. Yoğun şekilde yağış alan bölgelerde veya düşük seviyede B içeren sulama sularında noksanlık problemi ile karşılaşmaktadır. Noksanlık belirtileri ilk olarak en tepede bulunan genç yaprakta kendini göstermeye başlar. Noksanlık neticesinde özellikle hücre duvarındaki anormalliklerden kaynaklı olarak bitkiler bazı fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik problemler ile karşılaşmaktadırlar: Meyvelerin olgunlaşmaması, çiçeklerin gelişmemesi, yaprakların genişlemesinde azalma, terminal uçlarda nekroz ve apikal büyümenin engellenmesi olarak sıralanabilir (Gupta, 1993; Broadley ve ark., 2012).

B noksanlığı altındaki bitkilerde genellikle fenolik bileşiklerin birikimi görülmektedir. Fenolik bileşiklerin B noksanlığı altında artması durumunda özellikle fotosentez metabolizması etkilenmektedir. B noksanlığı özellikle generatif evrede yan etkilere sahiptir. Bitki absorpladığı ışık enerjisinden daha az yararlanmaktadır. Çünkü fenolik bileşiklerin oksidasyonu uyarılmış olmakta ve bitkilerin antioksidatif savunma mekanizması da bozulmaktadır. Böylece bitkilerin yüksek ışık yoğunluğuna duyarlılığı ve bitkilerde ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumu artmaktadır (Broadley ve ark., 2012). Bu durum, tarla ölçeğinde ciddi verim kayıpları ile sonuçlanmaktadır.

Bitkilerin ihtiyaç duydukları B miktarları farklı olduğu için tüm bitkileri kapsayacak şekilde kritik asgari ve azami değerleri saptamak zordur. Dikotil ayçiçeği ve monokotil buğday bitkisinin minimum B ihtiyaçlarını inceleyen Asad ve ark. (2001), buğdayın %70 oranında büyümeye ulaşabildiği B konsantrasyonunda, ayçiçeğinin ise hâlâ yaşıyor olmakla birlikte, yaprak gelişimi bile gösteremediğini rapor etmiştir. Reid ve Fitzpatrick (2009) genotipler arasında B ihtiyaç farklılığını gösterdikleri çalışmada, B toksisitesine duyarlı arpa ve buğday çeşitlerinin nekroz belirtilerinin ortaya çıktığı B konsantrasyonu iki katından daha fazla olduğunda, B toksisitesine tolerant arpa ve buğday bitki çeşitlerinin nekroz belirtilerini göstermeye başladığını belirtmişlerdir.

Alpaslan ve Gunes (2001) tuzlu ve B toksik koşullar altında tuz stresine tolerant domates ve tuz stresine duyarlı hıyar bitkisinde yaptıkları karşılaştırma sonucunda tuzlu koşullar altında, B toksisitesine maruz kalan hıyar bitkisi B toksisitesinden dolayı daha fazla yaprak zararına uğradığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada B ve tuz stresine birlikte maruz kalan bitkilerde membran geçirgenliği artışının tuz stresine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



Toprakta bulunan ağır metal, tuz gibi kontaminantlardan uzaklaştırma işlemini bitkiler aracılığıyla yapan biyoremediasyon yöntemine fitoremediasyon denilmektedir. Literatürde bor kontaminasyonunun görüldüğü toprakların toksik B'dan temizlenmesi için önerilen bitkilerden biri de kavak ağacıdır. Robinson ve ark. (2007) 30 mg/kg B olan topraklarda yetişen kavak ağaçlarının yapraklarında 845 mg/kg'a kadar, köklerinin ise 21 mg/kg'a kadar B biriktirebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapraklarında B'ü yüksek düzeyde tutmalarından dolayı, bu bitkilerin yapraklarının B noksanlığı çeken meyve bahçesi gibi yerlerde organik B kaynağı olarak değerlendirilmesi tavsiye edilmiştir (Robinson ve ark., 2003).

B madeni civarındaki topraklarda, kültür bitkilerine zarar verecek düzeyde yüksek B bulunmaktadır. Keza Türkiye'de, Eskişehir ilinin Kırka ilçesindeki bor madenleri alanında topraktaki elverişli B, kültür bitkileri için aşırı toksik olan 277 mg/kg'dır. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat. var. *sphaerocephala*, *Gypsophila perfoliata* L., *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. subsp. *distans*, bu kadar yüksek konsantrasyonda yetişebilen ve bölge toprağına adaptasyon göstermiş olan sınırlı sayıda bitkilerdendir (Babaoğlu ve ark., 2004).

### 1.6. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.

Hiperakümülatör özelliklere sahip olan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. subsp. *distans* buğdaygiller familyasından olup dünyanın pek çok yerinde yetişebilen, yol kenarlarında da rastlanabilen çok yıllık bir bitkidir. *Puccinellia* sp. bitkileri ince saplı, bol çim veren, iyi yeşil ot ve tohum veren bir bitki grubu olarak tanımlanmıştır (Elçi ve Bostancıoğlu, 1981). Bitkinin ismi ise İtalyan botanikçi Benedetto Puccinelli'den gelmektedir (Anonymous). *P. distans* "European alkali grass", "weeping alkali grass" ve "çorak çim bitkisi" olarak bilinmektedir (Keskin, 2010). *Puccinellia* sp. bitkilerinin tuza tolerant bir bitki olduğu uzun zamandır bilinmektedir. 1951 yılında Türkiye'den Avustralya'ya götürülen *Puccinellia* sp. 'nin Avustralya'nın tuzlu ve alkali topraklarına çok iyi uyum gösterdiği ve bitkinin bol yapraklı sürgünler oluşturduğu belirtilmiştir (MacPhie, 1973; Elçi ve Bostancıoğlu, 1981). Amerika Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (USDA)'nın bitki veri tabanından alınan *P. distans* bitkisine ait çizimler ve Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü serasında yetiştirilmiş olan *P. distans*'a ait fotoğraflar EK-1'de verilmiştir.

*P. distans* bitkisinin ayrıca tuzluluk ve B toksisitesi problemlerinin de yaşandığı toprakların tuz ve B'dan temizlenmesi yani fitoremediasyon için uygun bir bitki olabileceği değerlendirilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2004; Stiles ve ark., 2011). *P. distans* bitkisi, normal kültür bitkilerinin dayanamayacağı 20 dS m<sup>-1</sup> EC değerinde bile etkilenmeden gelişimini sürdürebilmektedir (Parker ve ark., 1991). Tarasoff ve ark. (2007) tuza tolerant C3 bitkileri *P. distans* ve *P. nutalliana*'nın sodik ve normal topraklarda bitki kök ve biyokütlesi, toplam biyokütle ve sürgün boyu parametrelerini ölçerek bir karşılaştırma gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bu karşılaştırma sonucunda bitkilerin olgun aşamasında *P. distans*'ın normal topraklarda daha fazla gelişim gösterirken, *P. nutalliana*'nın ise her iki toprak koşulunda da benzer gelişim gösterdiği saptanmıştır. Harivandi ve ark. (1982) *Puccinellia* alt türlerinden olan *P. distans* ve *P. lemmoni* 'yi farklı konsantrasyonlarda deniz suyunda çimlenmeye olan tepkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada deniz suyu konsantrasyonunun %50'nin üzerine çıktığı ortamda çorak çimi bitkisinde çimlenme oranı petri kabında %90 kumda ise %73 iken, *P. lemmoni* bitkisinde ise sırası ile %41 ve %63 oranlarına düşmüştür. *P. distans*, yüksek oranda tuza *P. lemmoni* 'ye göre daha iyi bir tolerans göstermiştir.

Türkiye topraklarında yetiştiği tespit edilen 10 adet *Puccinellia* türü bulunmaktadır: *P. bulbosa*, *P. ciliata*, *P. convoluta*, *P. distans*, *P. dolicholepis*, *P. dolicholepis*, *P. festuciformis*, *P. gigantea*, *P. grossheimiana*, *P. intermedia* ve *P. koeieana* (Davis, 1965; ANG Vakfı, 2012).

Bar ve ark. (2015) ABD, Rusya, İran, Afganistan, Kazakistan ve Türkiye kökenli *P. distans* genotipleri ile Türkiye kökenli *P. distans* ssp. *borealis* genotiplerini SRAP markörleri ile genetik düzeyde karşılaştırmışlardır. Toplam 20 tane genotip ile gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda lokasyon düzeyinde birbirlerine uzak olan bazı genotiplerin çizilen dendrogramda birbirlerine yakın kollardan bağlanmıştır. *P. distans* bitkilerinin toplandığı lokasyonlar sırası ile Türkiye, İran, Afganistan, ABD, Rusya, Kazakistan ve eski Sırbistan-Karadağ'dır. ABD lokasyonlu bitkiler, farklı kollarda hem İran hem de Rusya'dan toplanan bitkiler ile genetik benzerlik göstermektedirler. Ayrıca İran orijinli olan bitkiler dendrogramda kendi aralarında toplanmışlardır. Dünyada pek çok yerde yaygınlık gösteren *P. distans* bitkisinde bölgelerden toplanmış 20 genotiple gerçekleştirilen bu çalışmaya göre genetik düzeyde bir varyasyon göstermemiştir. Öztürk ve ark. (2018) 0 ve 500 mg L<sup>-1</sup> B'a maruz bırakılan *P. distans* bitki gövdesi örnekleri ile gerçekleştirmiş oldukları RNA-Seq analizi sonucunda malat yolağı ve hücre duvarı bileşikleriyle ilişkili genlerde transkriptomik değişikliklerin B toleransıya

bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Toplam B'un 8900 mg/kg, elverişli B'un 277 mg/kg olduğu Kırka maden ocağı civarındaki topraklarda tespit edilmiş olan *P. distans* bitkisinin sırası ile kök, gövde, yaprak ve tohumlarının kuru ağırlıklarına göre içerdikleri B miktarı 241, 117, 802 ve 501 mg/kg olarak belirlenmiştir (Babaoğlu ve ark., 2004). Farklı B dozları altında yetiştirilmiş olan *P. distans* bitkisinin kök ve gövde örneklerinde gerçekleştirilen kapsamlı fizyoloji çalışmaları sonucunda *P. distans* bitkisinin dokularından B'u atma şeklinde B toksisitesine tolerans kazanmış olabileceği belirtilmiştir (Hamurcu ve ark., 2016).

Sadece B toksisitesine tolerant bitkilerin geliştirilmesi, bu bitkilerin yüksek konsantrasyonda B içeren topraklarda başarılı olacağı garantisini vermemektedir. Çünkü yüksek düzeyde B içeren topraklarda yetişen bitkiler B probleminin yanında çoğunlukla tuzluluk veya düşük nem problemiyle de karşı karşıya kalmakta ve bu problemler de ayrıca bitkilerin büyümesi ve gelişimine engel olmaktadır (Reid, 2013). Bu bağlamda *P. distans* buğdaygiller familyası içinde uygun bir model organizma olarak karşımıza çıkmaktadır.

### 1.7. Farklı Düzeylerde Anlatım Yapan Genlerin Belirlenmesi

*P. distans* bitkisinin farklı düzeylerde B uygulamaları altında kök ve yaprak organlarında farklı düzeylerde anlatım yapan gen fragmentlerinin tespit edebilmek amacıyla tez çalışmasından önce Genefishing™ DEG Premix Kit'in (Seegene, Korea) sunduğu farklı primer kombinasyonları kullanılarak DNA fragmentlerinin çoğaltımı sağlanmıştır. Aynı kiti çalışmalarında kullanmış olan Ding ve ark. (2012) *Ralstonia solanacearum* enfeksiyonuna direnç gösteren ve göstermeyen iki yer fıstığı çeşidinde bu hastalığa direnç mekanizmasıyla ilişkili gen fragmentlerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada 25 adet DEG (Differentially Expressed Genes) fragmenti izole edip bu DEG fragmentlerinden 2 tanesinin validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu iki DEG fragmentinin tam uzunluktaki cDNA dizileri elde edildikten sonra sekans analizini gerçekleştirmişlerdir. DEG fragmentlerinin BLAST(n) analizinde en fazla benzerlik gösteren DNA fragmentlerinin farklı organizmalardaki homolog genlerin dizileri ile tam uzunluktaki cDNA dizileri arasında yüksek oranda benzerlik elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Park ve ark. (2006) iğnesiz mutant ve iğneli havuç tohumlarında iğne oluşumuyla ilişkili genleri tespit edebilmek amacıyla Genefishing™ kitinde ACP

primerlerini kullandıkları çalışmada 11 adet farklı düzeylerde anlatım yapan cDNA tespit etmişlerdir. Klonlama ve sekanslama çalışmalarının ardından 7 DEG fragmentinin RT PCR ile validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Genefishing™ ACP primerleri ile elde edilen ilk jel görüntüsü ile RT-PCR çalışması sonucunda elde edilen jel görüntülerinin de birbirleriyle tutarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, Genefishing™ kiti kullanılarak elde edilen sonuçların validasyonu amaçlanmıştır. Literatürde hem abiyotik hem de biyotik stresle ilişkili farklı düzeylerde anlatım yapan gen fragmentlerinin tespit etmek amacıyla bu kitin bitkilerde kullanıldığı çalışmalardan bazıları ise şöyledir; Yu ve ark. (2015) yerfıstığı bitkisinde protein içeriklerine yüksek ve normal protein içeren tohumlarından izole edilen 40 DEG gen fragmentinden 3 tanesinde validasyon gerçekleştirmişlerdir. Arpada, sırasıyla tuz ve kuraklık stresiyle ilişkili genlerin tespitinde Lee ve ark. (2009) izole ettikleri 11 adet anlatım düzeyi artan (upregulation) DEG fragmentinden 7 tanesininin validasyonunda ve Lee ve ark. (2011) gen anlatım düzeyi artan ve azalan 15 DEG fragmentinin validasyonunda Northern Blot analizini gerçekleştirmişlerdir. Her iki çalışmada sonuçların birbirleri ile tutarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Lee ve ark. (2017) yoncada soğuk ve sıcak stresinin cevabında, Song ve ark. (2015) buğdayda *Blumeria graminis* patojenine cevabında ve (Lee ve ark., 2015) ise Sibirya'ya özgü yabani arpa bitkilerinde sıcak stresininin cevabında çalışan farklı düzeylerde anlatım yapan gen fragmentlerinin tespitinde yukarıda belirtilen makalelerdeki yaklaşımı kullanıp bu DEG fragmentlerinin validasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

### 1.8. Bor Stresinde Bitkilerde Çalışan Taşıyıcı Proteinler

Bitkilerin topraktaki B'dan faydalanabilmeleri için kökleri aracılığı ile topraktan B'u almaları gerekir. Bunun için ilk yol, eğer ortamda yeterli düzeyde elverişli B var ise pasif taşıma ile B'un hücrelerdeki lipid tabakadan geçmesidir. Eğer ortamdaki elverişli B yeterli değilse bitki iki yolu tercih edecektir. Aktif taşıma ile hücrelerde bulunan kanallar ve/veya bor taşıyıcı proteinler devreye girecektir (Miwa ve Fujiwara, 2010a).

Bu yüzyılın başında bitkilerin B stresine taşıyıcı proteinler aracılığıyla oluşturduğu tolerans mekanizması ilk defa *Arabidopsis thaliana*'da moleküler düzeyde anlaşılmaya başlanmıştır (Takano ve ark., 2002). *A. thaliana*'da belirlenen BOR1, canlı organizmalarda tespit edilmiş olan ilk bor taşıyıcı proteindir (Takano ve ark., 2002).

Bitkilerde B stresine karşı tolerans mekanizmasında çalışan taşıyıcı proteinler B noksanlığı ve toksisitesinde çalışanlar olmak üzere iki grupta toplanır. Bor noksanlığı durumunda ayrıca NIP5:1 ve NIP6:1 adı verilen kanal proteinleri (aquoporin) de taşıyıcı proteinlere destekte bulunmaktadır. *A. thaliana*'da tespit edilmiş olan NIP5:1 kökten borik asitin alınmasından sorumlu kanal proteinini kodlayan bir gen dir ve NIP6:1 ise NIP5:1 genine çok benzemekle birlikte B'un genç yapraklarda taşımada görev alan kanal proteinini kodlamaktadır (Miwa ve ark., 2010).

On bin yıl önce başlayan tarımla birlikte ilk çiftçilerin yapmış oldukları seleksiyon ve tohumların buldukları bölgelerden başka topraklara taşınması ile B taşıyıcı genler gibi pek çok gende allelik varyasyonlar ortaya çıkmıştır. Bor taşıyıcılarının gen dizilimlerinin birbirine yüksek düzeyde benzemesi aynı familyadan olan bitkilerde yeni B taşıyıcıların da tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Reid, 2007). *A. thaliana* bitkisinde B noksan koşullarda bitkide tolerans artışında devreye giren *BOR1* ve *BOR2* birbirinin paralogu olan genlerdir ve dizi benzerlikleri %90 oranındadır. Miwa ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *A. thaliana* bitkisinde *BOR1* ve *BOR2* genlerinin her ikisinin de B noksan koşullarda çalışıyor olmasıyla birlikte *BOR2*'nin, *BOR1*'den farklı olarak kök gelişimine ve RGII'de çapraz bağlanmasında daha fazla etkili olduğunu ortaya çıkartmışlardır.

Chatterjee ve ark. (2017) mısır bitkisinde *ROTTEN EAR(RTE)* adı verilen gen ailesinde yer alan *RTE* ve *RTE2* adlı bor efflux taşıyıcıların bitki kök ve gövde gelişimi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bu iki geni taşımayan mutant mısır bitkilerin B noksan koşullarda daha küçük yapraklar oluşturup generatif organları oluşturamadığını ve her iki genin etkileşiminin ise kök gelişimini etkilediğini rapor etmişlerdir.

Bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde fazla B'u dokulardan atabilmek için B'u dışarı atan kanal proteinleri ve taşıyıcı proteinleri çalışmaktadır (Reid, 2007; Schnurbusch ve ark., 2010; Pallotta ve ark., 2014). *BOR1*'in homologları tarafından kodlanan B'u dışarı atan taşıyıcılar, B toleransını yalnızca B alımını düşürerek değil ayrıca toksik B'un dağıtımını sağlayarak bitkilerin tolerans kazanmasına destek olmaktadır (Miwa ve Fujiwara, 2010b).

B toksisitesi altında bitkiye tolerans kazandıran buğday bitkisindeki *TaBOR2* ile çeltik bitkisinde bulunan *OsBOR2*'nin dizilimleri %85 oranında birbirine benzemektedir ve *HvBOR2* (*Hordeum vulgare*) ile *TaBOR2* ise filogenetik olarak birbirlerine daha yakındır (Reid, 2007). B toksisitesine tolerans sağlayan *Bot-B5b* alleli ekmeklik buğdaydaki D genomunun atası olan *Aegilops tauschii*'de tespit edilmiştir. Ekmeklik

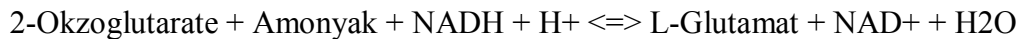
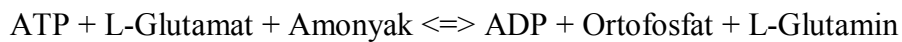
buğdayda tolerans sağlayan *Bot-B5b* ve *Bot(Tp4A)-B5c* allel kaynaklarının ilk çıktığı bölgelerden birinin ise Bereketli Hilal bölgesi olduğu saptanmıştır (Pallotta ve ark., 2014).

B taşıyıcı proteinlerle alakalı diğer önemli bir ayrıntı ise bitkilerin ortamdaki elverişli B miktarına göre transkripsiyon düzeyinde ve transkripsiyon sonrası düzeyde düzenlemeler gerçekleştirebilmeleridir. Yani B'un yetersiz olduğu bir ortamda protein düzeyinde artışı gerçekleşen BOR1'in miktarı ortamdaki elverişli B miktarının artışı ile azalmakta, BOR1 proteinlerinin yıkımı başlamaktadır. Böylece bitkiler B homeostasisini düzenleyebilmektedirler (Miwa ve Fujiwara, 2010b).

### 1.9. Glutamin Sentetaz ve Prolin İlişkisi

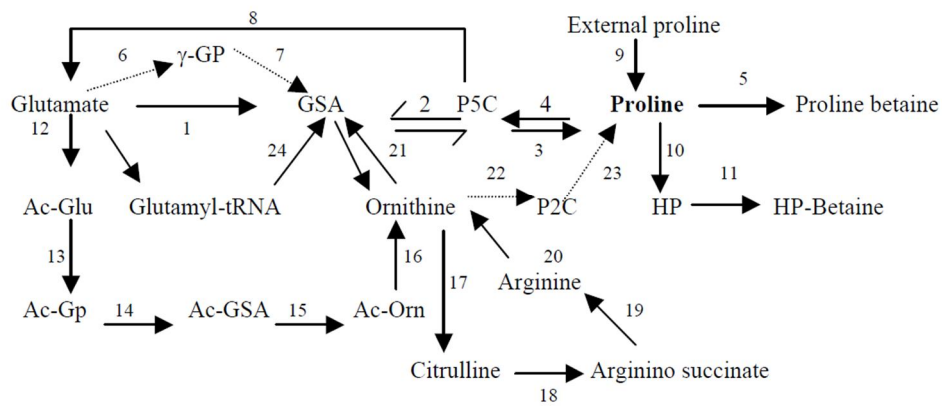
Azot metabolizmasında kilit rolü olan Glutamin sentetaz (GS), bitkilerden ilk olarak 1956 yılında saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Miflin ve Habash, 2002). Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda çalışan GS'yi kodlayan gen, evrimsel düzeyde oldukça iyi derecede korunmuş olan fonksiyonel genlerden biridir. GS'nin tüm canlı yaşam formlarında azot metabolizmasında kilit enzim olarak bulunması bu durumu desteklemektedir (Kumada ve ark., 1993). Amonyuma ( $\text{NH}_4^+$ ) affinitesi oldukça yüksek olan GS enzimi, amonyum özümlemesinde kilit enzim olup, glutaminin sentezinden sorumlu olan enzimdir (Zhang ve ark., 2017).

Azot (N), bitkiler için gerekli olan ve gelişmiş bitkilerde verimi önemli ölçüde artıran makro besin elementlerinden biridir. Bitkiler bünyelerinde bulunan azotun düştüğünü algılayabilmekte ve buna göre azot alımını düzenleyebilmektedirler (Miflin ve Habash, 2002). Azot asimilasyonu metabolizmasında yer alan başlıca enzimler ise glutamin sentetaz enzimi (GS; EC 6.3.1.2), glutamat sentaz (GOGAT=glutamin okzoglutarat aminotransferaz; EC 1.4.1.13, EC 1.4.1.14 ) ve glutamat dehidrogenazdır (GDH; EC 1.4.1.3). Aşağıda sırasıyla GS, GOGAT ve GDH enzimlerinin yer aldığı kimyasal tepkimeler verilmiştir.



Bitkilerde azotun yönetimi ise alım ve kullanım şeklinde iki yolla gerçekleşmektedir. Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), bitkilerde oldukça toksik bir bileşik olduğu için Nitrit redüktaz tarafından nitrit molekülleri amonyuma ( $\text{NH}_4^+$ ) yıkılarak dönüştürülmektedir. GDH enziminin amonyuma ( $\text{NH}_4^+$ ) olan afinitesi, GS enzimine göre çok daha düşüktür (Mifflin ve Habash, 2002; Zhang ve ark., 2017). GDH enzimi C/N oranını ayarlayabilmek için glutamati katalizleyip reaksiyon sonucunda amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ) üretmektedir. Gelişmiş bitkilerin çoğunda GS/GOGAT döngüsü amonyum özümlemesinde çalışan ana döngüdür (Zhang ve ark., 2017).

Prolin strese maruz kalmış bitkilerin strese karşı cevap oluşturmasında ürettiği osmoprotektan proteinlerden biridir. Prolinin en iyi bilinen rolü, bitkilerin prolin üretiminin ardından ozmotik tolerans geliştirmesidir. Özellikle kuraklık ve tuz stresine karşı oluşturulan cevapta prolinin üretildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Transgenik bitkiler aracılığı ile gerçekleştirilen çalışmalarda prolin üretiminin artması ile özellikle tuz stresine toleransın arttığı ve bitki büyümesinin de geliştiği gösterilmiştir. Ozmotik toleransı sağlamak dışında prolin ayrıca hücre zarının ve hücresel yapının stabilizasyonuna destek olmakta ve reaktif oksijen türlerini tutarak hücresel fonksiyonları korumaktadır. Glutamattan sentez edilen prolin ayrıca arginin ve ornitinden de sentezlenmektedir (Kishor ve ark., 2005) Bitkilerde ve daha az gelişmiş organizmalarda prolinin biyosentez ve yıkımı Şekil 1.9.1’de verilmiştir.



**Şekil 1.9.1** Bitkilerde ve ilkel organizmalarda prolinin biyosentezi ve yıkımını gösteren ağ. Kishor ve ark. (2005)’dan alınmıştır. Kesik çizgili oklar ilkel organizmaları işaret ederken, düz çizgili oklar ise gelişmiş organizmalardan olan bitkileri işaret etmektedir

Mahboobi ve ark. (2002) B toksisitesine maruz bırakılmış olan tolerant ve hassas, buğday ve arpa genotiplerinin yaprak örneklerinde glutamat dehidrogenaz

(GDH) enziminin aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca B toksisitesi durumunda bitkilerin yapraklarında bu enziminin aktivitesindeki artışın tolerant bitkilerde hassas bitkilere göre daha fazla olduğunu aynı çalışmada sunmuşlardır. B toksisitesi altında, GDH enziminin aktivitesinin artmış olması, tolerans mekanizmasının bir parçası olabileceğine de işaret etmektedir (Mahboobi ve ark., 2002).

*A. thaliana*  $\delta$ -OAT, ornitin- $\delta$ -aminotransferaz genini taşıyan transgenik çeltik bitkisi tuz ve kuraklık streslerine karşı daha fazla tolerans gösterirken kontrol bitkisine kıyasla çimlenme etkinliğinde artış gerçekleştiğini Wu ve ark. (2003) rapor etmişlerdir.

Hameed ve ark. (2015) ise halofit *Limonium stocksii*'nin 600 mM NaCl tuz koşullarında, bitki zarar görmesine rağmen prolin miktarında önemli bir değişiklik görmediklerini belirtmişlerdir. Fakat Inan ve ark. (2004) halofit *Thellungiella halophila* bitkisinde yapmış oldukları kapsamlı çalışmada tuz konsantrasyonunun artması ile bitki yapraklarında prolin ve çözünebilir şekerlerin miktarında artış gerçekleştiğini göstermişlerdir. Literatürdeki diğer çalışmalarda tuz stresinin (NaCl) artması ile halofit bitkiler *T. halophila* ve *Suaeda aralocaspica*'da prolinin arttığı ve prolin artışına paralel olarak prolin metabolizmasında ana enzimlerden biri olan P5CS enzimini kodlayan genin ekspresyonunun da arttığı tespit edilmiştir (Kant ve ark., 2006; Cao ve ark., 2015).



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Hiperakümülatör bir bitki olan *Puccinellia distans* Selçuk Üniversitesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü'nde kontrollü su kültürü ortamında farklı düzeylerde B uygulamalarına tabi tutulmuştur. Hamurcu ve ark. (2016)'nın fizyoloji parametrelerine göre değerlendirilen farklı B uygulamalarında yetiştirilen *P. distans* bitkisinin vermiş olduğu sonuca göre moleküler düzeydeki bu çalışma için 0, 2,5, 250, 500 ve 1000 ppm B dozları ile çalışılmaya karar verilmiştir. Yine aynı çalışmanın sonuçlarına dayanarak 2,5 ppm B kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada bitkinin hem kök hem de yaprak doku örnekleri ile çalışılmıştır.

### 2.1. Bitkinin Yetiştirilmesi ve Bor Uygulamaları

Bitki tohumları Eskişehir Kırka Bor madenlerinde yetişmekte olan *P. distans* (Jacq) Parl'dan alınmıştır. Tohumlar çimlendikten sonra su kültürü ortamına aktarılmıştır. Hazırlanan Hoagland solüsyonuna B, borik asit formunda verilmiştir. B uygulamaları, bitkiler üç yapraklı aşamaya geçtiklerinde verilmiştir. Bitkiler, B toksisitesi belirtileri görülmeye başladığında B uygulaması yapıldıktan 30 gün sonra hasat edilmiştir. Kök ve yaprak örnekleri sıvı azotta şoklandıktan sonra ultra derin dondurucu -80 °C'a kaldırılmıştır. Bitkinin yetiştirilmesi ve B uygulamaları ile fizyolojik analizler tez çalışmasından önce gerçekleştirilmiştir (Hamurcu ve ark., 2016).

### 2.2. Bor Stresine Tepki Veren Genlerin Farklılık Anlatım Yolu ile Belirlenmesi

Farklı B dozları uygulanmış *P. distans* bitkisinin kök ve yaprak örneklerinde farklı düzeylerde anlatım yapan gen fragmentlerini tespit edebilmek amacı ile İstanbul Kültür Üniversitesi (İKÜ), Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı bünyesinde Gene Fishing<sup>TM</sup> DEG kiti kullanılmıştır. Kök ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA örnekleri, cDNA'ya çevrildikten sonra 20 adet ACP (Annealing Control Primers) primeri ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu PCR ürünleri %2'lik agaroz jelle yüklendikten sonra bantların parlaklığı veya var/yok esasına göre 51 adet DEG bandı seçilmiştir. Bu kit ile elde edilen gen fragmentlerinin (DEG bandları) sekans sonuçlarından BLAST(n) analizi gerçekleştirilip bu dizilerle en fazla homoloji gösteren gen fragmentleri tespit edilmiştir. Bu aşamaya kadar gerçekleştirilen DEG ile ilgili

işlemler İKÜ öğretim üyesi, Doc. Dr. Özge Çelik denetiminde gerçekleştirilmiştir. BLAST analiz sonucunda en fazla benzerlik gösteren gen fragmentlerinin hangi metabolizmada veya yolakta faaliyet gösterdiğini anlamak için KEGG ve Uniprot web portallarından faydalanılmıştır. Bu çalışmada farklı düzeylerde anlatım yapan 51 gen fragmentinden çoğu 300 bp civarındadır ve 40'ı upregülasyon, 11'i downregülasyon göstermiştir. DEG fragmentlerinin 2 tanesinde sekans okuması gerçekleştirilememiştir. BLAST(n) analizi sonucunda 9 DEG bandı herhangi bir DNA fragmenti ile benzerlik göstermemiş, 8 DEG bandı ise fonksiyonel bir özellik taşıyan herhangi bir DNA fragmenti ile benzerlik göstermemiştir. Bu fragmentlerden 4'ü contiglere hit verirken diğerleri BAC klonu, transpozon elementi ve cDNA klonlarına hit vermiştir. Fonksiyonel bir gen fragmenti ile benzerlik gösteren DEG fragmentleri en çok enerji metabolizması, sinyal iletimi, transkripsiyon faktörü ve abiyotik stres cevabıyla ilişkili olan gen fragmentlerinden oluşmaktadır. Bu çalışmada elde edilmiş olan DEG fragmentlerinin qRT-PCR ile validasyonu gerçekleştirilmiştir. BLAST(n) analizi sonuçlarına göre bu çalışmada validasyon için seçilen DEG fragmentleri Çizelge 2.2.1'de verilmiştir. qRT-PCR çalışmaları için primer tasarımı Primer3'te gerçekleştirilmiştir (Untergasser ve ark., 2012).

**Çizelge 2.2.1.** Farklı B konsantrasyonları uygulaması altında anlatım yapan gen fragmentlerinin validasyonu için seçilen fragmentler

DEG Band No	BLAST(n) Sonucu	Aksesyon Numarası	Toplam Skor	E-değeri	Benzerlik
PUD_23	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for NAC transcription factor (NAC026 gene) ↑	<a href="#">FR819767.1</a>	66.2	5E-09	%100
PUD_30	<i>Lycopersicon esculentum</i> partial mRNA for putative glutamine synthase (gts1 gene) ↑	<a href="#">AJ277561.1</a>	208	4E-38	%83
PUD_37	<i>Hordeum vulgare</i> PsaG mRNA ↑	<a href="#">X60158.1</a>	168	8E-39	%76

### 2.3 Bitki Yaprak ve Kök Örneklerinden RNA İzolasyonu

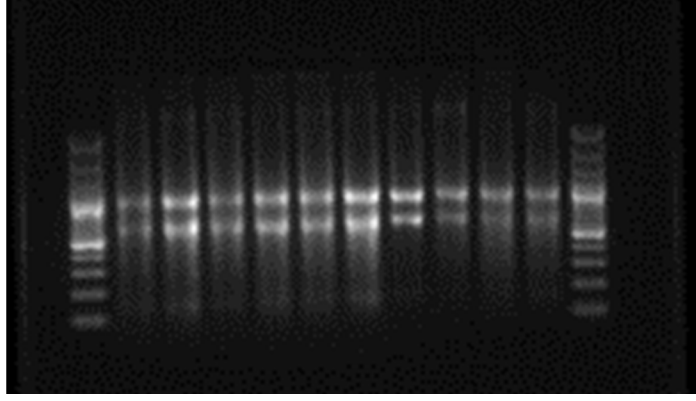
Bor uygulamaları gerçekleştirildikten otuz gün sonra kök ve yaprak örnekleri hasat edilmiş, sıvı azotta şoklanmış ve RNA izolasyonu için ultra derin dondurucuya

alınmıştır. RNA izolasyonu, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)'in vermiş olduğu protokole göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyon öncesinde ortam temizliği RNaseZap (Ambion) ile gerçekleştirilmiştir. Havan, topuz ve kaşıklar alüminyum folyo ile sarılıp 180 °C etüvde 3 saat bekletilerek sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Doku materyalinin liziz aşamasında kitin içinden iki farklı tampon çıkmaktadır. Bu çalışmada bitki materyali yoğun bir sekonder metabolit içermediği için Buffer RLT tercih edilmiştir.  $\beta$ -Merkaptoethanol-Buffer RLT karışımı izolasyon öncesinde taze olarak hazırlanması gerektiği için ihtiyaç duyulan miktara göre ayrı bir falkon tüpünde önceden karıştırılmıştır. Kit protokolünde liziz aşaması için hem sıvı azot ile havanda parçalama hem de paslanmaz 5 mm çapta çelik boncuklarla Tissue Lyser II (Qiagen) tavsiye edilmiştir. Bu çalışmada her iki yöntem de kullanılmıştır. DNase Digestion uygulaması için DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) RNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

#### **2.4 RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop ND 1000 spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Nükleik asitlerin saflığını ve konsantrasyonlarını belirlemek için 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki okuma değerlerine bakılır. 260 nm dalga boyunda nükleik asitler maksimum düzeyde absorpsiyon gösterirler, 280 nm dalga boyunda ise proteinlerin absorpsiyonu ölçülür. RNA'nın saflık değerleri için 260/280 değerlerine bakılır. Bu değer 2.0-2.2 arasında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 260/230 oranı ise saflık değerini ölçmek için kullanılan ikinci bir orandır.

RNA, DNA'ya göre parçalanması çok daha kolay olan bir moleküldür ve ortamda bulunan RNase enziminden dolayı kolayca degrades olabilir. Degraded olmuş bir RNA ise sonra gerçekleştirilecek deneylerde yanlış analizlerin yapılmasına yol açabilir. RNA örneklerinin degraded olup olmadığı yani intaktlığı ise %1,5'lük TBE agaroz jelde GelRed™ (Biotium) ile boyanarak kontrol edilmiştir. RNA örneklerinin intaktlığının agaroz jelde anlaşılması için 28S ve 18S rRNA'ların degraded olup olmadıkları kontrol edilir. EK-2 ve EK-3'te ise kök ve yaprak örneklerinin RNA konsantrasyonları ve saflık dereceleri verilmiştir. Kök örneklerinden alınan RNA'ların integritesini gösteren %1'lik agaroz jel görüntüsü ise Şekil 2.4.1'de verilmiştir.



Şekil 2.4.1. Kök örneklerinden izole edilen RNA'ların integritesini gösteren agaroz jel görüntüsü

## 2.5 cDNA çevrimi

cDNA sentezi total RNA'dan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (Thermo Scientific)'in vermiş olduğu protokole göre gerçekleştirilmiştir. Bu ticari kit, cDNA sentezi için RNase H aktivitesi AMV Revers'e göre daha düşük olan M-MuLV Revers Transkriptaz'ı kullanmaktadır.

Tüm RNA örneklerinden cDNA sentezi için 1 µg (1000 ng) ayrılmıştır. Steril PCR tüpünde cDNA sentezi için kalıp 1 µg RNA, 1 µl random heksamer primer ve saf su (nuclease free water) 12 µl'ye tamamlanıp karıştırılmıştır. Kısa bir mini spinin ardından örnekler 65°C'de 5 dk. boyunca inkübe edilip hemen ardından minispinin sonucu buza alınmıştır. 5X Reaction Buffer 4 µl/rxn, RiboLock RNase Inhibitor 20 Unit/rxn, 10 mM dNTP mix 2 µl/rxn ve en son RevertAid M-MuLV RT (200 Unit/µL)'den 1 µl/rxn karıştırılıp kalıp RNA'nın da içinde bulunduğu tüpteki karışımla toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmış olur.

Bu son hazırlanan karışım çok nazikçe karıştırılıp ve minispinin yapılmıştır. cDNA sentez reaksiyonunun devamında 25 °C'de 5 dk., 42 °C 60 dk. ve en son 5 dk. 70 °C'de cDNA sentez bileşenleri içeren tüpler inkübe edilmiştir. qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA örnekleri -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.

## 2.6 DEG Fragmentlerinin Validasyonunda Kullanılan Primerler

DEG fragmentlerinin validasyonu RT-PCR metoduna başvurulmuştur ve PCR amplifikasyonu için tasarlanmış olan primerlerin dizi bilgisi Çizelge 2.6.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.6.1. Validasyon için kullanılmış olan primerlerin dizi bilgisi

Primer İsmi	Primer Yönü	Dizi (5'-3')	Tm (°C)
Pudi_23	İleri	ATGGCAAAGCACTTCAAGCA	58.96
	Geri	TGGTTTTGGTCGCCTGAAAG	58.97
Pudi_30	İleri	TGAACGTCGTCTCACTGGAA	58.97
	Geri	TCCGCGATCATAGAGGTCAC	59.05
Pudi_37	İleri	TACTACATCCTCGCCACCAC	58.89
	Geri	TGCACCATCTCACATACATGA	57.09

## 2.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Diğer Primerler

Bu tez çalışmasında DEG fragmentlerinin validasyonu için kullanılan primerlere ek olarak hem Reid (2007)'nin hem de Uyğan (2014)'in çalışmalarında farklı düzeylerde B stresine maruz kalmış buğday ve arpa bitkilerinin kök ve yaprak örneklerinde gen ifade farklılıklarını ölçmek için kullanılan primer çiftleri de bu çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu primerlerin *P. distans* kök cDNA'larında çalışıp çalışmadığını anlamak için qRT-PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirip agaroz jelde görüntüleri alınmıştır. Prolin metabolizması yolağında yer alan enzimleri kodlayan genlerin de ifade miktarlarını ölçebilmek için *P. distans* bitkisi hakkında moleküler düzeyde yeterince veri bulunmadığından dolayı literatürde buğdaygiller familyasında çalıştığı bilinen ve korunmuş bölgeleri çoğaltabilen primer çiftleri de dâhil edilmiştir. Referans gen olarak ise literatürde *P. distans*'ta daha önce çalışılan bir referans gen bulunmadığından *P. tenuiflora*'da çalışmış olan *Beta actin* tercih edilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında kullanılmış olan DEG fragmentleri haricindeki primer çiftlerinin dizi bilgileri ve referansları EK-4'te verilmiştir.

## 2.8 Real time-PCR Reaksiyonları

cDNA ve primer konsantrasyonları normalize edilmiştir. Real time PCR reaksiyonları için LightCycler® Nano (Roche) cihazı ve Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kiti kullanılmıştır. Reaksiyonlar için takip edilen PCR protokolleri Çizelge 2.8.1 ve Çizelge 2.8.2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.8.1** PCR Çalışmasında Kullanılan Protokol

PCR Bileşenleri	Hacim (µl)	Son konsantrasyon
Forward Primer (10 pmol/ µl )	0.75	0.3
Revers Primer (10 pmol/ µl )	0.75	0.3
SYBR Green Master Miks (2X)	12.5	1X
cDNA (1/10 dilüsyon)	2	200 ng/ µl
ddH2O	9	
Toplam Hacim	25	

**Çizelge 2.8.2** PCR reaksiyon döngüsü

	Sıcaklık (°C)	Artış Oranı (°C/s)	Zaman (sn)
1 döngü	95	5	600
40 döngü	95	5	20
	55-60*	4	60
Erime	55	4	20
Sıcaklığı	95	0,1	20

\*: Primerlerin bağlanma sıcaklığına göre değişmektedir

## 2.9 Real time PCR Sonuçlarının Analizi

Real time PCR reaksiyonlarının gerçekleştirildiği LightCycler® Nano cihazı kullanıcıya verileri Cq (Quantification cycle) olarak vermektedir. Real time PCR deneyleri sonucunda ortaya çıkan veri mutlak ve nisbi nicel ölçüm olmak üzere iki şekilde sunulmaktadır. Bu tez çalışmasında ise nisbi nicel ölçümlere dayalı olarak istatistik analizleri gerçekleştirilmiştir. Nisbi gen ifadesinde (relative gene expression) ilgilenilen gen ile kontrol, referans veya housekeeping gen adı verilen genin ifade farklılığı ölçülmektedir. Veri analizi için oldukça yaygın olarak kullanılan karşılaştırılmalı Ct metodu ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu) tercih edilmiştir ve üretilen veri excelde grafiğe çevrilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Elde edilen veri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

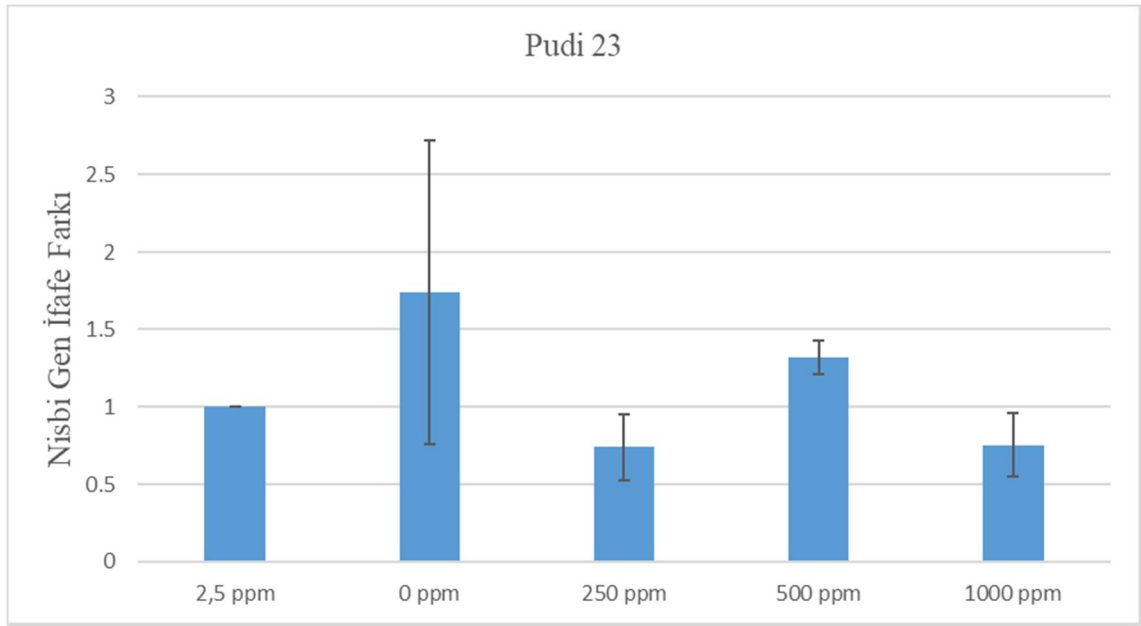
$$\Delta\Delta CT = (Ct.\text{hedef} - Ct.\text{ref})_{\text{koşul veya zaman}} - (Ct.\text{hedef} - Ct.\text{ref})_{\text{kontrol}}$$

$$\Downarrow$$

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

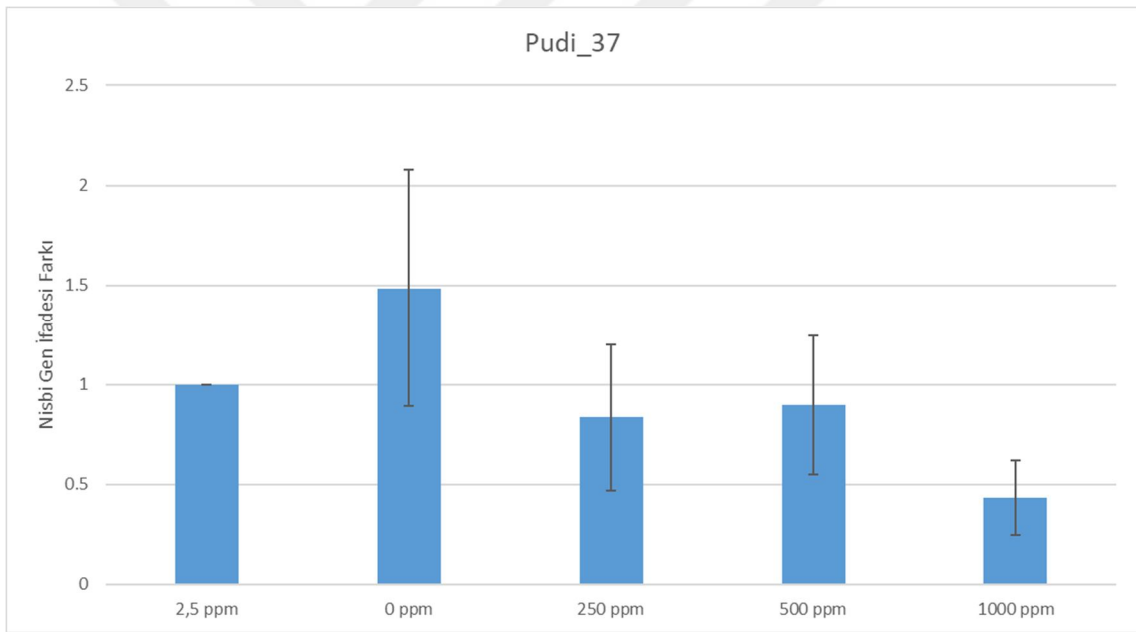
Validasyon için seçilen DEG fragmentleri Pudi\_23 ve Pudi\_30 için Real time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu fragmentlerin validasyonu için yaprak örneklerinden izole edilmiş RNA'lardan çevrilen cDNA örnekleri kullanılmıştır. Nisbi gen ifade farklılıkları Livak ve Schmittgen (2001)'nin vermiş olduğu formüle göre hesaplamalar gerçekleştirilip grafikler çizilmiştir (Şekil 3-1 ve Şekil 3-2). Pudi\_30 için tasarlanmış olan primer çiftleri çalışmadığı için PCR reaksiyonları gerçekleşmemiştir.



**Şekil 3.1.** Pudi\_23'ün yaprak örneklerinde gen ifade farklılığını gösteren grafik. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.

Pudi\_23 *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* mRNA for NAC transcription factor (NAC026 gene)'ün gen ifade artışı DEG deneylerinde gövdede 0 ppm'de gerçekleşmiştir. Validasyon sonucunda da 0 ppm'de gen ifadesinin artış yaptığı görülmüştür. NAC proteinlerinin birbirinden farklı rolleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları gövde meristeminin gelişimi, sekonder hücre duvarının sentezi ve yaprakların yaşlanmasında rol oynamaktır (Ochiai ve ark., 2011). Ayrıca NAC transkripsiyon faktörleri, bitki strese uğradığında devreye giren karmaşık bir sinyal sürecinin parçası olarak çalışmaktadır. Noksanlık durumunda NAC transkripsiyon faktörlerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Nuruzzaman ve ark., 2013). Ayrıca kuraklık, yüksek tuzluluk, B toksisitesi, soğuk stresi ve su stresi gibi stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde NAC transkripsiyon faktörünün miktarının değiştiği belirtilmiştir

(Nuruzzaman ve ark., 2013). Bazı NAC transkripsiyon faktörlerinin kuraklık ve tuzluluk stresi altında bitkilerde gen ifadelerini artırarak, bitkinin bu streslere karşı toleranslarını artırdığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2006). Bazı NAC transkripsiyon faktörlerinin baskılanması sonucu çeltik bitkisinde B toksisitesine toleransın arttığını Ochiai ve ark. (2011) rapor etmiştir. Kasajima ve Fujiwara (2007) ise *A. thaliana*'da B toksisitesine maruz kalan gövde örneklerinde NAC transkripsiyon faktörü olan At1g32870 geninin indüklendiğini belirtmişlerdir, fakat Ochiai ve ark. (2011)'nin çalışmasında belirtmiş olduğu NAC transkripsiyon faktörü filogenetik olarak farklı gruplarda sınıflandırılmıştır (Ochiai ve ark., 2011). NAC transkripsiyon faktörleri genel olarak toleransı artırdığı vurgulanmakla birlikte, hangi bitki gruplarında ve hangi stres şartları altında toleransı artırdığını anlamak için ayrıca çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğu aşikardır.

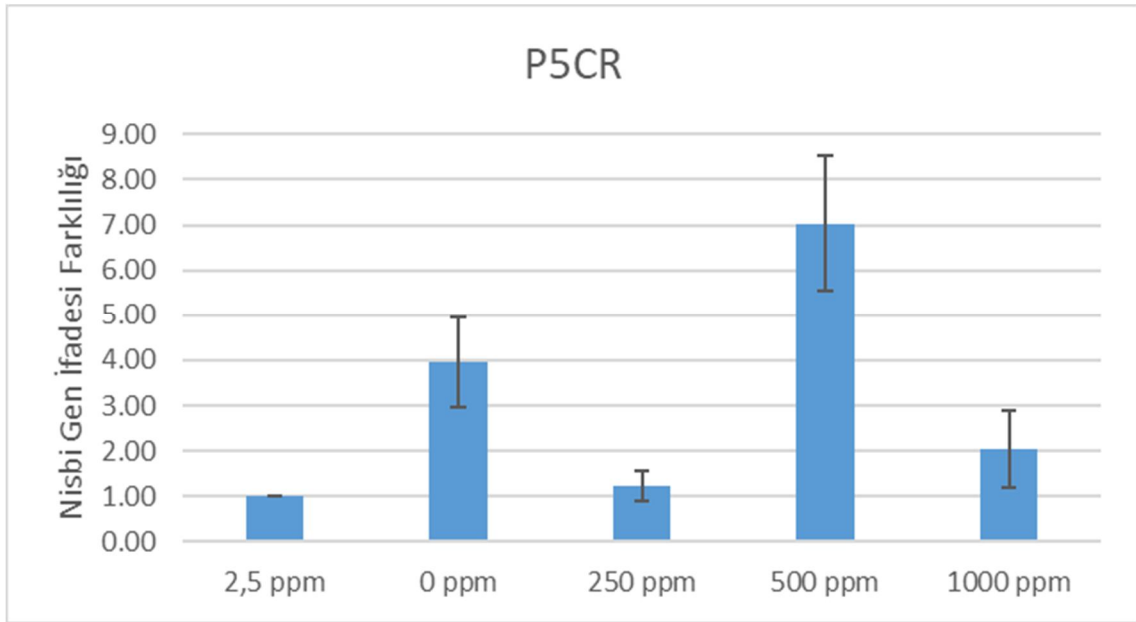


**Şekil 3.2.** Pudi\_37'nin yaprak örneklerinde gen ifade farklılığını gösteren grafik. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.

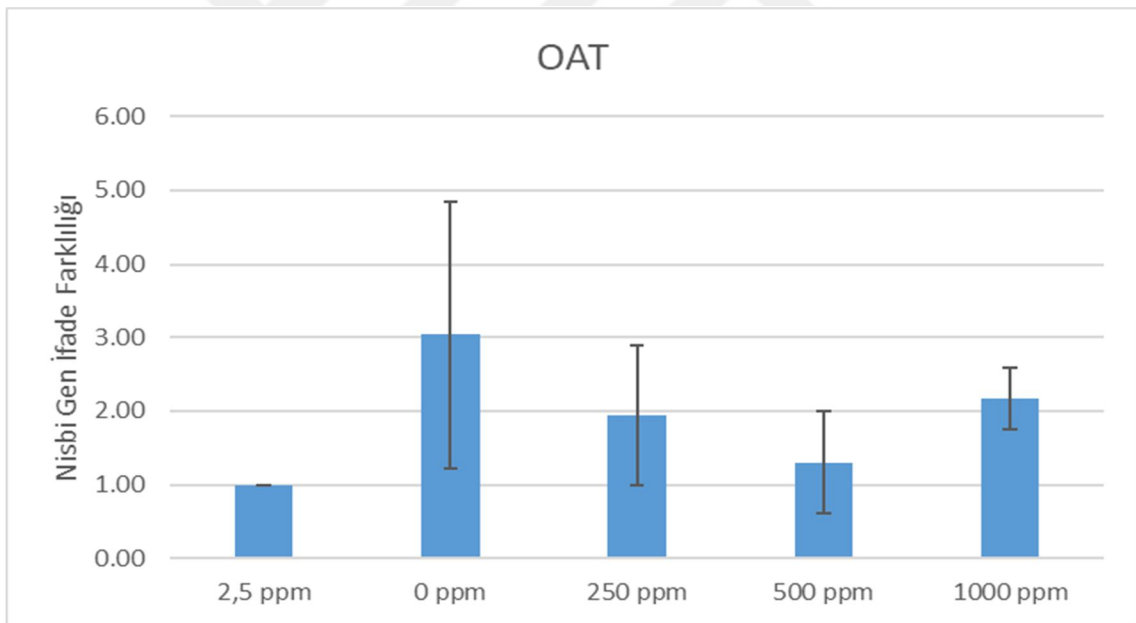
Pudi\_37 *Hordeum vulgare* PsaG (Photosystem I reaction center subunit V, chloroplastic) mRNA DEG deneylerinde gövde 0 ppm'de upregülasyon yapmıştır. Real time PCR validasyonu sonucunda da 0 ppm'de gen ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu açıdan sonuç tutarlı görünmekle birlikte bu gen fragmenti fotosentezle ilişkilidir ve 0 ppm B noksanlık durumunda fotosentez hızının da düşmesi beklenmektedir. B noksanlığı çay bitkisinin yapraklarında fotosentez hızının düşmesine neden olmaktadır (Mukhopadhyay ve ark., 2013). Siyanobakterilerde B noksanlığı neticesinde ortaya



çıkan fotosentezle ilişkili pigmentlerin üretiminin yanı sıra nitrogenaz enzimlerinin aktivitesi de düşmektedir. Yani siyanobakterilerde nitrogenaz aktivitesi için B'a ihtiyaç duyulmaktadır. (Garcia-González ve ark., 1990). Bu açıdan değerlendirildiğinde PCR ile çoğaltılmış olan gen fragmentinin dizi bilgisinin çıkartılıp BLAST analizi yapıldıktan sonra fotosentezle ilişkili bir fragment olup olmadığına dair daha net yorum yapılabilir. Fakat Stavrianakou ve ark. (2006) bor noksanlığının fotosentezle ilişkili olan klorofil içeriği, stoma yoğunluğu ve fotosentez kapasitesi gibi parametrelerde negatif bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte Han ve ark. (2008) bor noksanlığının turuncu yapraklarının büyümesini ve fotosentezini azalttığını belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2014)'nın gerçekleştirmiş olduğu çalışmada ise *Arabidopsis thaliana* bitkisini farklı düzeylerde B uygulamalarına (noksan koşullar için 0  $\mu\text{M}$ , yeterli B için 30  $\mu\text{M}$  ve toksik koşullar için 3000  $\mu\text{M}$  B) maruz bırakmışlardır. Noksan koşullar altında klorofil içeriklerinin diğer koşullara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 60. ve 80. saat klorofil içeriği profilleri de birbirine benzemekte ve noksan koşullarda klorofil miktarının en fazla olarak ölçüldüğü görülmüştür. B stresi altında, klorofil içeriği dışındaki fotosentezle ilişkili olan proteinlerin miktarı negatif olarak etkilenmiştir. *PsaG* geni klorofil bağlanması, fotosentez 1'de fotosentetik elektron transportunda çalışan fotosentezle ilişkili bir genidir. Pudi\_37'nin yaprak örneklerinde farklı B düzeylerinde ölçülen gen ifade farklılıklarının hesaplanmasıyla elde edilen grafik Chen ve ark. (2014)'nin klorofil içeriği ölçümüyle elde ettikleri sonuca benzerlik göstermektedir. Bu tez çalışması süresinde *P. distans* bitkisinin prolin değerleri ölçülmemiştir fakat fakültemiz bünyesinde daha önce *P. distans* bitkisinde yapılan çalışmalarda yapraklarda prolin değerleri ölçülmüştür. Karşılaştırma ölçütü olarak Hamurcu ve ark. (2016), Keskin (2010) ve (Durdu, 2007) farklı düzeylerde B ve tuz stresine maruz kalmış *P. distans* bitkisinin yapraklarında ölçmüş oldukları prolin değerleri kullanılmıştır. Prolin yolağında yer alan P5CR ve OAT ile ilişkili gen fragmentlerinin *P. distans* yaprak örneklerinde gen ifade farklılıklarını gösteren grafikler Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir.



**Şekil 3.3.** P5CR'nin *P. distans* yaprak örneklerinde gen ifade farklılığını gösteren grafik. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.



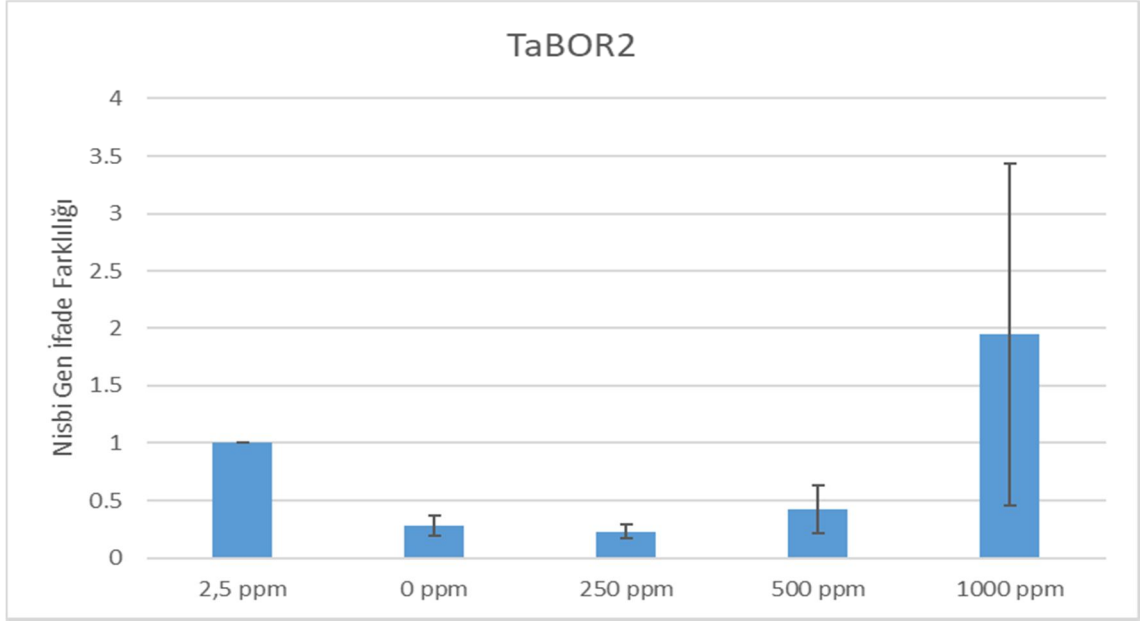
**Şekil 3.4.** OAT'nin *P. distans* yaprak örneklerinde gen ifade farklılığını gösteren grafik. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.

Prolin, bitkilerde kuraklık, tuz veya element stresi varlığında artış gösterdiği bilinen bir ozmoprotektandır (Kishor ve ark., 2005). Biriken prolin miktarı bitki türü ve stresin boyutuna göre değişkenlik göstermektedir (Kishor ve ark., 2005). P5CS enziminin aktivitesi ile prolin arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Yoshiba ve ark., 1995). P5CS enzim aktivitesi çeltik bitkisinde yüksek tuz ve B toksisitesi altında

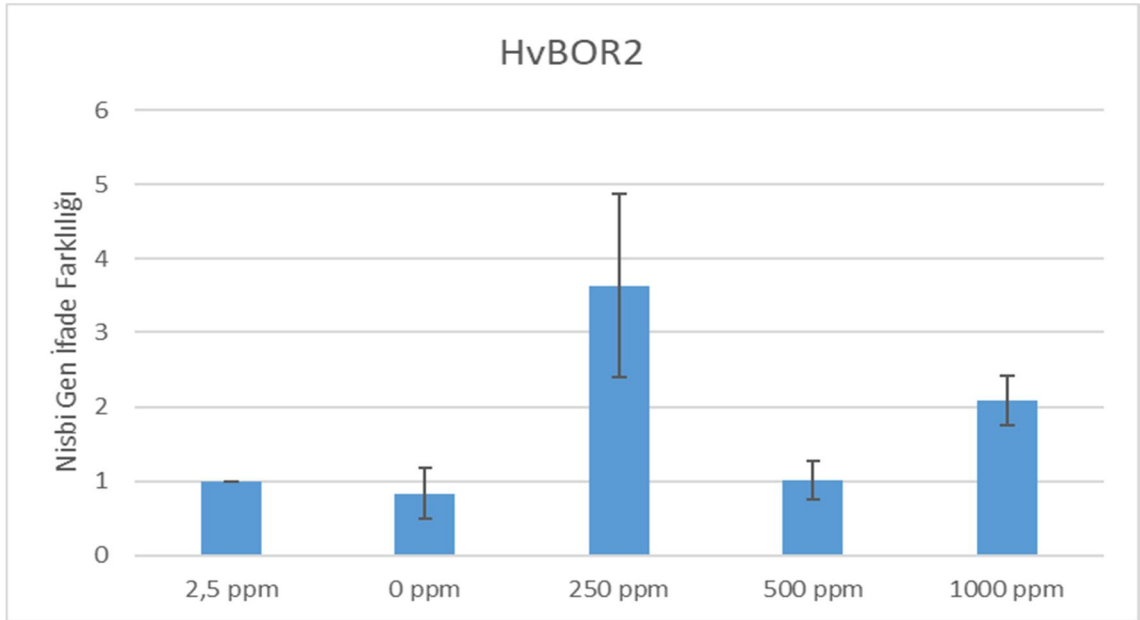
azalırken düşük B ve tuz konsantrasyonlarında ise artmıştır (Dominic ve Jithin, 2012). *P. distans* farklı düzeylerde B'a maruz bırakıldığında Hamurcu ve ark. (2016) da noksan koşul olarak sayılan 0 ppm'le, 1000 ppm koşullarındaki yaprak örneklerinde noksan koşullarda daha fazla prolin biriktiğini belirtmişlerdir. Keskin (2010)'in yapmış olduğu çalışmada *P. distans* B uygulamalarının 30 ve 60. günlerinde yapmış olduğu kıyaslamada bitkilerin yaprak örneklerinde 60. gününde daha fazla prolin birikimi olduğunu ve her iki günde de alınan prolin verilerinde B uygulaması dozajı ile prolin değerleri değişkenlik göstermiştir. Aynı çalışmada her iki günde de kontrol grubunda ölçülen prolin miktarının, daha yüksek konsantrasyondaki B uygulama gruplarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. P5CR enziminin *P. distans* yaprak örneklerindeki gen ifade farklılığı literatürde verilen örneklerle tutarlılık göstermiştir. Bu tez çalışmasında P5CR enziminin gen ifadesinin 0 ppm'de diğer B uygulamalarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu da bitkilerin yüksek dozlardan ziyade B noksanlığı koşullarında stresi daha fazla hissettiğini göstermektedir.

Prolin sentezi, glutamat dışında ayrıca ornitin biyosentezi sonucunda da gerçekleşmektedir (Kishor ve ark., 2005). *T. turgidum* bitkisinde tuz stresi ve farklı zamanlarda soğuğa maruz kaldıktan sonra tolerant olan genotipte  $\delta$ -OAT enziminin aktivitesi ve *OAT* gen ifadesi, duyarlı olan genotipe göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Fragogeorgi ve ark., 2013). Ayrıca Dominic ve Jithin (2012) çeltik bitkisinde yüksek tuz ve B toksisitesi altında P5CS enzim aktivitesi artmasına rağmen, OAT enzim aktivitesinde ise düşüş gözlenmiştir. Yani düşük B ve tuz şartları altında OAT enzim aktivitesinin daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise OAT gen ifadesi ise 0 ve 1000 ppm B dozlarında diğer dozlara göre daha yüksektir. OAT gen ifadesi, P5CR'de olduğu gibi yaprak örneklerinde 0 ppm B'da 1000 ppm'e göre daha yüksektir. Farklı B dozlarının uygulanmış olduğu *P. distans* bitkisinin yaprak ve kök örneklerinde P5CS, P5CR ve OAT enzim aktivitelerinin ölçülmesi B stresine maruz kalmış *P. distans* bitkisinde daha doğru bir değerlendirme yapılmasına yardımcı olabilir. Reid (2007) B tolerant ve B duyarlı buğday ve arpa genotiplerinin kök örneklerinde *BOR2* geninin ifade farklılıklarını karşılaştırmıştır. Bu çalışmada *BOR2*'nin kök hücrelerinde B'un plazma membrandan geçip B'un dışarı atılmasında sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada tolerant buğday ve arpa genotiplerinde B miktarından bağımsız olarak *BOR2*'nin gen ifade artışının tolerant genotiplerde hassas genotiplere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Reid (2007)'nin çalışmasında buğday ve arpa bitkileri için kullanmış olduğu primer çiftlerinin *P. distans* kök örneklerinde de çalıştığı

gösterilmiştir. *TaBOR2* ve *HvBOR2* primer çiftleri ile gerçekleştirilmiş olan çalışmanın grafik sonucu Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.5. *TaBOR2*'nin *P. distans* kök örneklerinde nisbi gen ifade farklılığı. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.



Şekil 3.5. *HvBOR2* 'nin *P. distans* kök örneklerinde nisbi gen ifade farklılığı. Hata çubukları standart hataya göre çizilmiştir.

*TaBOR2* ve *HvBOR2* gen ifade miktarları bu tez çalışmasında 1000 ppm'de 0 ppm'e göre daha yüksek çıkmıştır. Reid (2007) arpayı 4 gün boyunca 5 mM B, buğdayı ise 21 gün boyunca 2 mM'a; düşük düzeyde B uygulamaları içinse 12 µM B'a maruz bırakmışlar ve gen ifade farklılıklarını ölçmüşlerdir. Gerçekleştirmiş oldukları bu çalışmada düşük B koşullarında yüksek B koşullarına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. *BOR2* dışarı atan(eksporter) karakterde bir bor taşıyıcısıdır. Bu çalışma fonksiyonel olarak bir validasyon çalışmasına daha ihtiyaç duymakla birlikte bu primerlerin çoğalttığı DNA bölgelerinin bir B taşıyıcı proteinle ilişkili olduğu varsayıldığında 1000 ppm'de görülen gen ifade farklılığı miktarının kontrol ve 0 ppm'e göre daha fazla olması bu gen fragmentinin toksisiteyle ilişkili bir B eksporter olduğuna işaret ediyor olabileceği değerlendirilmektedir. Keza Reid (2007)'nin çalışmasında kullandığı duyarlı genotiplerde *BOR2*'nin gen ifade düzeyleri toksik B'da düşük B'a göre buğdayda 15 kat, arpada ise 6 kat daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

Pallotta ve ark. (2014) buğday kök örneklerinde yüksek B koşullarında BotB5 transkriptlerinin arttığını göstermek için kullandığı primer çiftleri bu çalışmada da kullanılmıştır. Fakat bu primerler *P. distans* köklerinde amplifikasyonu gerçekleştirebilmekle birlikte dozlar arasında önemli bir farklılık göstermemiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında hiperakümülatör bir bitki olan *Puccinellia distans* bitkisinde enerji ve taşımayla ilişkili olduğu varsayılan DNA fragmentleri gen anlatım yolu ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu Tez çalışması için enerji metabolizmasıyla ilişkili olarak seçilen 3 DEG fragmentinden NAC transcription factor (Pud 23) ve PsaG (Pud 37)'nin validasyonları Real time PCR yolu ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte Real time PCR'da çoğaltılmış olan bu DNA fragmentlerinin dizi bilgilerinin çıkartılması veya RACE metodu ile tam cDNA'ların oluşturulup dizi bilgilerinin çıkartılması ile elde edilen dizi bilgisinin NCBI veritabanında karşılaştırılıp doğrulama yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. İleriki aşamada bu şekilde bir deneyin yapılması çalışmanın niteliğini güçlendireceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasına konu olan B toksisitesine yüksek tolerans göstermiş *P. distans* bitkisinin hem yaprak hem de kök örneklerinde farklı gen fragmentleri açısından qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bir özgün yanı da yetiştirme ortamında B'un bulunmadığı yani B noksan koşullar altında B toksisitesine tolerans gösteren bu bitkide moleküler düzeyde analizlerin gerçekleştirilmiş olmasıdır. Prolin biyosentezinde görev alan P5CR ve  $\delta$ -OAT enzimleri ve B taşınmasında görevli olan *BOR2*'nin farklı B konsantrasyonları altında yetiştirilmiş olan *P. distans* yaprak ve kök örneklerinde gen ifade miktarları qRT-PCR ile ölçülmüştür. Bu deneyler sonucunda elde verilerin literatürle bir tutarlılık göstermekle birlikte bu çalışmanın doğruluğunu güçlendirecek ileri aşama çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Abiyotik ve biyotik stres faktörleri önemli ölçüde tarımda verimliliği olumsuz olarak etkilemektedir. Toprakta bulunan elverişli mikro besin elementlerinin noksanlığı veya toksisitesi bitkiler için önemli kayıplara yol açabilmektedir. Bu tez çalışmasında B stresi üzerinde durulmuştur. Yani bitki hem B noksanlığı hem de B toksisitesine maruz bırakılmıştır. Bitkilerde yapısal fonksiyonu belli ölçüde çalışılmış olan B elementinin etkilediği metabolizmalara göre çok sayıda varsayılan rolü bulunmaktadır. Hiperakümülatör *P. distans* bitkisi buğdaygiller familyasında olmasından dolayı buğday, arpa ve çeltik gibi dünya için önemli tahıl grubu için bir model organizma olarak değerlendirilmektedir. Tuz ve bor stresine yüksek düzeyde tolerans gösteren bu bitkinin tolerans mekanizmasını moleküler düzeyde anlamak buğdaygiller familyası üyelerinden heksaploid ekmeklik buğday gibi karmaşık genom yapısına sahip olan bitki türlerinde B tolerans mekanizmasını anlamamıza veya B tolerans mekanizmasını

geliştirmemize yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Fakat bitkiler aynı anda tek bir strese değil birden fazla strese maruz kalabilmektedirler. Bir yandan B stresine tolerans göstermeye çalışan bitkiler, topraklarda bulunan tuzluluk gibi problemlerle de başa çıkmaya çalışmaktadırlar. Bu kapsamda *P. distans* gibi hem B hem de tuz stresine dayanıklılık gösteren bir bitkiyi anlamak özellikle ıslahçılar için önem taşımaktadır. Türkiye'nin biyoçeşitliliği için de B'lu ve tuzlu topraklar için fitoremediasyonun anlaşılmasında, B ve tuzu ayrı ayrı ve birlikte maruz kaldığında bitkilerin olası reaksiyonlarının doğru anlaşılmasında ve tahıllarla ilgili abiyotik stres şartlarına uygun bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde bu özel bitki değerlendirilmiştir.



## KAYNAKLAR

- Ahmed, I., Yokota, A. ve Fujiwara, T., 2007, A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth, *Extremophiles*, 11 (2), 217-224.
- Al-Ali, R. ve Gonzalez-Sarmiento, R., 2017, High concentrations of boric acid induce autophagy in cancer cell lines, *bioRxiv*.
- Alpaslan, M. ve Gunes, A., 2001, Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants, *Plant and Soil*, 236 (1), 123-128.
- ANG Vakfı, 2012, Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları*, 523-530.
- Anonim, 2014, Türkiye Bor Rezervleri, <http://www.boren.gov.tr/tr/bor/bor-rezervleri> Ziyaret Tarihi: [21.05.2016].
- Anonymous, *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl, Wisconsin <http://wisplants.uwsp.edu/scripts/detail.asp?SpCode=PUCDIS> Ziyaret Tarihi: [25.09.2014].
- Anonymous, 2001, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2001), Washington, D. C. , <https://www.nap.edu/read/10026/chapter/1> Ziyaret Tarihi: [24.11.2017].
- Asad, A., Bell, R. W. ve Dell, B., 2001, A critical comparison of the external and internal boron requirements for contrasting species in boron-buffered solution culture, *Plant and Soil*, 233 (1), 31-45.
- Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B. ve Dural, H., 2004, *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels, *Turkish Journal of Botany*, 28 (3), 273-278.
- Bar, C., Doğanlar, S. ve Frary, A., 2015, Genetic relationships among Eurasian *Puccinellia distans* genotypes, *Biochemical Systematics and Ecology*, 62 (Supplement C), 20-24.
- Blevins, D. G. ve Lukaszewski, K. M., 1998, Boron In Plant Structure And Function, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49 (1), 481-500.
- Britton, N. L. ve Brown, A., 1913, USDA-NRCS PLANTS Database / An illustrated flora of the northern United States, Canada and the British Possessions. New York, Charles Scribner's Sons. 3.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z. ve Zhao, F., 2012, Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients A2 - Marschner, Petra, In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition), Eds, *San Diego: Academic Press*, p. 191-248.
- Brown, P. H. ve Shelp, B. J., 1997, Boron mobility in plants, *Plant and Soil*, 193 (1), 85-101.
- Cao, J., Lv, X. Y., Chen, L., Xing, J. J. ve Lan, H. Y., 2015, Effects of salinity on the growth, physiology and relevant gene expression of an annual halophyte grown from heteromorphic seeds, *Aob Plants*, 7, plv112-plv112.
- Cartwright, B., Zarcinas, B. ve Mayfield, A., 1984, Toxic concentrations of boron in a red-brown earth at Gladstone, South Australia, *Soil Research*, 22 (3), 261-272.
- Chatterjee, M., Liu, Q., Menello, C., Galli, M. ve Gallavotti, A., 2017, The Combined Action of Duplicated Boron Transporters Is Required for Maize Growth in Boron Deficient Conditions, *Genetics*.



- Chen, M., Mishra, S., Heckathorn, S. A., Frantz, J. M. ve Krause, C., 2014, Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis, *Journal of Plant Physiology*, 171 (3), 235-242.
- Davis, P. H., 1965, Flora of Turkey, *Flora of Turkey*.
- Ding, Y. F., Wang, C. T., Tang, Y. Y., Wang, X. Z., Wu, Q., Hu, D. Q., Yu, H. T., Zhang, J. C., Cui, F. G., Song, G. S., Gao, H. Y. ve Yu, S. L., 2012, Isolation and analysis of differentially expressed genes from peanut in response to challenge with *Ralstonia solanacearum*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (5).
- Dominic, V. J. ve Jithin, T., 2012, Effect of NaCl and Boron Toxicity on Proline Biosynthesis of *Oryza sativa* (Pokkali VTL-4), *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1 (3), 73-83.
- Durdu, İ., 2007, Farklı Tuz Konsantrasyonlarına Maruz Bırakılan Bazı Halofit Bitkilerde ( *Salicornia Europaea* L., *Puccinellia Distans* ( Jacq.) Parl. Ve *Atriplex Olivieri* Moq.) Meydana Gelen Fizyolojik Parametrelerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi*.
- Eckhert, C., Barranco, W. ve Kim, D., 2007, Boron and Prostate Cancer a Model for Understanding Boron Biology, In: Advances in Plant and Animal Boron Nutrition: Proceedings of the 3rd International Symposium on all Aspects of Plant and Animal Boron Nutrition, Eds: Xu, F., Goldbach, H. E., Brown, P. H., Bell, R. W., Fujiwara, T., Hunt, C. D., Goldberg, S. ve Shi, L. E. I., *Dordrecht: Springer Netherlands*, p. 291-297.
- Elçi, Ş. ve Bostancıoğlu, H., 1981, Bala Devlet Üreme Çifliğinden Alınan Çorak Çiminin (*Puccinellia distans* L.) Diploid Materyalinde Morfolojik, Sitolojik ve Sitogenetik Araştırmalar, *TÜBİTAK, Ankara*.
- Fragogeorgi, G., Tsikou, D., Aivalakis, G., Flemetakis, E., Chronopoulou-Sereli, K., Tsiros, J. ve Katinakis, P., 2013, Environmental Stresses And Plant Tolerance. The Role Of Ornithine- $\Delta$ -Aminotransferase In Durum Wheat Plants *International Conference on Environmental Science and Technology*, Athens, Greece.
- Garcia-González, M., Mateo, P. ve Bonilla, I., 1990, Effect of boron deficiency on photosynthesis and reductant sources and their relationship with nitrogenase activity in *Anabaena* PCC 7119, *Plant Physiology*, 93 (2), 560-565.
- Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N., Yorgancılar, M., Ceyhan, E., Çiftçi, N., Acar, B., Gültekin, I., Işık, Y., Şeker, C. ve Babaoglu, M., 2002, Boron Content of Cultivated Soils in Central-Southern Anatolia and its Relationship with Soil Properties and Irrigation Water Quality, In: Boron in Plant and Animal Nutrition, Eds: Goldbach, H. E., Brown, P. H., Rerkasem, B., Thellier, M., Wimmer, M. A. ve Bell, R. W., *Boston, MA: Springer US*, p. 391-400.
- Gupta, U. C., 1993, Boron and its role in crop production, *Boca Raton, Fla.*, CRC Press, p.
- Hakki, S. S., Bozkurt, B. S. ve Hakki, E. E., 2010, Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24 (4), 243-250.
- Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., Baspınar, N., Basoglu, A. ve Nielsen, F. H., 2013, Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27 (2), 148-153.

- Hameed, A., Gulzar, S., Aziz, I., Hussain, T., Gul, B. ve Khan, M. A., 2015, Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte, *Aob Plants*, 7, plv004.
- Hamurcu, M., Hakki, E. E., Demiral Sert, T., Ozdemir, C., Minareci, E., Avsaroglu, Z. Z., Gezgin, S., Ali Kayis, S. ve Bell, R. W., 2016, Extremely high boron tolerance in *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. related to root boron exclusion and a well-regulated antioxidant system, *Z Naturforsch C*, 71 (7-8), 273-285.
- Han, S., Chen, L.-S., Jiang, H.-X., Smith, B. R., Yang, L.-T. ve Xie, C.-Y., 2008, Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 165 (13), 1331-1341.
- Harivandi, M. A., Butler, J. D. ve Soltanpour, P. N., 1982, Effects of sea water concentrations on germination and ion accumulation in alkaligrass (*Puccinellia* spp.), *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 13 (7), 507-517.
- Hu, H. ve Brown, P. H., 1997, Absorption of boron by plant roots, *Plant and Soil*, 193 (1), 49-58.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. ve Xiong, L., 2006, Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12987-12992.
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T. M., Goodwin, S. M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D. W., Jenks, M. A., Rhodes, D., Hasegawa, P. M., Bohnert, H. J., Joly, R. J., Bressan, R. A. ve Zhu, J.-K., 2004, Salt Cress. A Halophyte and Cryophyte *Arabidopsis* Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles, *Plant Physiology*, 135, 1718-1737.
- Kant, S., Kant, P., Raveh, E. ve Barak, S., 2006, Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*, *Plant, Cell & Environment*, 29 (7), 1220-1234.
- Kasajima, I. ve Fujiwara, T., 2007, Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron, *Plant Biotechnology*, 24 (3), 355-360.
- Keren, R. ve Bingham, F. T., 1985, Boron in Water, Soils, and Plants, In: Advances in Soil Science, Eds: Stewart, B. A., *New York, NY: Springer New York*, p. 229-276.
- Keskin, H., 2010, Arpa çeşitleri (*Hordeum vulgare*) ile çorak çimi'nde (*Puccinellia distans*) bor toksisitesinin temel fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere etkisinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Kishor, P. K., Sangam, S., Amrutha, R., Laxmi, P. S., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddy, K., Theriappan, P. ve Sreenivasulu, N., 2005, Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Current science*, 424-438.
- Kobayashi, M., Matoh, T. ve Azuma, J.-i., 1996, Two Chains of Rhamnogalacturonan II Are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls, *Plant Physiology*, 110 (3), 1017-1020.

- Kobayashi, M., Nakagawa, H., Asaka, T. ve Matoh, T., 1999, Borate-Rhamnogalacturonan II Bonding Reinforced by Ca<sup>2+</sup> Retains Pectic Polysaccharides in Higher-Plant Cell Walls, *Plant Physiology*, 119 (1), 199-204.
- Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., Wohlleben, W. ve Tateno, Y., 1993, Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (7), 3009-3013.
- Lee, K.-W., Rahman, M. A., Choi, G. J., Kim, K.-Y., Ji, H. C., Kim, J. G. ve Lee, S.-H., 2017, Identification Of Cold And Heat-Induced Differentially Expressed Genes In Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Leaves, *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 27 (4), 1231-1237.
- Lee, K. W., Choi, G. J., Kim, K. Y., Ji, H. C., Zaman, R. ve Lee, S. H., 2011, Identification of drought induced differentially expressed genes in barley leaves using the annealing control-primer-based GeneFishing technique, *Australian Journal of Crop Science*, 5 (11), 1364-1369.
- Lee, S. H., Lee, K. W., Kim, K. Y., Choi, G. J., Yoon, S. H., Ji, H. C., Seo, S., Lim, Y. C. ve Ahsan, N., 2009, Identification of salt-stress induced differentially expressed genes in barley leaves using the annealing-control-primer-based GeneFishing technique, *African Journal of Biotechnology*, 8 (7), 1326-1331.
- Lee, S. H., Lee, D. G. ve Lee, K. W., 2015, Identification of heat stress-induced differentially expressed genes of Siberian wildrye grass (*Elymus sibiricus* L.) leaves, *Research Journal of Biotechnology*, 10 (6), 100-103.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Loomis, W. D. ve Durst, R. W., 1992, Chemistry and Biology of Boron, *Biofactors*, 3 (4), 229-239.
- Ma, L., Zhou, E., Gao, L., Mao, X., Zhou, R. ve Jia, J., 2008, Isolation, expression analysis and chromosomal location of P5CR gene in common wheat (*Triticum aestivum* L.), *South African Journal of Botany*, 74 (4), 705-712.
- MacPhie, G. R. G. R., 1973, Three successful salt tolerant plants, *South Australia. Department of Agriculture, Govt. Pr*, p.
- Mahboobi, H., Yücel, M. ve Öktem, H. A., 2002, Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity, *Journal of Plant Nutrition*, 25 (8), 1829-1837.
- Meacham, S. L., Elwell, K. E., Ziegler, S. ve Carper, S. W., 2007, Boric Acid Inhibits Cell Growth in Breast and Prostate Cancer Cell Lines, In: *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition: Proceedings of the 3rd International Symposium on all Aspects of Plant and Animal Boron Nutrition*, Eds: Xu, F., Goldbach, H. E., Brown, P. H., Bell, R. W., Fujiwara, T., Hunt, C. D., Goldberg, S. ve Shi, L. E. I., *Dordrecht: Springer Netherlands*, p. 299-306.
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H. ve Appel, T., 2001, Boron, In: *Principles of plant nutrition*, Eds: Springer, p. 621-638.
- Miflin, B. J. ve Habash, D. Z., 2002, The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops, *Journal of Experimental Botany*, 53 (370), 979-987.

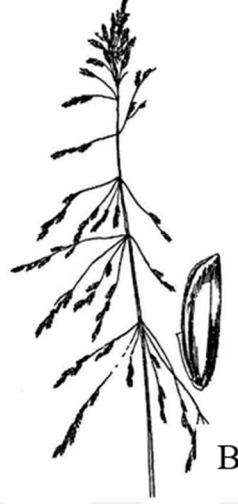
- Miwa, K. ve Fujiwara, T., 2010a, Role of Boron in Plant Growth and its Transport Mechanisms, In: Cell Biology of Metals and Nutrients, Eds: Hell, R. ve Mendel, R.-R., *Berlin, Heidelberg*: Springer Berlin Heidelberg, p. 1-15.
- Miwa, K. ve Fujiwara, T., 2010b, Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters, *Annals of Botany*, 105 (7), 1103-1108.
- Miwa, K., Tanaka, M., Kamiya, T. ve Fujiwara, T., 2010, Molecular Mechanisms of Boron Transport in Plants: Involvement of Arabidopsis NIP5;1 and NIP6;1, In: MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids, Eds: Jahn, T. P. ve Bienert, G. P., *New York, NY*: Springer New York, p. 83-96.
- Miwa, K., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T. ve Fujiwara, T., 2013, Roles of BOR2, a Boron Exporter, in Cross Linking of Rhamnogalacturonan II and Root Elongation under Boron Limitation in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 163 (4), 1699-1709.
- Mukhopadhyay, M., Ghosh, P. D. ve Mondal, T. K., 2013, Effect of boron deficiency on photosynthesis and antioxidant responses of young tea plantlets, *Russian Journal of Plant Physiology*, 60 (5), 633-639.
- Nielsen, F. H. ve Stoecker, B. J., 2009, Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23 (3), 195-203.
- Nielsen, F. H., 2014, Update on human health effects of boron, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28 (4), 383-387.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M. ve Kikuchi, S., 2013, Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants, *Frontiers in Microbiology*, 4, 248.
- Ochiai, K., Shimizu, A., Okumoto, Y., Fujiwara, T. ve Matoh, T., 2011, Suppression of a NAC-Like Transcription Factor Gene Improves Boron-Toxicity Tolerance in Rice, *Plant Physiology*, 156 (3), 1457-1463.
- Öztürk, S. E., Göktay, M., Has, C., Babaoğlu, M., Allmer, J., Doğanlar, S. ve Frary, A., 2018, Transcriptomic analysis of boron hyperaccumulation mechanisms in *Puccinellia distans*, *Chemosphere*, 199, 390-401.
- Pallotta, M., Schnurbusch, T., Hayes, J., Hay, A., Baumann, U., Paull, J., Langridge, P. ve Sutton, T., 2014, Molecular basis of adaptation to high soil boron in wheat landraces and elite cultivars, *Nature*, 514 (7520), 88-+.
- Pappin, B., Kiefel, M. J. ve Houston, T. A., 2012, Boron-carbohydrate interactions, In: Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, Eds: InTech, p.
- Park, J.-S., Kim, I. S., Cho, M. S., Park, S. ve Park, S. G., 2006, Identification of differentially expressed genes involved in spine formation on seeds of *Daucus carota* L. (carrot), using annealing control primer (ACP) system, *Journal of Plant Biology*, 49 (2), 133-140.
- Parker, D. R., Page, A. L. ve Thomason, D. N., 1991, Salinity and Boron Tolerances of Candidate Plants for the Removal of Selenium from Soils, *Journal of Environmental Quality*, 20 (1), 157-164.
- Parr, A. J. ve Loughman, B. C., 1983, Boron and Membrane Function in Plants, In: Metals and Micronutrients, Eds: Pierpoint, W. S., *London*: Academic Press, p. 87-107.
- Reid, J. R., 2013, Boron Toxicity and Tolerance in Crop Plants, In: Crop Improvement Under Adverse Conditions, Eds: Tuteja, N. ve Gill, S. S., *New York, NY*: Springer New York, p. 333-346.

- Reid, R., 2007, Identification of Boron Transporter Genes Likely to be Responsible for Tolerance to Boron Toxicity in Wheat and Barley, *Plant and Cell Physiology*, 48 (12), 1673-1678.
- Reid, R. ve Fitzpatrick, K., 2009, Influence of Leaf Tolerance Mechanisms and Rain on Boron Toxicity in Barley and Wheat, *Plant Physiology*, 151, 413-420.
- Reid, R., 2014, Understanding the boron transport network in plants, *Plant and Soil*, 385 (1-2), 1-13.
- Robinson, B., Green, S., Mills, T., Clothier, B., Velde, M. v. d., Laplane, R., Fung, L., Deurer, M., Hurst, S., Thayalakumaran, T. ve Dijssel, C. v. d., 2003, Phytoremediation: using plants as biopumps to improve degraded environments, *Soil Research*, 41 (3), 599-611.
- Robinson, B. H., Green, S. R., Chancerel, B., Mills, T. M. ve Clothier, B. E., 2007, Poplar for the phytomanagement of boron contaminated sites, *Environmental Pollution*, 150 (2), 225-233.
- Schnurbusch, T., Hayes, J., Hrmova, M., Baumann, U., Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Langridge, P. ve Sutton, T., 2010, Boron Toxicity Tolerance in Barley through Reduced Expression of the Multifunctional Aquaporin HvNIP2;1, *Plant Physiology*, 153, 1706-1715.
- Shorrocks, V. M., 1997, The occurrence and correction of boron deficiency, *Plant and Soil*, 193 (1), 121-148.
- Song, J., Niu, Z. B., Li, Q. Q., Bao, Y. G., Ma, X., Wang, H. G., Kong, L. R. ve Feng, D. S., 2015, Isolation and Identification of Differentially Expressed Genes from Wheat in Response to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt), *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (5), 1371-1380.
- Spears, J. W. ve Armstrong, T. A., 2007, Dietary Boron: Evidence for a Role in Immune Function, In: *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition: Proceedings of the 3rd International Symposium on all Aspects of Plant and Animal Boron Nutrition*, Eds: Xu, F., Goldbach, H. E., Brown, P. H., Bell, R. W., Fujiwara, T., Hunt, C. D., Goldberg, S. ve Shi, L. E. I., *Dordrecht*: Springer Netherlands, p. 269-276.
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G. ve Karabourniotis, G., 2006, Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae), *Environmental and Experimental Botany*, 56 (3), 293-300.
- Stiles, A. R., Liu, C. G., Kayama, Y., Wong, J., Doner, H., Funston, R. ve Terry, N., 2011, Evaluation of the Boron Tolerant Grass, *Puccinellia distans*, as an Initial Vegetative Cover for the Phytoremediation of a Boron-Contaminated Mining Site in Southern California, *Environmental Science & Technology*, 45 (20), 8922-8927.
- Şaylı, B. S., Çöl, M., Elhan, A. H. ve Genç, Y., 2003, Assessment of fertility and infertility in boron-exposed Turkish subpopulations 6: Relevant data from all centers, *Journal of Ankara Medical School*, 25 (4), 165-174.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. ve Fujiwara, T., 2002, Arabidopsis boron transporter for xylem loading, *Nature*, 420 (6913), 337-340.
- Takano, J., Miwa, K. ve Fujiwara, T., 2008, Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters, *Trends in Plant Science*, 13 (8), 451-457.
- Tarasoff, C. S., Mallory-Smith, C. A. ve Ball, D. A., 2007, Comparative plant responses of *Puccinellia distans* and *Puccinellia nuttalliana* to sodic versus normal soil types, *Journal of Arid Environments*, 70 (3), 403-417.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. ve Rozen, S. G., 2012, Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*, 40 (15), e115-e115.
- Uyğın, S., 2014, Yabani buğdayda (*Triticum boeoticum* L.) farklı bor uygulamaları ile meydana gelen tepkilerin fizyolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Warington, K., 1923, The Effect of Boric Acid and Borax on the Broad Bean and certain other Plants, *Annals of Botany*, os-37 (4), 629-672.
- Wei, Y., Bell, R. W., Yang, Y., Ye, Z., Wang, K. ve Huang, L., 1998, Prognosis of boron deficiency in oilseed rape (*Brassica napus*) by plant analysis, *Australian Journal of Agricultural Research*, 49 (5), 867-874.
- Wu, L., Fan, Z., Guo, L., Li, Y., Zhang, W., Qu, L.-J. ve Chen, Z., 2003, Over-expression of an Arabidopsis  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice, *Chinese Science Bulletin*, 48 (23), 2594-2600.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. ve Shinozaki, K., 1995, Correlation between the induction of a gene for  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress, *The Plant Journal*, 7 (5), 751-760.
- Yu, S. T., Yu, H. B., Yu, G. Q., Zhao, L. R., Sun, H. X., Tang, Y. Y., Wang, X. Z., Wu, Q., Sun, Q. X. ve Wang, C. T., 2015, Isolation of Differentially Expressed Genes from Developing Seeds of a High-Protein Peanut Mutant and Its Wild Type Using Genefishing™ Technology, In: *Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume I*, Eds: Zhang, T.-C. ve Nakajima, M., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 37-45.
- Zhang, X., Wei, L. Q., Wang, Z. Z. ve Wang, T., 2013, Physiological and Molecular Features of *Puccinellia tenuiflora* Tolerating Salt and Alkaline-Salt Stress, *Journal of Integrative Plant Biology*, 55 (3), 262-276.
- Zhang, Z., Xiong, S., Wei, Y., Meng, X., Wang, X. ve Ma, X., 2017, The role of glutamine synthetase isozymes in enhancing nitrogen use efficiency of N-efficient winter wheat, *Scientific Reports*, 7 (1), 1000.

## EKLER

**EK-1** A ve B çizimleri USDA, Doğal Kaynakları Koruma Servisi bitki veri tabanından alınmıştır (Britton ve Brown, 1913) C ve D fotoğrafları ise S.Ü. Ziraat Fakültesi seralarında, E fotoğrafı ise *P. distans*'ın kendi habitatında Fatma Akın tarafından çekilmiştir.



**EK-2 P. *distans* kök örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri**

Örnek Adı	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
kök-0-1	443.85	11.096	5.228	2.12	2.24
kök-0-1	450.66	11.267	5.368	2.1	2.21
kök-0-2	365.79	9.145	4.303	2.13	2.35
kök-0-2	369.75	9.244	4.339	2.13	2.34
kök-0-3	417.4	10.435	4.927	2.12	2.18
kök-0-3	409.76	10.244	4.816	2.13	2.15
kök-2,5-1	691.52	17.288	8.008	2.16	2.29
kök-2,5-1	679.96	16.999	7.915	2.15	2.3
kök-2,5-2	400.07	10.002	4.67	2.14	1.7
kök-2,5-2	404.19	10.105	4.742	2.13	1.7
kök-2,5-3	464.25	11.606	5.465	2.12	2.22
kök-2,5-3	448.75	11.219	5.302	2.12	2.21
kök-250-1	506.26	12.656	5.879	2.15	1.93
kök-250-1	486.47	12.162	5.591	2.18	1.91
kök-250-2	629.74	15.743	7.225	2.18	2.43
kök-250-2	668.16	16.704	7.641	2.19	2.42
kök-250-3	183.61	4.59	2.122	2.16	2.41
kök-250-3	180.62	4.515	2.113	2.14	2.4
kök-500-1	301.78	7.545	3.501	2.15	2.29
kök-500-1	276.17	6.904	3.229	2.14	2.31
kök-500-2	215.74	5.393	2.457	2.2	1.17
kök-500-2	221.14	5.528	2.556	2.16	1.17
kök-500-3	225.92	5.648	2.613	2.16	2.21
kök-500-3	221.02	5.525	2.576	2.14	2.19
kök-1000-1	232.1	5.802	2.701	2.15	2.36
kök-1000-1	240.2	6.005	2.812	2.14	2.35
kök-1000-2	203.84	5.096	2.409	2.12	2.36
kök-1000-2	202.85	5.071	2.384	2.13	2.35
kök-1000-3	174.97	4.374	2.025	2.16	2.17
kök-1000-3	168.39	4.21	1.947	2.16	2.15



**EK-3** *P. distans* yaprak örneklerinin RNA konsantrasyonları ve saflık değerleri

Sample ID	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
yaprak-0-1	283.39	7.085	3.415	2.07	2.34
yaprak-0-1	273.4	6.835	3.272	2.09	2.33
yaprak-0-2	284.5	7.113	3.393	2.1	2.24
yaprak-0-2	294.28	7.357	3.5	2.1	2.21
yaprak-0-3	370.89	9.272	4.435	2.09	2.22
yaprak-0-3	369.03	9.226	4.431	2.08	2.23
yaprak-2,5-1	319.56	7.989	3.759	2.13	0.96
yaprak-2,5-1	325.84	8.146	3.867	2.11	0.99
yaprak-2,5-2	366.39	9.16	4.723	1.94	1.01
yaprak-2,5-2	625.61	15.64	7.487	2.09	1.3
yaprak-2,5-2	608.44	15.211	7.396	2.06	1.28
yaprak-2,5-2	479.2	11.98	5.859	2.04	2.21
yaprak-2,5-3	471.38	11.785	5.717	2.06	2.21
yaprak-250-2	444.32	11.108	5.372	2.07	2.24
yaprak-250-2	429.05	10.726	5.186	2.07	2.23
yaprak-250-1	551.15	13.779	6.654	2.07	2.41
yaprak-250-1	547.38	13.684	6.613	2.07	2.42
yaprak-500-1	386.21	9.655	4.626	2.09	2.02
yaprak-500-1	384.91	9.623	4.568	2.11	2.03
yaprak-500-2	540.47	13.512	6.531	2.07	2.35
yaprak-500-2	528.66	13.217	6.296	2.1	2.35
yaprak-500-3	279.73	6.993	3.317	2.11	1.56
yaprak-500-3	276.49	6.912	3.265	2.12	1.56
yaprak-1000-1	360.97	9.024	4.29	2.1	2.33
yaprak-1000-1	349.99	8.75	4.195	2.09	2.34
yaprak-1000-2	886.54	22.163	10.8	2.05	2.38
yaprak-1000-2	882.41	22.06	10.693	2.06	2.39
yaprak-1000-3	345.46	8.636	4.147	2.08	2.35
yaprak-1000-3	345.26	8.631	4.16	2.07	2.33

**EK-4** Tez çalışmasında kullanılan primer dizi bilgileri ve referansları

Primer Adı	5'-3' Dizi Bilgisi	Referans
OAT-F2	GCAGATCAAGAAGCCAGAATCG	Fragogeorgi ve ark. (2013)
OAT-R2	TAAATCCCGACCGCACCTATC	
P5CR F	GGCTTAAGTGGTAGTGGTCC	Ma ve ark. (2008)
P5CR R	TGTTTACCCGTCTCGCTAAC	
TaBOT2 F	GATGGGTCTGCATTTGGACT	Reid (2007)
TaBOT2 R	CCAAAAAGCTCTCCTGCAAC	
HVBOR2 F	CCCAAGTAGGCCATTGACAT	Reid (2007)
HVBOR2 R	AATCGTGGGCGAGTTCAGTA	
BotB5 F	AAACGGTGAAGATGGGGAGCAAACC	Pallotta ve ark. (2014)
BotB5 R	CCTTCAAGAACCTTG TAGCGGC	
Beta Actin F	CCATTGGTGCTGAGCGTTT	Zhang ve ark. (2013)
Beta Actin R	GCTTCCATCCCAATGAAGGA	

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Fatma Akın  
**Uyruğu** : TC  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Meram 20.01.1990  
**Telefon** : 0 506 320 52 27  
**E-mail** : [akn.fatma@gmail.com](mailto:akn.fatma@gmail.com)  
**Researchgate** : [https://www.researchgate.net/profile/Fatma\\_Akin](https://www.researchgate.net/profile/Fatma_Akin)

### EĞİTİM

Derece	Adı, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Selçuklu Anadolu Lisesi, Konya	2007
Üniversite	: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2012
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Konya Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü	2018

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2013-2018	Selçuk Üniv. Biyoteknoloji Laboratuvarı 1003 Tübitak Projesi	Yüksek Lisans öğrencisi
2015-2016	(Klasik ve Moleküler Islah Yöntemleri Kullanılarak Bazı Buğday Çeşitlerine Tuza Toleranslılık Genlerinin Aktarılması) Proje No: 214O072	Bursiyer

### UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji, Moleküler Islah

### YABANCI DİLLER

İngilizce

## YAYINLAR

### Sözlü Bildiriler

1. Changes of gene expression profiles of boron stressed *Puccinella distans*. Erdogan Esref HAKKI, Bilgin Candan CAKIR, Mehmet HAMURCU, Fatma AKIN, Sait GEZGIN, Ozge CELIK. 6th International Symposium Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals. Catania, Italy. 26-28 May 2016.
2. Bor Stresine Karşı Bitkilerin Cevabında Çalışan Taşıyıcı Proteinler. Fatma AKIN. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yüksek Lisans Seminer Sunumu. 23.02.2016
3. ISSR Analysis of Hybrid Maize Genetic Resources in a Variety Development Program Suitable for Central Anatolian Conditions. Ahmet Tamkoc, Fatma Akin, Noyan Eken, Saliha Mutaf, Hasan Can, Ahmet Konuk, Erdogan Esref Hakkı. II. International Plant Breeding Congress. Antalya, 2-5 November 2015.
4. Konya Yöresine Ait Bazı Yıldızçiçeği (*Dahlia cav.*) Genotiplerinin ISSR Yöntemiyle Akrabalık Derecelerinin Belirlenmesi. Bahar Banu Batı, Mustafa Paksoy, Fatma Akın, Erdoğan Eşref Hakkı. II. International Plant Breeding Congress. Antalya, 2-5 November 2015.
5. Molecular characterization of purple carrot originated from Central Anatolia. Hilmiye Erişdi, Önder Türkmen, Erdoğan Eşref Hakkı, Fatma Akın. 2nd ICSAE 2015 International Conference on Sustainable Agriculture and Environment. Konya, 30 September-3 October 2015.
6. Günümüzde GDO'lu Bitkisel Ürünler. Eşref Erdoğan Hakkı, Fatma Akın, Seyit Ali Kayış. Uluslararası 2. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi. Konya, 7-10 Kasım 2013.

### Poster Bildirileri

1. Screening Boron Transporters Genes in Wild Grass *Puccinellia distans* (Jacq). Parl: Preliminary Study. Fatma Akın, Hasan Can, Mehmet Hamurcu, Sait Gezgin, Erdoğan E. Hakkı. International Symposium on Boron in Agriculture. Ankara. 16-18 November 2016 (Tez çalışmasından yapılmıştır).
2. Agricultural biodiversity: a challenge for the future of human well-being. Ahmet Direk, Esra Kavci, Fatma Akin, Hasan Can, Sündüz Onbaşı, Saliha Mutaf, Erdoğan Eşref Hakkı. 2nd ICSAE 2015 International Conference on Sustainable Agriculture and Environment. Konya, 30 September-3 October 2015.
3. ISSR Yöntemi ile Türkiye'de Bazı Yerel Domates Genotiplerinin Akrabalık İlişkilerinin Tespiti. Fatma Akın, Levent Keskin, Erdoğan Eşref Hakkı, Mustafa Paksoy, Önder Türkmen. 10. Sebze Tarım Sempozyumu. Tekirdağ, 2-4 Eylül 2015.