

***Arabidopsis thaliana*'DA KÜKÜRT TEŞVİKLİ BOR
TOLERANSININ İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF SULFUR INDUCED BORON
TOLERANCE IN *Arabidopsis thaliana***

SEDA YİRMİBEŞ

PROF. DR. YASEMİN EKMEKÇİ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır

2022

ÖZET

***Arabidopsis thaliana*'DA KÜKÜRT TEŞVİKLİ BOR TOLERANSININ İNCELENMESİ**

Seda YİRMİBEŞ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

Mayıs 2022, 105 sayfa

Bor elementi, bitkiler için mutlak gerekli olan bir mikrobesein maddesi olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonları toksik olup, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Bu tez kapsamında, model bitki *Arabidopsis thaliana*'da sülfat uygulamaları ile bor toksitesine karşı tolerans kazanımının; 1) bazı fizyolojik, fotokimyasal ve antioksidan enzim aktiviteleri ve 2) bor alımı ile sülfat alımı/atımında rol oynayan taşıyıcılarla ilişkili genlerin ifade değişimleri araştırılması amaçlanmıştır.

Arabidopsis tohumları besiyeri ortamı içeren petri kapları içerisinde 3 gün +4°C'de karanlık koşullarda stratifikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra çimlenen tohumlar kontrollü iklim kabininde (22± 1 °C sıcaklık, 16/8 sa fotoperiyot, 200 µmol.m⁻²s⁻¹ ışık şiddeti ve %50-60 nem koşullarında) 12 gün boyunca yetiştirilmiştir. Ardından sülfat ön uygulama grupları (PS-B) 3 gün boyunca MgSO₄ tipi sülfat içeren besi yerlerine aktarılmış, 3 günün sonunda ön uygulamasız ve birlikte (S+B) uygulama grupları ile beraber farklı bor konsantrasyonları içeren (3 ve 5 mM H₃BO₃) petri kaplarına transfer edilerek 10 gün süre ile bor toksitesine maruz bırakılmışlardır.

Arabidopsis bitkisinde kökten alınıp yapraklara taşınan bor birikimine bağlı olarak, bitki biyokütlesi ve yaprak yüzey alanı anlamlı düzeyde azalmıştır.

Bunun yanı sıra, toksik bor koşullarında bitkilerin yapraklarındaki SO_4 miktarının da azaldığı belirlenmiştir. Yapraklara taşınan borun toksik seviyeleri, fotosentetik aygıtları ve fotokimyasal aktiviteyi olumsuz etkilemiştir. Bor toksisitesi, bitkilerin tilakoid membranlardaki klorofil *a* fluoreans yayılımlarında (OJIP eğrisi), spesifik ve fenomenolojik enerji akışlarında, kuantum veriminde, PSII'nin donör ve PSI'in akseptor kısımlarının etkinliğinde değişimlere neden olmuştur. Bu değişimler bitkilerin fotosentetik performanslarında azalmalara yol açmıştır. Toksik bor uygulaması ile bitkilerin fotokimyasal verimliliğindeki azalışın, tilakoid membranın bütünlüğünde bozulma, QA redükte edemeyen reaksiyon merkezindeki (inaktif RC) artış ve enerjinin ısı şeklinde yayılımı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca B toksisitesi her iki fotosistem arasındaki işbirliğini bozmuş ve PSII'in PSI'e göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Arabidopsiste bor toksisitesinin membran bütünlüğü ile anten ve reaksiyon merkezlerindeki fotosentetik pigment miktarlarını olumsuz etkilese de, bu etkinin, fotosistemlerin fonksiyonellikleri tamamen bloke edecek düzeyde olmadığı ve sülfat uygulamaları ile bu olumsuz etkilenmenin hafifletilebildiği saptanmıştır.

Arabidopsis bitkisinde, sülfat uygulamaları ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ve fenolik bileşiklerin (antosiyanın ve flavonoid) içeriğindeki artışlar, savunma sistemlerini düzenleyerek bor toksisitesine karşı tolerans sağlamıştır. Toksik bor seviyelerinde peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerindeki artışlar, oluşan oksidatif hasarlara karşı bitkiyi korumada etkin yer aldıklarını ortaya koymaktadır. İncelenen enzimlerin aktiviteleri ve fenolik bileşiklerdeki birikim sülfat ön uygulamalı gruplarda daha yüksek düzeyde bulunmuştur.

Sülfat alımı ve taşınımında ve kükürt metabolizmasında yer alan bazı metabolitlerin sentezinde görev alan genlerin oransal ifade değişimleri incelenmiştir. Bor toksisitesine karşı sülfat ön-uygulaması ile 3. grup sülfat taşıyıcılarından özellikle SULTR 3;1, SULTR 3;3, SULTR 3;5 genleri daha fazla ifade olmuştur. SULTR3 ve SULTR4 grubu genlerinin ifadelerindeki artış, ön uygulama gruplarında vakuolden sitozole geçen sülfatın, sonrasında kloroplast üzerinde lokalize olan SULTR3 taşıyıcılar ile alınarak kükürt asimilasyonuna katılmış olabileceği düşünülmektedir. Glutatyon sentez yolağının ilk ve son

basamağını katalize eden sırası ile glutamat sistein ligaz ve GSH sentaz enzimleri, GSH1 ve GSH2 genleri tarafından kodlanır ve bu genlerin uygulama gruplarında kontrole göre oransal ifade artışları B toksisitesinin glutatyon biyosentezini indüklendiğini göstermektedir.

Bitkiler, sülfat uygulamaları (zellikle sülfat n uygulaması) ile bünyesine aldığı sülfatı, ya sülfat metabolizmasında asimile ederek ya da vakuollerinde depolayarak bor toksisitesine karşı tolerans sağlamış olabilirler.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, Antioksidant enzimler, Bor toksisitesi, Fotosentetik aktivite, Gen ifadesi, Sülfat uygulamaları, Sülfat taşıyıcıları, Tolerans

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SULFUR INDUCED BORON TOLERANCE IN *Arabidopsis thaliana*

Seda YİRMİBEŞ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Yasemin EKMEKÇİ

May 2022, 105 pages

Boron (B) is a micronutrient element that is essential for plant growth and development and its high concentrations have highly toxic effect. Within the scope of this thesis, the acquirement of tolerance to boron toxicity by sulphate applications in the model plant *Arabidopsis thaliana*; 1) some physiological, photochemical, and antioxidant enzyme activities, and 2) the expression changes of genes associated with transporters that play a role in boron uptake and sulfate uptake/excretion were aimed to investigate.

After the *Arabidopsis* seeds were subjected to stratification in petri dishes containing nutrient medium (MS) for 3 days at +4°C in dark, then the germinated plants were grown in a controlled growth cabinet (22± 1 °C temperature, 16/8 h photoperiod, 200 µmol.m⁻²s⁻¹ light intensity and 50-60 % humidity) for 12 days. And then, sulphate pre-treatment groups (PS-B) were transferred to MgSO₄⁻ type sulphate-containing media for 3 days, and at the end of 3 days, combined (S+B) and un-treated application groups were transferred to petri dishes containing boron with different concentrations (3 and 5 mM H₃BO₃) to be exposed to boron toxicity for 10 days.

Plant biomass and leaf surface area decreased significantly depending on the accumulation of boron which was uptake from the root and transported to the leaves in the Arabidopsis plant. In addition, it was determined that the amount of SO_4^- in the leaves of the plants decreased under toxic boron conditions. Toxic levels of boron transported to the leaves adversely affected the photosynthetic apparatus and photochemical activity. Boron toxicity caused the changes in chlorophyll *a* fluorescence transients (OJIP curve) in thylakoid membranes of plants, specific and phenomenological energy fluxes, quantum yields, and the efficiencies of PSII's donor and PSI's acceptor sides. These changes have led to decreases in the photosynthetic performance of plants. It has been proved that the decrease in photochemical efficiency of plants with toxic boron application is associated with the thylakoid dissociation, increase in the non-QA-reducing reaction center (inactive RC), and dissipation of energy in the form of heat. In addition, B toxicity disrupted the cooperation between both photosystems, and it was determined that PSII was affected more than PSI. Although boron toxicity in Arabidopsis adversely affects the integrity of the membrane and the amount of photosynthetic pigment in the antenna and reaction centers, it has been determined that this effect is not at a level to completely block the functionality of the photosystems, and this negative effect can be alleviated by sulphate applications.

In the Arabidopsis plant, the increase in the antioxidant enzyme activities and the content of phenolic compounds (anthocyanin and flavonoid) with sulphate applications provided tolerance against boron toxicity by regulating the defense systems. Increases in peroxidase and glutathione-S-transferase activities at toxic boron levels reveal that they play an active role in protecting the plant against oxidative damage. The activities of the investigated enzymes and the accumulation of phenolic compounds were found to be higher in sulfate pre-treatment groups.

Relative expression changes of genes that synthesize some metabolites involved in sulphate uptake and transport and sulfur metabolism were investigated. Against boron toxicity, with sulfate pre-application, the 3rd group sulfate carriers, especially SULTR 3;1, SULTR 3;3, SULTR 3;5 genes, were more expressed. It is thought that the increase in the expression of the SULTR3

and SULTR4 group genes may have contributed to the sulfur assimilation by taking the sulfate from the vacuole to the cytosol in the pre-treatment groups with the SULTR3 transporters localized on the chloroplast. Glutamate cysteine ligase and GSH synthase enzymes, which catalyze the first and last step of the glutathione synthesis pathway respectively, are encoded by the GSH1, and GSH2 genes, respectively, and the relative expression increases of these genes in the treatment groups compared to the control indicate that B toxicity induced glutathione biosynthesis.

Plants may have acquired tolerance against boron toxicity by either assimilating the sulphate taken by sulphate applications (especially sulphate pre-treatment) in sulphate metabolism or by storing them in their vacuoles.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Antioxidant enzymes, Boron toxicity, Photosynthetic activity, Gene expression, Sulphate treatment, Sulphate transporters, Tolerance

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, tez danışmanlığımı üstlenerek çok hevesle çalıştığım araştırma konusunun seçiminde ve yürütülmesinde, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen ve yol gösterici yaklaşımı ile cesaretlendiren değerli danışmanım, Sayın Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ'ye,

Stres yönetimi, çalışma şekli ve düzenini kendime rol model edindiğim, tezimin her aşamasında benim için çok kıymetli önerilerde bulunan, Sayın Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK'e,

Tezimin moleküler çalışmaları kısmında yardımını esirgemeyen, Sayın Dr. Öğr.Üyesi Ceyhun KAYIHAN'a

Tezime her aşamasında sabırla yardım eden, bir abla olarak verdiği nasihatlar ile hayatımdaki yeri ayrı olan, Sayın Dr. Arş. Gör. Şeküre ÇULHA ERDAL'a

Çalışmaların sırasında kullandığım Arabidopsis tohumlarının temininde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY'a,

Bor analizimde yardımlarından dolayı Uzman Dr. Yasemin ÖZTÜRK'e

Deneyletim sırasında geç saatlere kadar benimle çalışan, kendi işleri gibi özenen, bir aile olarak gördüğüm çok sevgili laboratuvar arkadaşlarım Efe DALLI'ya, Omar NASHAT'a, Kamile Hazal TATAR'a, Cihan Ünal DEĞİRMENCİ'ye,

Tüm hayatım boyunca bana inanan, güvenen, önceliklerime kıymet veren biricik aileme,

Maddi ve manevi tüm desteğini gördüğüm, hayatıma yön vermemde benim için çokça kıymetli olan MS SPEKTRAL'e ve Oya KARA'ya,

Çalışmalarımda emeği geçen özel çalışma öğrencilerimize,

Sonsuz teşekkürler.

Seda YİRMİBEŞ,

Mayıs 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Model Organizma <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2.2. Bitki için Mikrobesein Elementi: Bor.....	8
2.2.1. Bor Alımı ve Taşınımı.....	8
2.2.2. Borun Bitkideki İşlevleri.....	11
2.2.3. Bor Toksisitesinin Bitkiler Üzerine Etkisi.....	14
2.3. Bitki için Gerekli Makrobesein Elementi: Kükürt.....	16
2.3.1. Kükürt Alınımı ve Taşınması.....	17
2.3.2. Kükürtün Asimilasyonu.....	19
2.3.3. Kükürt İçeren Başlıca Metabolitler.....	21
2.3.3.1 Sistein ve Metiyonin.....	21
2.3.3.2 Glutatyon.....	22
2.3.3.3 Fitoşelatin.....	23
2.3.3.4 Glukozinolat.....	23
2.3.4. Bitki Büyüme ve Gelişmesinde Kükürtün Rolü.....	24
2.3.5. Kükürt Aracılı Abiyotik Stres Toleransı.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Bitki Materyali.....	27
3.2. Bitki Yetiştirme Yöntemi.....	27
3.3. Ölçüm ve Analizler.....	30
3.3.1. Fizyolojik ve Biyokimyasal Ölçümler.....	30

3.3.1.1. Yaprak Yüzey Alanı Ölçümü.....	30
3.3.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle Ölçümleri).....	31
3.3.1.3. Bor ve Sülfat Miktarlarının Tayini.....	31
3.3.1.4. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi.....	31
3.3.1.5. Fotosentetik Aktivite Ölçümleri.....	32
3.3.1.6. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi.....	36
3.3.1.7. Antosiyanin ve Flavonoid Miktarının Belirlenmesi.....	36
3.3.1.8. Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	37
3.3.1.8.1. Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	37
3.3.1.8.2. Toplam Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
3.3.1.8.3. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
3.3.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri.....	37
3.3.2.1. Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonun Belirlenmesi...	37
3.3.2.2. RNA'lardan Tamamlayıcı Tek Zincirli DNA (cDNA) Sentezi...	38
3.3.2.3. Primer Tasarımı.....	40
3.3.2.4. Gerçek Zamanlı (Real Time) Ters Transkriptaz (RT) PCR.....	40
3.3.2.5. Normalize Edilmiş Gen Miktarı Hesaplanması.....	40
3.4. Veri Analizi.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. <i>A. thaliana</i> 'da Sülfat Uygulamaları ile Bor Toleransının Kazanılmasında Belirlenen Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler.....	43
4.1.1. Bitki Büyümesi ve Yaprak Alanındaki Değişimler.....	43
4.1.2. Bitki Biyokütlesindeki (Yaş ve Kuru Ağırlık) Değişimler.....	44
4.1.3. Bor ve Sülfat Miktarlarındaki Değişimler.....	46
4.1.4. Membran Bütünlüğündeki Değişimler.....	47
4.1.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarındaki Değişimler.....	48
4.1.6. Fotokimyasal Etkinlikteki Değişimler.....	49
4.1.7. Fotosentetik Pigment Miktarındaki Değişimler.....	56
4.1.8. Tolerans Kazanımında Savunma Sistemlerinin Rolü.....	57
4.1.8.1. Antosiyanin ve Flavonoid Pigment Miktarındaki Değişimler....	57
4.1.8.2. POD ve GST Enzim Aktivitelerindeki Değişimler.....	58
4.2. Sülfat ve/veya Toksik Bor Uygulamalarına Maruz Kalan <i>A. thaliana</i> Bitkisinde Sülfat ve Bor Taşınımında Yer Alan Bazı Genlerin Oransal İfade	

Değişimleri.....	59
5. TARTIŞMA.....	68
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın yaşam döngüsü (Smaczniak ve ark., 2012'dan değiştirilerek alınmıştır).....	7
Şekil 2.2.	Bor taşıma yollarına ait modeller. (A) B, plazma zarı boyunca kolaylaştırılmış difüzyon ve/veya kanallar vasıtasıyla taşınır. (B) <i>Arabidopsis</i> köklerinde NIP5;1, BOR1 ve BOR2'nin hücre tipi spesifik ekspresyon modelleri (Yoshinari ve Takano, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).....	9
Şekil 2.3.	RGII monomeri ile B'un bağlanması. İki RG-II monomeri şaperonlar aracılığıyla B ile kovalent olarak bağlanır ve B-diester bağı oluşturur (Chormova ve Fry, 2016'den değiştirilerek alınmıştır).....	12
Şekil 2.4.	<i>Arabidopsis thaliana</i> 'da sülfat alımını, taşınımını ile organlarda ve hücrelerde dağıtımını kolaylaştıran sülfat taşıyıcıları (Takahashi, 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).....	18
Şekil 2.5.	Kükürt asimilasyonunun primer veya sekonder yolları (Fuentes-Lara ve ark., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).....	21
Şekil 2.6.	Bitkilerde kükürt-aracılı abiyotik stres toleransı (Shah ve ark., 2022'den değiştirilerek alınmıştır).....	26
Şekil 3.1.	Kontrollü iklim kabininde yetiştirilen <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkileri...	29
Şekil 3.2.	Deney planı.....	29
Şekil 3.3.	A) HandyPEA cihazının genel görünümü, B) Biolyzer HP3 programında analiz görüntüsü, C) JIP-Testinin şematik bir sunumu D) Fotosentetik materyaldeki tipik polifazik klorofil a floresans yükselişi ve fotosentetik aparatındaki süreçler E) JIP-Test sonuçlarının grafiksel sunum türü (radar ve membran ile yaprak modelinde pipe-line) örnekleri (Toth ve ark., 2005; Strasser ve ark., 2010'dan modifiye edilmiştir).....	33
Şekil 3.4.	Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	38

Şekil 4.1.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz bırakılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin deneme sonundaki genel görüntüsü.....	43
Şekil 4.2.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının yaprak yüzey alanı üzerine etkisi. Veriler normal dağılımlar sergilemediğinden dolayı logaritmik dönüşüm uygulanmış ve istatistiki analiz yapılmıştır.....	44
Şekil 4.3.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının yaş ağırlık üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.4.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.5.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının bor (A) ve sülfat (B) miktarları üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.6.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının MDA içeriği üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.7.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.8.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının <i>A. thaliana</i> bitkilerinin fotosentetik aygıtlardaki klorofil a floresans transienleri (A). Klorofil floresans yayılımları kaydedilmiş ve logaritmik zaman skalasında (0.01-1 s) grafikleri çizilmiştir. O ve J basamakları arasında sırası ile 150µs ve 300µs'de oluşan L (B) ve K (C) bantları.....	51
Şekil 4.9	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamasının PSII'nin yapısal fonksiyonelliği (SFI), OEC'inde oluşan hasar durumu (V _K /V _J), eksitasyon enerjisinin kullanım etkinliği (φ _{E0} ve φ _{D0}), QA'yi indirgeyebilen reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu (RC/CS ₀) ve PSI miktarı (ΔV _{IP}) üzerine etkileri (sağdaki grafik sadece B ve PS-B uygulamaları arasındaki değişimleri netleştirmek amacı ile sadeleştirilerek çizilmiştir).....	52
Şekil 4.10.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının <i>A. thaliana</i> bitkisinin yapraklarındaki spesifik enerji akışları (birim reaksiyon merkezi başına, RC). Okların boyutları, parametrelerin oransal değerlerini ifade etmektedir. Absorblanan (ABS/RC) ve yakalanan	

	eksidasyon enerjisi (TR_o/RC), elektron taşınımı (ET_o/RC) ve fotokimya dışında kullanılan enerjisi (DI_o/RC) gösterilmiştir.....	53
Şekil 4.11.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının <i>A. thaliana</i> bitkisinin birim yaprak alanı bazında enerji akışları (CSo). Okların boyutları, parametrelerin oransal değerlerini ifade etmektedir. Absorplanan (ABS/CSo) ve yakalanan oksidasyon (TR/CSo) enerjileri, elektron transportu (ET/CSo) ve fotokimya dışında kullanılan enerjisi (DI/CSo) gösterilmektedir. Siyah noktalar inaktif, beyaz noktalar aktif RC'leri belirtilmektedir.....	54
Şekil 4.12.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının <i>A. thaliana</i> bitkisinin total fotosentetik performans indeksi ve bileşenleri üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.13.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının toplam klorofil (a+b) (A) ve karotenoid içerikleri üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.14.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının antosiyanin (A) ve flavonoid (B) miktarlarına etkisi.....	57
Şekil 4.15.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.16.	<i>A. thaliana</i> bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının GST enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.17.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 2;1</i> geninin oransal ifadesi.....	60
Şekil 4.18.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 2;2</i> geninin oransal ifadesi	60
Şekil 4.19.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 3;1</i> geninin oransal ifadesi.....	61
Şekil 4.20.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 3;2</i> geninin oransal ifadesi.....	62
Şekil 4.21.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 3;3</i> geninin oransal ifadesi.....	62
Şekil 4.22.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i>	63

	bitkisinde <i>SULTR 3;4</i> geninin oransal ifadesi.....	
Şekil 4.23.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 3;5</i> geninin oransal ifadesi.....	64
Şekil 4.24.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>SULTR 4;1</i> geninin oransal ifadesi.....	64
Şekil 4.25.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>NIP 6;1</i> geninin ifade oranları.....	65
Şekil 4.26.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>OPT6</i> geninin oransal ifadesi.....	66
Şekil 4.27.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>GSH1</i> geninin oransal ifadesi.....	66
Şekil 4.28.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkisinde <i>GSH2</i> geninin oransal ifadesi.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Bitki hücrelerindeki kükürt taşıyıcıları, lokalizasyonları ve işlevleri....	19
Çizelge 3.1.	MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin içeriği.....	27
Çizelge 3.2.	Deneme gruplarına ait rumuzlar ve açıklamaları.....	30
Çizelge 3.3.	JIP-Testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamalarının ve formüllerinin özeti (Strasser, Tsimilli-Michael ve Srivastava, 2004; Tsimilli-Michael ve Strasser, 2008; Strasser ve ark., 2010; Çiçek, Çakırlar ve Strasser, 2012; Guha ve ark., 2013).....	34
Çizelge 3.4.	Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'ların konsantrasyonları.....	39
Çizelge 3.5.	Tasarlanan primerlerin sekansları, AGI kodları ve gen adları.....	41
Çizelge 4.1.	Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarında <i>A. thaliana</i> bitkilerinin yaş (YA) ve kuru ağırlık (KA) değerlerinden hesaplanan tolerans indeksleri (Tİ).....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
m	Metre
cm ²	Santimetrekare
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
MA	Moleküler ağırlık
L	Litre
Log	Logaritma
ppm	Milyonda bir birim
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
µs	Mikro saniye

Kısaltmalar

ABS/RC	Aktif reaksiyon merkezinin verimli anten büyüklüğü
ANOVA	Varyans analizi (Analyses of variance)
AOT	Aktif Oksijen Türleri
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Siğır serum albümini (Bovine serum albumin)
DI ₀ /RC	Bir aktif reaksiyon merkezinin enerji dağılımı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ET ₀ /ABS(ϕE_0)	Elektron transportunun maksimum verimi (PHI(E ₀))
ET ₀ /RC	Reaksiyon merkezi başına elektron transportu
ET ₀ /TR ₀ (ψ_0)	Q _A '-dan elektron transport zincirine bir elektronu hareket ettirme etkinliğini
F_0	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki minimum fluoresans
F_M	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki maksimum fluoresans
F_V	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki değişken fluoresans
F_V/F_M (ϕ_{P_0})	PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği (TR ₀ /ABS)
F_V/F_0	PSII'de O ₂ oluşturan kompleksin etkinliği
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
KA	Kuru ağırlık
KATI	Kuru ağırlık tolerans indeksi
KH ₂ PO ₄	Potasyum di hidrojen fosfat
MDA	Malondialdehit
MS	Murashige ve Skoog besiyeri
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
Na ₂ EDTA	Di sodyum etilendiamin tetraasetik asit
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali

1O_2	Singlet oksijen
OH·	Hidroksil radikali
PI-PI _{abs}	Performans indeksi
PI _{top}	Toplam performans indeksi
POD	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
PVP	Polivinilpirolidon
RE ₀ /ABS (ϕR_0)	Q _A ⁻ 'dan ferrodoksine elektron transportunun kuantum verimi
RE ₀ /ET ₀ (δR_0)	İndirgenmiş sistemler arası elektron alıcılarının bir elektronu PSI son elektron alıcılarına hareket ettirme etkinliği
TA	Taze ağırlık
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

1. GİRİŞ

Bor elementi (B), iletim demetli bitkilerin büyüme ve gelişmesi için mutlak gerekli bir mikrobeseindir (Warrington, 1923). Metal ile ametal arasında (metaloit) bir özellik gösteren B dünyada az bulunmasına karşın, ülkemizin bazı bölge topraklarında toksik düzeylere ulaşabilmekte ve yüksek konsantrasyonu bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyerek verim kayıplarına neden olmaktadır.

Bor elementinin en önemli özelliklerinden biri; riboz, apioz, sorbitol vb. gibi hidroksil gruplarına sahip biyomoleküller ile güçlü kompleksler oluşturarak etkileşime girmesidir (Ralston ve Hunt 2001). Bu özelliği sayesinde bor, hücre çeperini oluşturan bir pektin polisakarit olan ramnogalanktronan II (RGII) kompleksinin yapısındaki apioz şekerlerle çapraz bağ yaparak, çepere esneklik kazandırdığı bildirilmiştir (O'Neill ve ark., 2004; Voxeur ve Fry, 2014; Funakawa ve Miwa, 2015). Wang ve ark. (2015) da bor elementinin GIPCs-RGII komplekslerine katıldığını ve bunun hücre zarı ile hücre çeperi arasında köprü oluşturulmasını sağladığını öne sürmüşlerdir. Hücre çeperindeki yapısal rolünün yanı sıra, bor bitkilerde, karbonhidrat (özellikle şeker taşınımı), askorbat ve fenol metabolizması gibi birçok metabolik yolakta önemli biyolojik işlevlere sahiptir (Lukaszewski ve ark., 1996; Landi ve ark., 2019). Bitkiler bor elementini, topraktan borik asit (H_3BO_3) şeklinde alırlar (Raven, 1980) ve alımı/atımı bitki türüne, çeşidine ve gelişim evresine bağlı olarak değişim göstermektedir (Hu ve ark., 1997).

Bitkilerde bor elementine özgün bazı taşıyıcı proteinler bulunmaktadır. Bunlardan BOR1, *Arabidopsis thaliana*'da belirlenen ilk bor taşıyıcısı olup B'un ksileme taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir (Takano ve ark., 2005). *A. thaliana*'da hücre içerisinde toksik düzeyde bulunan bor elementinin hücreden dışarıya atımından sorumlu özgün bor taşıyıcısı olan BOR4 (Miwa ve ark., 2007) ve hücre içerisindeki bor hareketlerini düzenleyen aquaporinler (Major Intrinsic Proteins, MIPs) ile Plasma Membrane Intrinsic Proteins (PIPs)'ler gibi taşıyıcı proteinler de bulunmaktadır (Pommerrenig ve ark., 2015).

Bor, bitkilerde optimum konsantrasyonu dar bir aralıkta olması nedeni ile noksanlık ve toksisite belirtileri yaygın olarak görülmektedir (Keren ve ark., 1985; Sakal ve ark., 1999). Doğal ve antropojenik süreçler (gübre, insektisit, deterjan kullanımı vb.) ile toprak ve yeraltı sularındaki bor konsantrasyonunun toksik düzeye çıkması çevresel kirliliğe neden olmaktadır (Nable ve ark., 1997). Dünyadaki bor rezervinin %73'üne sahip olan Türkiye'nin yanı sıra, Güney Avustralya, Kaliforniya ve Şili'de bulunan yarı kurak ve kurak bölge topraklarındaki toksik bor konsantrasyonları, bitki gelişimini olumsuz etkileyerek, tarımsal üretimi sınırlamakta ve verim kayıplarına yol açmaktadır (Roessner ve ark., 2006; Anonim, 2020).

Toksik B düzeyleri bitki büyüme ve gelişmesini ve fotosentetik aktiviteyi menfi yönde etkilediği ile ilgili birçok araştırma literatürde mevcuttur (Han ve ark., 2009; Öz ve ark., 2014; Ekmekçi ve ark., 2020). Toksik bor düzeylerinin bitkilerde biyokütle üretimini, klorofil içeriğini, stomatal iletkenliği ve fotosentetik performansı azalttığı, enerji ve karbonhidrat metabolizmasında değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Lovatt ve ark., 1984; Papadakis ve ark., 2004; Guidi ve ark., 2011; Landi ve ark., 2013). Bor stresinin fotosentetik etkinliği olumsuz etkilemesinin bir diğer nedeni de oksidatif stresi indüklemesidir. CO₂ asimilasyonunun sınırlanması sonucu ışık enerjisinin yakalanması ile bu enerjinin kullanımı arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak fotosistem II (PS II)'nin aşırı uyarılması reaktif oksijen türlerinin [ROT; singlet oksijen (¹O₂), süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (OH⁻) ve perhidroksil radikali (HO₂⁻)] oluşmasına neden olur. ROT'lar lipid, protein ve nükleik asitleri okside ederek hücre ölümlerine neden olabilecek membran hasarlarına yol açarlar. ROT'ların neden olduğu oksidatif zararların etkisini azaltmak için bitkiler çeşitli savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat redüktaz (APX), Glutasyon redüktaz (GR), Peroksidaz (POD), katalaz (CAT)] ve enzimatik olmayan (askorbat, karotenoidler, glutasyon, tokoferol vb.) antioksidanların bazı bitkilerde bor toksisitesini azalttığı bildirilmiştir (Güneş ve ark., 2006; Cervilla ve ark., 2007; Ardic ve ark., 2009; Han ve ark., 2009). Bu antioksidanlardan tiyol içeren bir tripeptit olan

glutasyon (GSH), hücrel redoks durumunun önemli bir düzenleyicisidir. Buna ek olarak, glutasyon metal detoksifikasyonunda metallerin alıkonulmasında, sistein formunda fazla kükürt asimilasyonunda ve depolanmasında önemli bir substrat olarak işlev görmektedir (Noctor ve ark., 2002). Glutasyon; serbest metalleri, ksenibiyotikleri ve antosiyanin gibi metabolitleri kendisine bağlayabilmektedir. Bu olay, glutasyon sülfotransferazlar (GST'ler) tarafından katalizlenmektedir. Ağır metal stresinde GST aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Skórzyńska ve ark., 2010; Bashir ve ark., 2013). Yüksek bor konsantrasyonuna maruz bırakılan buğday çeşidinde (Atay-85) GST ile ilişkili 6 genin ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Kayıhan ve ark., 2017).

Kükürt (S), bitkiler için önemli bir makro element olup, topraktan sülfat (SO_4^{2-}) iyonu şeklinde alınır. Sülfat, kükürt alım yolağında ve devamındaki kükürt metabolizmasının primer substratıdır (Takahashi, 2019). Bununla birlikte glutasyon, sistein (Cys) ve metiyonin (Met) gibi bazı amino asitler, kofaktörler, fitoşelatinler (PCs), fitoaleksiner ile primer ve sekonder metabolitler gibi özgün ve ayrıcalıklı bir çok metabolitin fonksiyonel gruplarında kükürt bulunmaktadır (Rausch ve Wachter, 2005; Foyer ve Noctor 2009; Hell ve Wirtz, 2011). Bitkiler ihtiyaç duydukları sülfatı yüksek afinite gösteren ve köklerinde bulunan özel taşıyıcılarla bünyesine alır (Bick ve Leustek., 1998). Ayrıca S homeostasisini sağlamak için özgün sülfat taşıyıcıları, spesifik organlarda, hücre tiplerinde ve hücre kompartmanlarında hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde düzenlenir (Takahashi ve ark., 2011). *Arabidopsis thaliana*'da bulunan sülfat taşıyıcıları (AtSULTR1-5) amino asit dizilimine göre 5 gruba ayrılmıştır (Buchner ve ark., 2004; Nocito ve ark., 2007). SULTR1;1 ve SULTR1;2 kök tüylerinde ifade olduğu ve sülfat alınımından birincil derecede sorumlu olduğu bildirilmiştir (Takahashi, 2019). Sülfat eksikliğinde SULTR1;1 ifade seviyesinin arttığı (Maruyama-Nakashita ve ark., 2004b) ve SULTR1;2 ifadesinin ise hem sülfat eksikliği hem de yüksek sülfat konsantrasyonlarında artış gösterdiği saptanmıştır (Yoshimoto ve ark., 2002). SULTR2 taşıyıcıları, sülfata daha düşük afinite göstermekle birlikte *Arabidopsis*'te ksilem parankimasından sürgüne sülfat taşınım miktarının

kontrolünü düzenlediği ileri sürülmüştür (Takahashi ve ark., 2000; Maruyama-Nakashita ve ark., 2015). SULTR3 taşıyıcıları ise daha çok sürgün ve yapraklarda ifade olduğu ve plastidlere sülfat alımında görev yaptığı bildirilmiştir (Kataoka ve ark., 2004b). SULTR3 ve SULTR4 alt familya üyelerinin de kökten sürgüne sülfat taşınımında rol aldığı bilinmektedir (Takahashi, 2019). Kükürt eksikliğinde ifade olan SULTR4 taşıyıcıları, kök ve gövde hücrelerinin vakuollerinde bulunan sülfat havuzlarının mobilizasyonunda işlev görürler (Buchner ve ark., 2004). Kısa amino asit dizilerinden oluşan SULTR5 taşıyıcılarının işlevi hakkında çok az bilgi mevcuttur (Shinmachi ve ark., 2010). Bu grup taşıyıcıların sülfattan çok molibden alım ve hücre içi dağılımında rol aldığı ileri sürülmektedir (Hawkesford, 2003; Buchner ve ark., 2004; Huang ve ark., 2019). Bu nedenle, toksik B koşulları altındaki Arabidopsis bitkisinde bazı sülfat taşıyıcılarının transkripsiyonel düzeyde regülasyonunun belirlenmesi oldukça önemlidir.

Yapılan birçok çalışmada kükürt ve kükürt içeren bileşiklerin abiyotik (metal, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, vb) ve biyotik (patojen vb.) çevresel streslere karşı oluşturulan savunmada önemli bir fonksiyonu olduğu bildirilmektedir (Hardulak, Preuss ve Jez, 2011; Noctor ve ark., 2012). Literatürde ağır metal ve/veya ağır metal akümülatörü olmayan bitkilere, birlikte kükürt uygulamaları ile metal toksisitesine karşı tolerans sağlanabildiği belirlenmiştir. Kadmiyum ve krom stresine karşı sülfat uygulamasının bitkiye tolerans sağladığına dair bulgular mevcuttur (Khan ve ark., 2015; Adhikari ve ark., 2018; Terzi ve Yıldız 2021). Benzer şekilde, uygun dozda kükürt uygulamasının buğday bitkisinin Mn ve Al streslerine karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Sheng ve ark., 2016). Ancak literatürde sülfat ön uygulaması ile metal toleransının kazanımı ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu bağlamda toksik bor koşullarında anotasyonu tamamlanmış model organizma *A. thaliana*'da farklı sülfat uygulamaları (ön ve birlikte) ile bor tolerans kazanımının bazı fizyolojik, biyokimyasal ve transkripsiyon düzeyinde analizler ile ortaya konulması tezin temel amacını oluşturmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda ölüm ve analizler iki aşamada gerçekleştirilmiştir:

1. Sülfat uygulamaları yapılarak toksik bor düzeylerine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, bor toksisitesine karşı tolerans fizyolojik ve biyokimyasal [fotokimyasal aktivite, biyokütle, pigment içerikleri, membran bütünlüğü, sülfat/bor birikimi ve bazı enzim aktiviteleri vb.] analizler ile karakterize edilmiştir.

2. Sülfat uygulamaları ile bor toksisitesine maruz bırakılan bitkilerde, bazı bor alımında ve sülfat alımı/atımında kritik rol oynayan taşıyıcılar ile ilgili genlerin ifade değişimleri ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

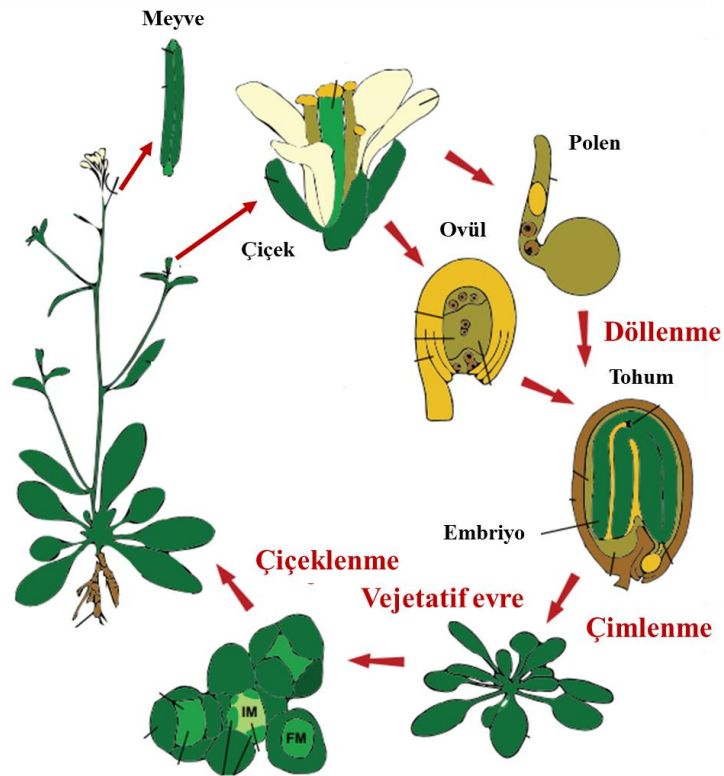
2.1. Model Organizma *Arabidopsis thaliana*

Küçük, tek yıllık, otsu ve rozet bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* (fenotu) taksonomik olarak Brassicaceae familyasında yer alır. Avrupa kıtası ile batı Asya'ya özgü olduğu kabul edilen *A. thaliana*'nın, buzul dönemi gibi geniş iklimsel ve çevresel dalgalanmalara bağlı olarak Kuzey Amerika'da, Güney Afrika'da ve hatta Doğu Asya'ya kadar göç edip yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Koch ve Matschinger, 2007; Beck ve ark., 2008; Hohmann ve ark., 2014).

Pilosella siliquosa adı ile ilk olarak Kuzey Almanya'nın Harz Dağları'nda Dr. Johannes Thal tarafından tanımlanan bu tür, 1753'te Linnaeus tarafından Species Plantarum II'de yayınlanarak bilim dünyasında yer almıştır. 1842 yılında ise Gustav Heynhold tarafından günümüzde kullanılan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh adını almıştır (Krämer, 2015). 1907 yılında Freidrich Laibach tarafından deneysel olarak ilk defa kullanılan *A. thaliana*'nın 1940'larda G.P. Rédei'nin x-ışını deneyleriyle ilk mutantları oluşturulmuştur (Somerville ve Koornneef, 2002). Ancak, *A. thaliana*'nın model organizma olarak popülaritesi 1980'lerde başlamıştır ve ardından araştırmacılar genetik çalışmaları güçlü moleküler biyoloji yöntemleriyle başarılı bir şekilde birleştirmeye başladığında ise bu türün popülaritesi ve kullanımı hızla ivme kazanmıştır. *Arabidopsis*'in kapsamlı ilk genetik haritasının yayınlanması ile birlikte küçük genoma sahip olduğunun keşfedilmesi, devamındaki yeni mutant eldesi, gen aktarımı ve klonlama çalışmalarının hızlı bir şekilde ilerlemesini sağlamıştır (Koornneef ve ark., 1983; Leutwiler, Hough-Evans ve Meyerowitz 1984; Chang ve Meyerowitz, 1986; Lloyd ve ark., 1986). 125 MB çiftine sahip 5 kromozumlu küçük genomunun yanı sıra, kısa yaşam döngüsü, kendi kendini dölleyebilmesi, farklı koşullara adaptasyonu, tohumlarının verim düzeyinin yüksek olması; *Arabidopsis thaliana*'nın evrensel referans bir bitki olarak birçok alanda kullanımı açısından elverişli bir model bitki olduğunu ortaya koymuştur (Feldmann ve Goff, 2014; Kayihan, 2018).

Kumlu, taşlı veya sıg toprakların bulunduğu yerlerde yetişebilen öncü bitkilerden biri olan *A.thaliana*, çayır ve orman habitatlarında yaygın olarak kolonize olmaktadır. (Mitchell-Olds ve Schmitt, 2006). *A.thaliana*, yaklaşık 6 haftalık kısa bir hayat döngüsüne sahiptir ve vejetatif gelişim evresinde rozet evrede eni 2cm'den başlayarak 10 cm'e kadar genişler. Rozet evrenin devamında ise gövdesi 15-20 cm'e kadar uzayabilmektedir. Arabidopsis çiçeğinin periantı dörder adet sepal ve petal içerir ve korollası beyaz renktedir. Ayrıca bitki meyveleri silikva tipinde olup çok sayıda tohum içerir (Şekil 2.1) (Smaczniak ve ark., 2012).

2000 yılında Arabidopsis referans genom dizisi, çiçekli bir bitkinin ilk nükleer genomu olarak yayınlanmıştır (Somerville ve Koornneef, 2002; Koornneef ve Meinke, 2010).



Şekil 2.1. *Arabidopsis thaliana*'nın yaşam döngüsü (Smaczniak ve ark., 2012'dan değiştirilerek alınmıştır).

Arabidopsis ile ilgili tüm genomik bilgilere ulaşımı sağlayan kaynak Arabidopsis Bilgi Kaynağı (TAIR - The Arabidopsis Information Resource,

<http://www.arabidopsis.org/>)'dır ve bu kütüphane Arabidopsis Biyolojik Kaynak Merkezi'ne (ABRC-The Arabidopsis Biological Resource Center) bağlıdır.

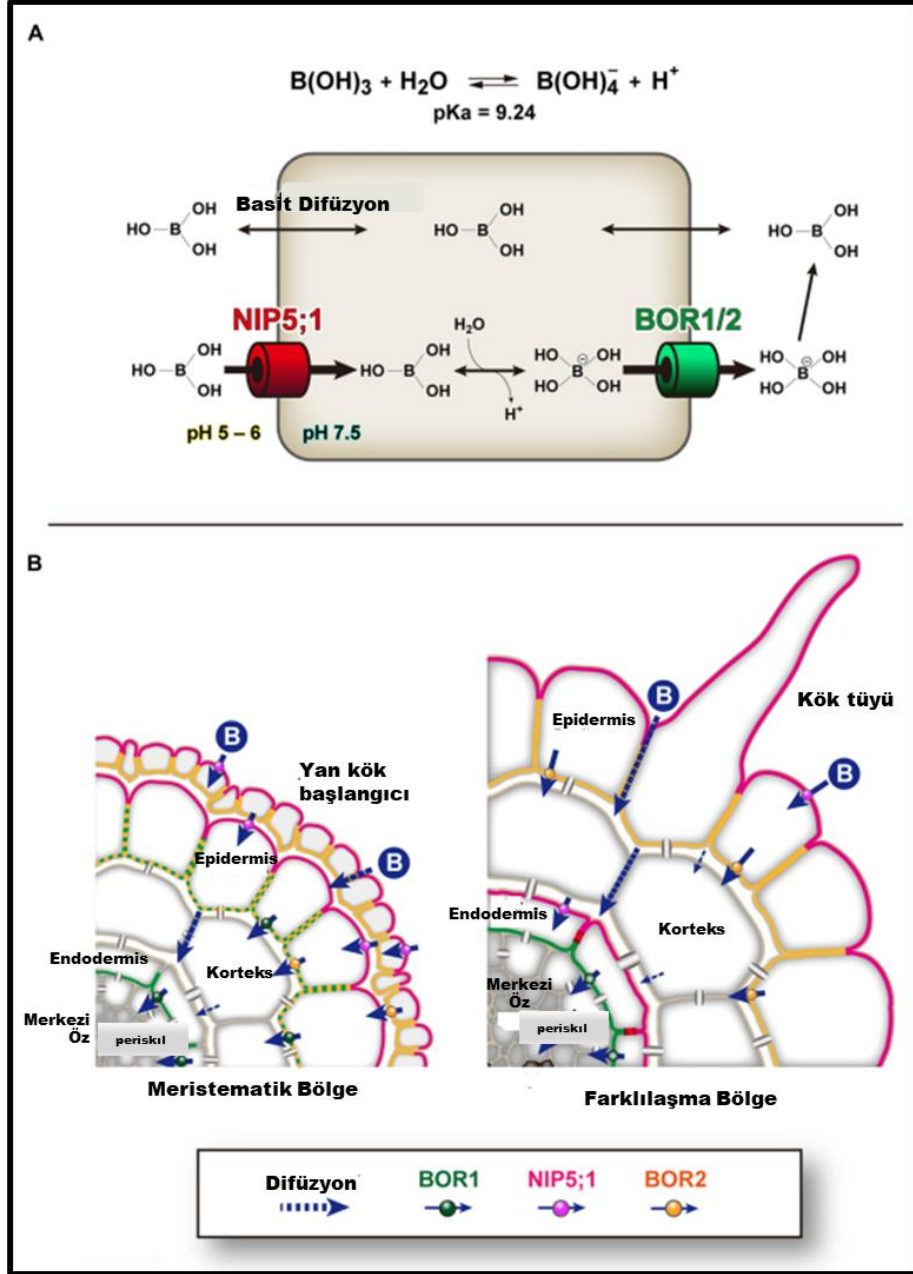
2.2. Bitki için Gerekli Mikrobesein Elementi: Bor

Periyodik cetvelin 3A grubunun en hafif üyesi olan Bor (B) metaloid (yarı metal) özelliğe sahip bir elementtir (Tariq ve Mott, 2007). Doğada serbest halde bulunmayan ve toprakta düşük miktarda bulunan B elementi, toprak pH'sına bağlı olarak bitkiler tarafından borik asit (H_3BO_3) veya borat $[B(OH)_4^-]$ formunda alınır (Klochko ve ark., 2006; Pereira ve ark., 2021). Yağış oranının yüksek olduğu bölgelerde, topraktaki organik madde içeriğinin az olması ile birlikte pH'sının düşük olması bu toprakta yetiştirilen bitkilerde B eksikliğine neden olur (Güneş ve ark., 2006; García-Sánchez ve ark., 2020). Öte yandan; topraktaki bor içeriği doğal etmenler (kurak ve yarı kurak bölgelerde yüksek B düzeyine sahip yeraltı suyunun evaporasyonu sonucu toprakta B birikimi) veya antropojenik etkilere (madencilik, sulamada bor içeriği yüksek suların kullanılması, yanlış drenaj ve gübreleme stratejileri gibi) bağlı olarak toksik düzeylere ulaşabilir (Eraydın, 2000; Hua ve ark., 2021).

2.2.1. Bor Alımı ve Taşınımı

Bitkiler B'u topraktan genel olarak H_3BO_3 (borik asit) halinde alırlar ve pH 5.5 ile 5.7 arasında toprakta B genel olarak bu formda bulunur (Hua ve ark., 2021). Bitki hücrelerinde ise B, çoğunlukla H_3BO_3 formunda bulunurken az miktarda ise (borat anyonu $[B(OH)_4^-]$) olarak yer alır (Landi ve ark., 2019). Yaklaşık pH 7.0 ile 7.5 arasını ifade eden sitoplazmik pH'da zayıf bir asit olan H_3BO_3 fizyolojik koşullar altında, membranların lipid tabakasından serbestçe geçebilir (Şekil 2.2A). Ayrıca her iki B formu da (H_3BO_3 ve $[B(OH)_4^-]$) çeşitli şekerler ve cis-hidroksil gruplarına sahip bazı bileşiklerle kompleksler de oluşturmaktadır (Princi ve ark., 2016; Matthes, Robil ve McSteen, 2020).

Bor taşınması ve homeostazı, esas olarak plazma zarı (PM) boyunca üç farklı taşıma mekanizmasına dayanır (Şekil 2.2). Birincisi, lipid çift katmanları arasında yüksüz borik asidin basit difüzyonudur.



Şekil 2.2. Bor taşıma yollarına ait modeller. (A) B, plazma zarı boyunca difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon ve/veya kanallar vasıtasıyla taşınır. (B) Arabidopsis köklerinde NIP5;1, BOR1 ve BOR2'nin hücre tipi özgün ifade modelleri (Yoshinari ve Takano, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

İkincisi, MIP (Major Intrinsic Protein) kanalları yoluyla borik asidin kolaylaştırılmış difüzyonudur (Örn; Arabidopsis NIP5;1 gibi). Üçüncüsü ise borat taşıyıcıları vasıtasıyla B'un taşınımıdır (Örn; Arabidopsis BOR1 ve BOR2 taşıyıcıları gibi) (Şekil 2.2) (Yoshinari ve Takano,2017; Brdar-Jokanović, 2020).

Borik asit kanalları, borik asidi fizyolojik koşullar altında hücrelere taşır. Nispeten yüksek pH'ya sahip sitoplazmada borik asit, borat anyonuna ayrışır ve elektrokimyasal gradiyent yönünde borat taşıyıcıları tarafından hücreden dışarı taşınır. Düşük bir pH'ya sahip olan apoplastta, borat anyonu hızla borik aside dönüştürülür ve böylece B taşıyıcıları, hücre içi ile dışı arasında borik asidin gradiyentini oluşturabilir (Yoshinari ve Takano, 2017). Bunun yanı sıra, B'un yeterli olduğu koşullarda bitkilerin B'un alımında ve taşınımında genel olarak pasif ve/veya kolaylaştırılmış difüzyon yolunu tercih ettiği bildirilmiştir (Tanaka ve Fujiwara, 2008). B'un kolaylaştırılmış difüzyonunda görev alan MIP kanalları beş alt-sınıf/aile içerir ve hücre zarından küçük moleküllerin geçirgenliğini artırmada rol almaktadır. MIP kanallarından biri olan Nodulin benzeri protein (NIP)'ler B taşınımında görev alan 3 alt sınıfa (NIP I, NIP II ve NIP III) sahiptir. Bunlardan NIP II ve NIP III'ün fizyolojik rolü aydınlatılabildiği ve bu sınıflarda yer alan kanallar borik ve salisilik asit için özelleşmiş kanallar olarak ifade edilmektedir (Takano ve ark., 2006). *Arabidopsis thaliana*'da tanımlanan NIP II proteinleri; NIP5;1, NIP6;1 ve NIP7;1'dir (Tanaka ve ark., 2008; Routray ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar NIP'lere ek olarak MIP ailesinde yer alan X Integral protein (XIP)'lerinin de B taşınımında rol aldığı fikrini güçlendirmektedir (Bienert ve ark., 2019). Hücre membranlarında yer alan B taşıyıcıları borat tipi taşıyıcılar olup filogenetik analizlere göre iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta düşük B koşullarında görev yapan bor taşıyıcıları yer alır ve bu grup için *A. thaliana*'da AtBOR1 (kökten ksileme B'un taşınım) ve AtBOR2 (kök hücreleri dağılımı) ile pirinçte OsBOR1 örnek olarak verilebilir. İkinci grupta toksik B koşullarında rol oynayan ve toleransta görev alan taşıyıcılar bulunur ve bu grup için de *A. thaliana*'da AtBOR4 (kök hücrelerinden B'un atılımı) ile arpada Bot1 örnek olarak gösterilebilir (Takano ve ark., 2002; 2010; Miwa, Aibara ve Fujiwara, 2014; Wakuta ve ark., 2015; Onuh ve Miwa, 2021).

Kökler tarafından alınan B'un, sürgüne transpirasyon akışıyla birlikte ksilem hücreleri aracılığıyla taşınabildiği gibi floem ile de taşınabildiğini yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. B, ksilem aracılığıyla taşındığında transpirasyonun yüksek olduğu olgun yapraklara iletilirken; floem aracılığıyla taşındığında ise

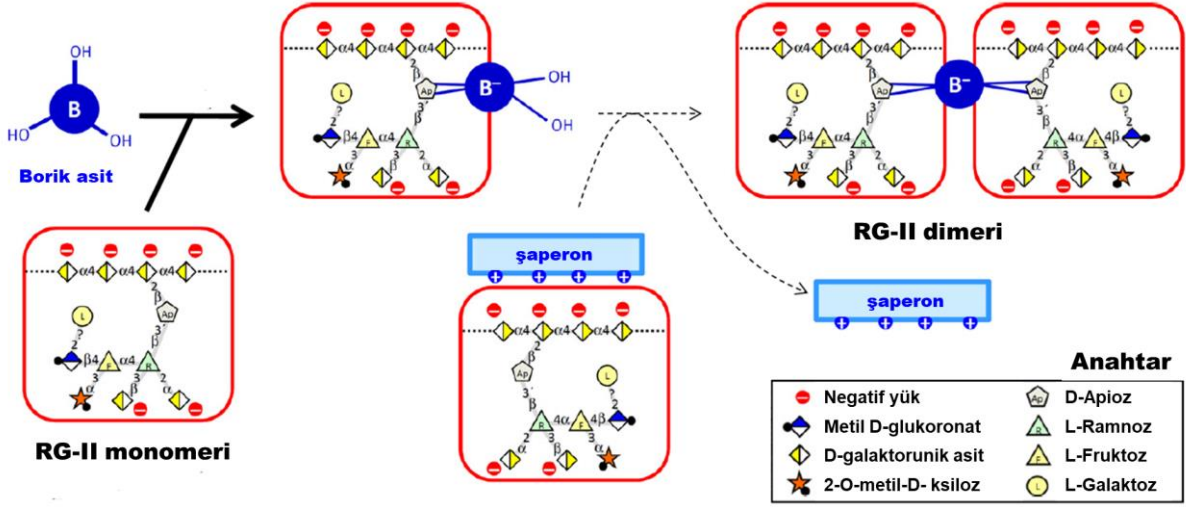
genç yapraklar ve meyveler gibi aktif gelişim gösteren dokulara taşınmaktadır (Brown ve Shelp, 1997; Camacho-Cristóbal, Rexach ve González-Fontes, 2008). B'un floemde taşınım esnasında mannitol ve sorbitol gibi *cis*-hidroksil gruplarına sahip şeker alkoller ile stabil bir poliol-B kompleksi oluşturarak taşındığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Reid ve ark., 2004; Landi ve ark., 2019).

2.2.2 Borun Bitkideki İşlevleri

B, bitkilerde çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan mutlak gerekli bir mikrobesein elementidir. B elementinin en önemli görevi ise, hücre çeperinde yapısal olarak yer alması ve plazma zarı işlevlerinin sürdürülmesini sağlamasıdır (Brown ve ark., 2002; Wimmer ve ark., 2009). Bununla birlikte B, meristematik dokuların büyümesi, polen çimlenmesi, hücre bölünmesi, zarların fonksiyonu ve asimilasyon ürünlerinin taşınımı için gereklidir (Atique-ur-Rehman ve ark., 2018). Ayrıca nükleik asit, azotlu bileşikler ve fenol metabolizmasında, şekerlerin taşınması, hormonların sentezi ve taşınımı, enzimlerin aktivitesi ile lignin sentezinde rol oynadığı bildirilmektedir (Landi ve ark., 2019; Brdar-Jokanović, 2020).

B, hücre çeperinin hayati bileşenlerinden biri olan rhamnogalakuronanlar II (RG-II) ile B-diester bağları vasıtasıyla çapraz bağlar oluşturur (Şekil 2.3). Borat anyonu, RG-II'nin apioz kalıntıları ile oluşturduğu çapraz bağ aracılığı ile pektik ağın üç boyutlu yapısına katkıda bulunur ve oluşan bu kompleks hücre çeperinin stabilizasyonunda rol oynar (O'Neill ve ark., 2004; Bar-Peled ve ark., 2012). Hücre çeperinin oluşumu ve genişlemesi için hayati öneme sahip B ve RG-II kompleksindeki küçük yapısal değişiklikler kararlılığını etkileyebilir; bu nedenle, kompleks oluşumu için B'un RG-II'ye göre oranının daha yüksek olması gereklidir (Goldbach ve Wimmer 2007; Durbak ve ark., 2014). RG-II grupları, B-diester bağı sayesinde pektin polisakkarit zincirleri için bağlantı bölgeleri sağlamaktadır. B eksikliği durumunda bu bağlanma bölgeleri etkilenmektedir ve hücre çeperlerinin pektini tutma yeteneği azalmaktadır. Ayrıca, bu koşullarda hücre çeperindeki porların boyutu artar, bununla birlikte uzama fazına geçildiğinde ise hücre ölümü gerçekleşmektedir (Kobayashi ve ark., 1997; Fleischer ve ark., 1999). Bu nedenle B, hücrelerin birbirine yapışması, hücre

çeperi bütünlüğünü korunması ve hücre çeperi altyapısını oluşturması açısından büyük öneme sahiptir (Bassil ve ark., 2004; Wang ve ark., 2015; Landi ve ark., 2019).



Şekil 2.3. RGII monomeri ile B'un bağlanması. İki RG-II monomeri şaperonlar aracılığıyla B ile kovalent olarak bağlanır ve B-diester bağı oluşturur (Chormova ve Fry, 2016'den değiştirilerek alınmıştır).

B, hücre çeperinin yanı sıra hücre zarındaki enzimlerin ve diğer proteinlerin işlevleri ile birlikte hücre zarının bütünlüğünün korunmasında ve zar boyunca taşınmanın düzenlenmesinde de önemli role sahiptir (Çakmak ve Römheld 1997; Goldbach ve ark., 2001; Goldbach ve Wimmer 2007). Bor eksikliği, hücre zarı boyunca proton gradiyenti oluşturmak için proton pompalayan H⁺-ATPaz aktivitesini artırarak ve hücre zarına bağlı oksidoredüktaz aktivitesini inhibe ederek zar potansiyelinin düzenlenmesini etkiler (Blaser-Grill ve ark., 1989; Wimmer ve ark., 2009). Buna bağlı olarak B eksikliğinin iyon akışında neden olduğu değişimler membran sızıntısını tetikler (Çakmak ve Römheld, 1997). Ayrıca B'un hücre zarının işleyişinin stabilizasyonu ve bütünlüğü için gerekli olmasının bir diğer nedeni ise glikolipidlerin bağlanmasındaki rolüdür (Brown ve ark., 2002; Atique-ur-Rehman ve ark., 2018).

B, eksikliğine veya toksisitesine bağlı olarak etkilenen ana metabolik yollardan birisi de fotosentezdir. Hücre zarındaki enzimlerin ve proteinlerin işlevlerinde görev alması nedeniyle B, kloroplast tilakoidlerin de yapısının ve

işlevinin korunmasında rol oynar. Bu nedenle B fotosentezin ışık reaksiyonlarında; ışığın absorpsiyonu, PSI ve PSII'nin aktiviteleri, suyun parçalanması ve elektron aktarımını içeren tüm aşamalarında önemli bir role sahiptir (Çakmak ve Römhald 1997; Kastori ve ark., 1995; El-Shintinawy 2000; Wang ve ark., 2007; Pandey ve Pandey 2008; Shah ve ark., 2017; Choudhary ve ark., 2021). Ayrıca, bitkilerin B eksikliğinde yapraklardaki stoma sayısı ile boyutunun azaltarak CO₂ iletkenliğini düşürdüğü belirlenmiştir ve bu durum B'un stoma yapısında da önemli role sahip olduğunu ortaya koymuştur (Sharma ve Ramchandra, 1990). Ayrıca fotosentez sonucu sentezlenen ürünlerin floem aracılı taşınımında rol oynaması nedeniyle B, fotosentezi dolaylı yoldan da etkilemektedir (Brdar-Jokanović, 2020). B eksikliğinde sakkarozun floemden taşınımının azalması nedeniyle geri-besleme mekanizması devreye girmesi sonucu stomatal iletkenlik ve CO₂ asimilasyonu sınırlandırılmasına bağlı olarak içsel CO₂ konsantrasyonu artar. Bu durum fotosentezin aktivitesini inhibe edebilecek düzeyde ROT sentezinin artışını tetiklemektedir (Han ve ark., 2009; Wimmer ve Eichert 2013; Landi ve ark., 2019). Bunların yanı sıra, B eksikliğinde yaprak alanının azalması ve yapraktaki yapısal bozulmalar nedeniyle de fotosentez hızı azalmaktadır (Dell ve Huang 1997; Wang ve ark., 2007).

B'un sakkaroz ile oluşturduğu kompleks fotosentezin yanı sıra şeker taşınımını da önemli yönden etkilemektedir. Şeker-borat kompleksi, şeker taşınımının ayrılmaz bir bileşeni olduğu için B tarafından gerçekleştirilir (Dordas ve Brown 2000). Bu taşınım ile fotosentez ürünleri kullanılmak üzere kaynaktan havuza iletilir ve bu nedenle B, havuzun kapasitesinin düzenlenmesinde ana role sahiptir. B eksikliği köklerde ve sürgünlerde fotosentez ürünlerinin dağılımını değiştirerek havuz kapasitesini azaltması nedeniyle, fotoasimilatların kaynaktan havuza taşınımını sınırlandırır (Dugger 1983; Çakmak, Kurz ve Marschner, 1995). Buna bağlı olarak yapraklarda şeker birikir (Kastori ve ark. 1995). Bu durum gövde ve yeni yaprak oluşumu ile çiçek ve meyve gibi büyüyen bölgelere asimilasyon ürünlerinin translokasyonunun azalmasına neden olur (Dixit, Srivastava ve Sharma, 2002; Yoshinari ve Takano 2017). Bu bulgular, floem aracılı taşınımın hem şekerlerin taşınmasında hem de yapısal bileşen olarak ihtiyaç duyulan B'u karşılanmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Hellal ve ark., 2009; Hussain ve ark., 2012). Ayrıca B'un N metabolizması üzerinde de etkili

olduğu belirlenmiştir. B eksikliğinde, amino asit [glutamin, alanin, asparagin]'lerin taşınımının sınırlandırıldığı bildirilmiştir (Shelp, 1990)

2.2.3. Bor Toksisitesinin Bitkiler Üzerine Etkisi

Bitkilerin büyüme ile gelişmesinde gerekli bir mikrobeselementi olan B'un miktarı toprağın türüne, organik gübre miktarına ve yağışa bağlı olarak 10 ile 300 kg⁻¹ arasında değişmektedir (Ozturk ve ark., 2010; Kayıhan ve ark., 2016). Toksikite durumu genellikle toprakta veya sulama suyunda B miktarlarının yüksek olduğu yarı kurak ve kurak ortamlarda ortaya çıkar (Nable, Bañuelos ve Paull, 1997; Çatav ve ark., 2018). Aşırı B'a maruz kalan bitkilerde olgun yaprakların kenarlarında ve uçlarında bulunan, klorotik ve/veya nekrotik lekeler en yaygın görülen semptomdur. Bunun yanı sıra, B toksisitesine bağlı olarak hücre çeperinde meydana gelen yapısal bozulmalara, yaprak kıvrılmalarına ve yüzey alanında azalmalara neden olur. Morfolojik olarak gözlenen bu semptomlar B toksisitesini belirlemedeki en belirgin belirteçlerdir (Nable, Bañuelos ve Paull, 1997; Reid ve Fitzpatrick, 2009b; Choudhary ve ark., 2021). B'un yoğun olarak transpirasyon vasıtasıyla ksilemde taşındığı bitki türlerinde ortaya çıkan semptomlar olgun yapraklarda lateral damarlar arasında ortadan uca doğru oluşmaktadır. Bununla birlikte B'un floemde de yoğun olarak taşındığı elma, armut gibi B-mobil bitki türlerinde ise B toksisitesinin öncelikli olarak gelişen dokuları etkilemektedir. Bu etkiler; meyvelerde yapısal bozulmalar, yeni yapraklarda sararmalar ve lekelenmeler, floemdeki kambiyal dokularda yapısal hasarlar ve kök gelişiminde aksaklıklar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Archana ve Verma, 2017; Landi ve ark., 2019).

Toksik B konsantrasyonu bitkilerde aşağıda belirtilen çok sayıda fizyolojik ve metabolik süreçte değişikliklere neden olur:

- i) B toksisitesine bağlı olarak ortaya çıkan fotosentetik alanda ve klorofil içeriğinde azalma, su alımının sınırlandırılmasına bağlı olarak ABA sentezinin artışı ve stomaların kapaması sonucu CO₂ kullanım etkinliğinin azalması, ve bununla birlikte fotosentezin ışık veya karbon reaksiyonlarında görev alan rubisko aktivaz, ATPaz, karboksilaz, oksijenaz gibi proteinlerde yapısal bozulmalar ışığın yakalanmasında ve elektron taşıma sistemine iletiminde

aksaklıklara veya engellemelere neden olur. Bu durum fotosentezin verimliliğini olumsuz etkileyerek fotoinhibisyonu tetiklemektedir (Chen ve ark., 2014; Macho-Rivero ve ark., 2017; Papadakis ve ark., 2018; Ekmekçi ve ark., 2020). Ayrıca B'un ışık reaksiyonları sonucu sentezlenen ATP ve NADPH'ye bağlanması Calvin-Benson döngüsünde karbonhidrat sentezini de sınırlandırmaktadır (Kayıhan ve ark., 2017; Landi ve ark., 2019).

- ii) Hücrelerde B toksisitesine bağlı olarak hücresel solunum, fotorespirasyon ve fotosentezdeki elektron taşınımı bozulur. Bu durumda kullanılmayan elektronlar ve ışık enerjisi, moleküler oksijeni oksitleyerek çeşitli reaktif oksijen türlerinin [ROT, süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi] aşırı üretimine neden olur. ROT'ların aşırı üretimi nükleik asitler ve proteinlerde yapısal bozulmalara ve lipidlerde peroksidasyonlara neden olan oksidatif stresi tetiklemektedir (Molassiotis ve ark., 2006; Gill ve Tuteja, 2010; Choudhary ve ark., 2021; Hua ve ark., 2021). Bitki türüne bağlı olarak sentezlenme düzeyi değişmekle birlikte enzimatik olmayan antioksidanlar (glutatyon, askorbat, fenolik bileşikler ve prolin gibi) ile süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi enzimler serbest radikallerin detoksifikasyonunu sağlayarak savunma mekanizmasında görev alırlar (Cervilla ve ark., 2007; Giansoldati ve ark., 2012; Acar, İşkil ve Erden, 2018; Pandey ve ark., 2019; Hua ve ark., 2021).
- iii) Toksik B düzeyleri hücre çeper yapısını bozarak membranın geçirgenliğini etkilemektedir. Ayrıca hücre çeperinde süberin ve lignin birikimini tetiklemektedir (Simón ve ark., 2013; Landi ve ark., 2019)
- iv) B toksisitesi, köklerden alınan nitratı kök ve yapraklarda nitrite indirgeyen nitrat redüktaz enzimlerinin aktivitesini engelleyerek ve/veya hücre zarında yer alan H-ATPaz aktivitesini etkileyerek azot metabolizmasını inhibe edebilmektedir (Mahboobi, Yücel ve Öktem, 2002; Princi ve ark., 2013)
- v) Toksik B düzeylerinde fotosentezdeki sınırlanmalara bağlı olarak glikoz sentezinin azalışını nişasta sentezinin azalması takip eder. Ancak, bazı bitki türlerinde kök ucunda yer alan invertaz aktivitesinin indüklenmesine bağlı

olarak indirgeyici şekerlerin (glikoz ve früktoz) miktarında arttığı bildirilmiştir. Bu değişimler karbonhidrat metabolizmasını olumsuz etkilemektedir (Choi ve ark., 2007; Princi ve ark., 2013).

vi) B toksisitesinin azot ve karbonhidrat metabolizmasında neden olduğu aksaklıklar etilen ve jasmonik asit gibi yaşlanma ile ilgili hormonların sentezini artırarak erken yaşlanmayı da tetiklemektedir (Papadakis ve ark. 2018; Brdar-Jokanović, 2020).

2.3. Bitki için Gerekli Makrobesin Elementi: Kükürt

Kükürt (S), Dünya'da en bol bulunan elementlerden birisi olup canlılar için mutlak zorunlu bir elementtir. Bitkilerde ise S miktarı türler arasında, kuru ağırlığın %0.1 ile %6 (0.03 ila 2 mmol g⁻¹ kuru ağırlık) şeklinde değişen oranında bulunmaktadır (Nakai ve Maruyama-Nakashita, 2020). S, oksijen (O), selenyum (Se), tellür (Te) ve polonyum (Po) elementleri ile birlikte periyodik tablonun VIA grubunda yer alır ve doğal olarak dört izotopu mevcuttur (32S, 33S, 34S ve 35S). Kükürt, +6 ila -2 arasında değişen oksidasyon durumlarında bulunmaktadır ve en fazla bulunan okside formu, bitkilerinde topraktan absorbe ettikleri sülfattır (SO₄²⁻) (Maruyama-Nakashita, 2017).

Dünyanın S depoları litosfer, hidrosfer, atmosfer ve biyosferde bulunmaktadır. İnsan faaliyetleri, litosferden (fosil yakıtların yakılması, elemental S ve metallerin madenciliği) ve biyosferden (topraktan organik maddenin oksidasyonu ve biyokütlenin yakılması) kükürt salınımına neden olur. Bu antropojenik kükürt, küresel döngüye atmosfere salınan SO₂ biçiminde dahil olmaktadır (Aarabi ve ark., 2020). Karasal ile sucul alanlar arasında; atmosferden (SO₂, COS, H₂S, DMS ve CS₂), aerosollerden (esas olarak oksijenin oksidasyonundan kaynaklanan SO₄²⁻) veya karadan okyanusa doğru geçen bölgelerden sabit bir S akışı vardır. Ayrıca sürekli toprak işleme ve tekrarlanan ekimler toprakta organik maddenin oksitlenmesine neden olur ve bu durum S depolarının azalmasını tetikler; buna bağlı olarak gübrelerle birlikte S'nin düzenli olarak uygulanması tavsiye edilmektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2018; Fuentes-Lara ve ark., 2019).

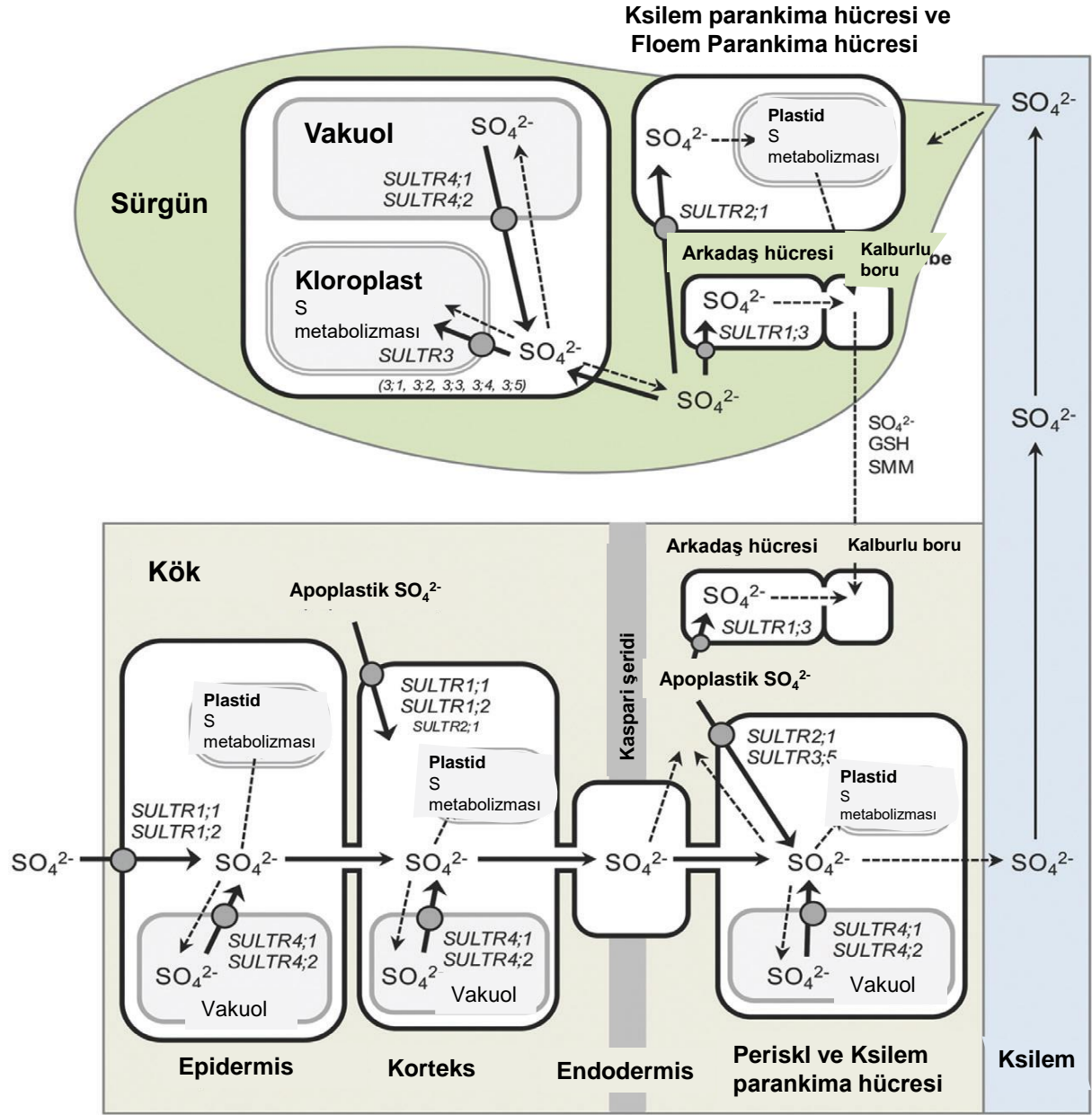
Bitkilerin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan S'ü topraktan alabilmesi için yapılan gübreleme de yaygın olarak amonyum sülfat, amonyum tiyosülfat, magnezyum sülfat, potasyum magnezyum sülfat, amonyum fosfat sülfat, potasyum sülfat, kalsiyum sülfat (alçıtaşı), demir piritler, tek süperfosfat ve elemental kükürt kullanılır (Scherer, 2001; Singh ve Middendorf, 2007). Bu S gübrelere, tohum ekiminden önce veya sonra, vejetatif veya çiçeklenme döneminde ya da bitki türüne ve bitkinin özel gereksinimlerine bağlı olarak besin çözeltisi ile yaprak yüzeyine veya direkt toprağa uygulanır.

2.3.1. Kükürtün Alınımı ve Taşınması

Bitkiler tarafından S, sülfat (SO_4^{-2}) iyonları şeklinde topraktan kökleri vasıtasıyla veya SO_2 ve H_2S formunda atmosferden yaprakları aracılığıyla alınır (Şekil 2.4) (Rennenberg, Schneider ve Weber, 1996; Fageria ve ark., 2009; Davidian ve Kopriva 2010). Ayrıca bitkiler S'ü toprak çözeltisinden S içeren amino asitler, elementel kükürt ve organik SO_4^{-2} gibi organik formlarda da alabilirler. Devamında ise SO_4^{-2} iyonları dokulara floem yoluyla aktarılır ve bir H^+ / SO_4^{-2} simporteri aracılığıyla hücre zarından aktif taşıma ile hücre içerisine alınır. Bunun yanı sıra, H^+/SO_4^{-2} simporteri SO_4^{-2} 'in kloroplasta da taşınmasına aracılık eder. SO_4^{-2} iyonlarının sitoplazmadan vakuole taşınımı ise elektriksel gradyente bağlı olarak gerçekleşir (Hawkesford, 2003; Mazid, Khan ve Mohammad, 2011).

Organlara, hücre tiplerine ve hücre altı bölümlerine göre hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde ifade edilen birçok sülfat taşıyıcıları (SULTR'ler) bulunmaktadır. Ortamdaki S varlığına ve konsantrasyonuna göre taşıyıcıların fonksiyonu ve ilgili genlerin ifadesi değişmektedir (Takahashi ve ark., 2011). Bitkilerin çoğunda, protein dizilerindeki benzerliklere göre sülfat taşıyıcısını kodlayan genler, SULTR1'den SULTR5'e kadar sınıflandırılmıştır. SULTR5 grubunun molibden alımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Shinmachi ve ark., 2010). SULTR ailesinin iyi bir şekilde karakterize edildiği bitki türü *Arabidopsis thaliana*'dır (Şekil 2.4). *Arabidopsis thaliana*'da 14 SULTR geni ve dört taşıyıcı grubu vardır. İlk grup yüksek afiniteye sahip olup kökün epidermis ve korteksinde bulunurken; ikinci grup düşük afiniteye sahip olup vasküler dokuda yer alır. Üçüncü grup taşıyıcıları ise plastid membranlarda lokalize iken;

dördüncü grubun vakuolde yer aldığı düşünülmektedir (Hawkesford, 2003; Buchner, Takahashi ve Hawkesford 2004; Maruyama-Nakashita ve ark., 2004a).



Şekil 2.4. *Arabidopsis thaliana*'da sülfat alımını, taşınımını ile organlarda ve hücrelerde dağıtımını kolaylaştıran sülfat taşıyıcıları (Takahashi, 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).

Bunun yanı sıra, S eksikliği koşullarında hücre zarında lokalize olan yüksek afiniteli sülfat taşıyıcılarının rizosfer ile temas halinde olduğu ve kök sistemi yoluyla sülfatın alınmasını kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Yoshimoto ve ark., 2002).

Arabidopsis thaliana'daki sülfat taşıyıcıları dağılımları dört grup olarak kategorize edilmektedir: Grup 1'de SULTR1;1, 1;2 ve 1;3, Grup 2'de SULTR2;1 ve 2;2, Grup 3'de SULTR3;1, 3;2, 3;3, 3;4 ve 3;5 ve Grup 4'de ise SULTR4;1 ve 4;2 yer almaktadır (Buchner, Takahashi ve Hawkesford 2004; Takahashi 2019). Bitki hücrelerinde kükürt taşıyıcılarının yeri ve rolü Çizelge 2.1'de verilmiştir

Çizelge 2.1. Bitki hücrelerindeki kükürt taşıyıcıları, lokalizasyonları ve işlevleri

Gruplar	Taşıyıcılar / taşıyıcı genler	Lokalizasyon	İşlevleri	Referanslar
1	SULTR1;1	Epidermis, kök tüyleri ve korteks	Sülfat formunda kükürt alımı	Takahashi ve ark. (2000)
	SULTR1;2	Kök tüyleri, epidermis ve korteks	Sülfat formunda kükürt alımı	Shibagaki ve ark. (2002)
	SULTR1;3	Floem dokusu, sürgün ve kök	Farklı organlara kükürt taşınması	Yoshimoto ve ark. (2003)
2	SULTR2;1	Hem kök hem de sürgünün ksilemve floem parankiması	Yaprak dokusuna sülfat dağılımı	Takahashi ve ark. (2000)
	SULTR2;2	Floem arkadaş hücreleri	Sülfür asimilasyon bölgesine sülfat transferi	Takahashi ve ark. (2000)
3	SULTR3;1	Kloroplast	Kloroplastlarda sülfat alımı	Cao ve ark. (2013)
	SULTR3;2	Yaprak	Kloroplastlarda sülfat alımı	Cao ve ark. (2013)
	SULTR3;3	Yaprak	Kloroplastlarda sülfat alımı	Cao ve ark. (2013)
	SULTR3;4	Plastidler	Kloroplastlarda sülfat alımı	Zhang ve ark. (2021)
	SULTR3;5	Kök	Kloroplastta sülfat alımı Kökten sürgüne taşıma	Zhang ve ark. (2021)
4	SULTR4;1	Tonoplast, kök ve sürgün	Kökten sürgüne sülfat taşınmasının düzenlenmesi	Huang ve ark. (2018)
	SULTR4;2	Tonoplast, kök ve sürgün	Kökten sürgüne sülfat taşınmasının düzenlenmesi	Huang ve ark. (2018)

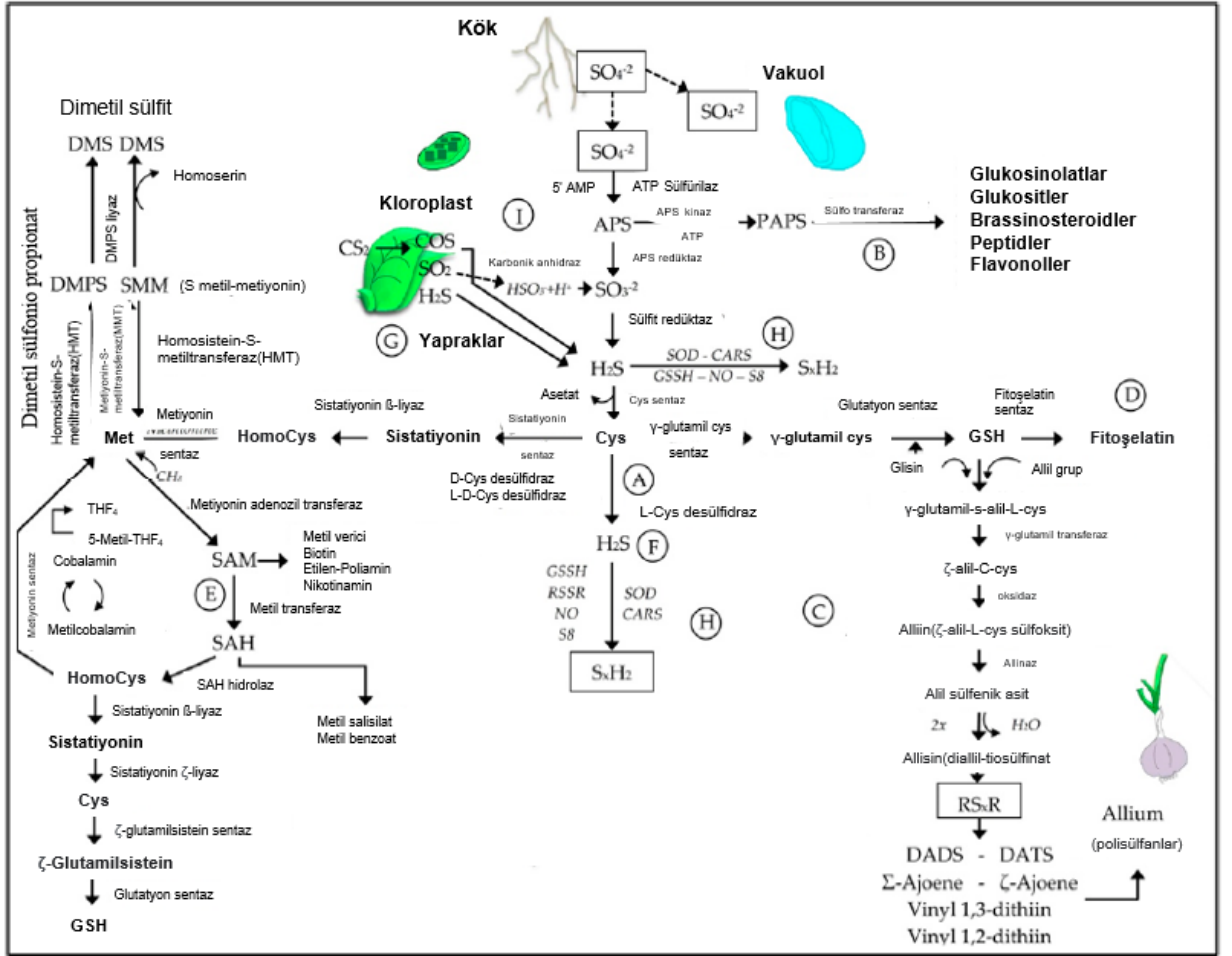
2.3.2. Kükürtün Asimilasyonu

Bitkilerde köklerden absorbe edilen ve taşınan veya stomalar tarafından gaz formunda alınana alınan S primer veya sekonder yollarla vasıtasıyla biyomoleküllerin yapısına katılır. S asimilasyonu, alınan sülfatın sonrasında amino asitlerin (sistein ve metiyonin) yapısına katılacak olan sülfite indirgenmesini gerektirir (Kopriva ve Koprivova, 2003; 2004).

Asimilasyondaki aşamalar aşağıda belirtilen sırada gerçekleşir (Şekil 2.5):

- Sülfat (SO_4^{-2}) kimyasal olarak kararsızdır ve bu nedenle sonraki reaksiyon başlamadan önce aktive edilmelidir. Sülfatın aktivasyonu, sülfat ile ATP arasında adenozin-5'-fosfosülfat (APS) ve pirofosfat (PPi) oluşturmak üzere başlar (Scheerer ve ark., 2010). Bu reaksiyon, ana bileşen plastidlerde ve küçük bileşeni ise sitoplazmada meydana gelen iki bileşene sahip olan ATP sülfirilaz enzimi tarafından katalize edilir (Lunn ve ark., 1990; Prioretti ve ark., 2014).
- Reaksiyonların ürünleri (APS ve PPi) bir indirgeme yoluna girer. Pirofosfat (PPi), inorganik pirofosfataz tarafından inorganik fosfata (Pi) hidrolize edilir ve APS de plastidlerde çok aşamalı olarak indirgenir (Shah ve ark., 2022).
- APS, birincil ve ikincil olmak üzere iki asimilasyon yolu arasında bir çatallaşma olarak kullanılır. Birincil yolda APS redüktaz tarafından sülfite (SO_3^{-2}) indirgenir ve SO_3^{-2} , önce H_2S 'ye devamında ise sisteine indirgenir. Sistein, SO_4^{-2} 'ın primer asimilasyon yolunun ilk ürünüdür ve metiyonin ile proteinlerin sentezi için veya H_2S , SAM, GSH, fitoşelatinler, polisülfidler ve polisülfanlar gibi çok sayıda metabolitin sentezi için S^{2-} donörü olarak kullanılır (Şekil 4.C,D,E,F,H)(Maruyama-Nakashita ve ark., 2004c;Tomatsu ve ark., 2007; Maruyama-Nakashita ve ark., 2005; Maruyama-Nakashita, 2008; Hubberten ve ark., 2012; Huang ve ark., 2019)
- İkincil yolda APS redüktaz tarafından indirgenen SO_3^{-2} , 3-fosfoadenozin-5-fosfosülfat (PAPS) oluşturmak üzere APS kinaz tarafından katalize edilen ATP ile reaksiyona girer (Tomatsu ve ark., 2007; Huang ve ark., 2019). PAPS, sekonder metabolizmada çeşitli sülfatlama reaksiyonları için aktif sülfat donörüdür. Sülfatlama reaksiyonu, esas olarak sitoplazmada bulunan sülfotransferazlar tarafından katalize edilir ve bu reaksiyonlardan peptitler, glukozit, flavonol, gallik asit, kolin, polisakkaritler ile etilen ve poliaminler gibi

bitki hormonları gibi çeşitli metabolitler sentezlenir (Awazuhara ve ark., 2002; Howarth ve ark., 2009; Droux 2004; Taiz ve ark. 2015).



Şekil 2.5. Kükürt asimilasyonunun primer veya sekonder yolları (Fuentes-Lara ve ark., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.3.3. Kükürt İçeren Başlıca Metabolitler

Kükürt, bitkilerde düzenleyici, katalitik ve yapısal işlevleri içeren kimyasal süreçlerde birçok önemli role sahiptir. Çoğu metabolik bileşiğin yapısında bulunan S, bitkilerin büyüme ve gelişmesinde kilit bir role sahip olmakla birlikte abiyotik streslere yanıtta da önemli rollere sahiptir (Saito, 2004; Capaldi ve ark., 2015).

2.3.3.1. Sistein ve Metiyonin

Kükürt içeren aminoasitlerden biri olan sistein, kükürt metabolizması sonucu ortaya çıkan ilk organik moleküldür. Sistein, birincil ve ikincil metabolizma için mutlak gereklidir (Leustek ve ark., 2000; Saito, 2000; Droux, 2004). Sahip olduğu tiyol yan zinciri (R-SH) sayesinde enzimatik reaksiyonlara katılır (Damodaran ve Parkin, 2017). Bir başka kükürt içerikli aminoasitin (metiyonin) sentezinde öncül olmasına ek olarak strese tolerans sağlamada kilit rolleri olan glutatyon ve fitoşelatinlerinde sentezinde görevli bir moleküldür.

Metiyonin (Met), önemli biyolojik fonksiyonlara sahip başka bir S içeren amino asittir ve bitkilerde primer ve sekonder metabolizmasında birleştirici bir rol oynar (Wawrzynska ve ark., 2015; Amir ve ark., 2019). Met, sentetik öncü olarak sisteinden çok aşamalı enzimatik reaksiyon serisi ile sentezlenir. Met'den S-adenosilmetiyonin sentaz (SAMS) enzimi aracılığıyla etilen, poliaminler, vitaminler, koenzimler, nikotianamin ve mugineik asit sentezinin de öncülü olan S-adenosil metiyonine (SAM) sentezlenir (Wawrzynska ve ark., 2015; Aarabi ve ark., 2020). Bu türevler arasında etilen bitkilerde önemli bir hormondur ve nikotinamin ve mugineik asit bitkilerde demir ve diğer metal iyonlarının emiliminde ve taşınmasında anahtar rol oynar (Aarabi ve ark., 2020; Wawrzynska ve ark., 2015).

2.3.3.2. Glutatyon

Sülfidril bileşikleri arasında en yüksek miktara sahip metabolit glutatyon (GSH) dur. GSH, yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarının düzenlenmesine katılır ve olumsuz koşullara karşı bitki direncinde rol oynar (Cheng ve ark., 2015; Speiser ve ark., 2018). Ayrıca organik S'ün bitkilerde depolanması ve taşınmasının ana formunu oluşturan GSH, bitkilerde sisteinden iki aşamalı bir reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonda ilk aşamada, sistein ve glutamattan γ -glutamilsistein sentetaz (γ -ECS) enziminin aracılığıyla γ -glutamilsistein (γ -EC) sentezlenir ve bu aşama GSH sentezi için hız sınırlayıcı adımdır. İkinci aşamada ise, γ -EC, glutatyon sentetaz (GSHS) enzimi aracılığıyla GSH sentezlemek için glisin (veya alanin) ile etkileşime girer (Hendrix ve ark., 2020; Jez, 2019). GSH; önemli bir antioksidan olma, aktif oksijen türleri ile zararlı bileşenlerin uzaklaştırılması ve proteinler ile enzimlerdeki sülfidril gruplarının

korunması içeren bitkilerin normal metabolizmasının sürdürülmesinde önemli rollere sahiptir (Maruyama-Nakashita ve Ohkama-Ohtsu, 2017; Kopriva ve ark., 2019; Aarabi ve ark., 2020; Chan ve ark., 2019; Henriët ve ark., 2019). Bunlarla birlikte GSH, ağır metal stresine karşı bitki toleransında önemli rol oynayan fitoşelatinlerin sentetik öncüsüdür (Maruyama-Nakashita ve Ohkama-Ohtsu 2017).

2.3.3.3. Fitoşelatin

Glutasyon [γ -Glu-Cys-Gly] oligomeri olan fitoşelatinler [$(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly], ağır metal detoksifikasyonunda önemli bir şelatördür. Fitoşelatinlerin biyosentezi, fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi tarafından katalizlenir. Yapısında sistein (Cys), glutamat (Glu) ve glisin (Gly) amino asitleri bulunmaktadır. γ -Glu-Cys dipeptidleri 2 ile 11 arasında değişmektedir fakat glisin aminoasiti terminal uçta bir tanedir. (Cobbet, 2000).

Fitoşelatinler ağır metal kaynaklı stres koşullarına cevap olarak üretilir. Fitoşelatin-metal kompleksiyle, şelatlanmış ağır metal bileşenlerinin hücre çeperine bağlanma kapasitesi azaltılmış ve hücre kısımlarından uzaklaştırılmış olur. Bitkilerde pek çok metabolik yolakta görev alan kükürt, fitoşelatinlerin üretiminde de görev almaktadır. Kükürtün fitoşelatin ve glutasyon gibi kükürt asimile edici bileşiklerin üretimini düzenleyerek ağır metal toksisitesini azaltma veya birikimini sınırlandırma gibi etkileri olduğu bilinmektedir (Kabir ve ark., 2016 ;Chaudhary, Agarwal ve Khan, 2018)

2.3.3.4. Glukozinolat

Glukozinolatlar, çoğunlukla Brassicaceae familyasında yer alan bitkilerde önemli, S içeren ikincil metabolitlerdir (Aarabi ve ark., 2016; Fu ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2020). PAPS'dan sülfotransferaz (SOT) aracılığıyla sentezlenen glukozinolatlar metabolizmada normal koşullar altında fizyolojik bir aktiviteye sahip değildir (Kopriva ve Gigolashvili, 2016). Bitkiler zarar gördüğünde, glukozinolatlar hücrelerde mirosinaz tarafından hidrolize edilerek farklı biyolojik aktivitelere sahip nitriller, tiyosiyanatlar ve izotiyosiyanatlar sentezlenir (Sugiyama ve Hirai, 2019; Jeschke ve ark., 2019). Bu hidrolizatlar,

Brassicaceae familyasında bulunan sebzelerde kendine özgü aroma bileşenlerinin üretimi, mikrobiyal büyümenin inhibisyonu, böceklere ve otoburlara karşı direnç ve kanser genlerinin inaktivasyonu dahil olmak üzere farklı fizyolojik fonksiyonlarda görev alır (Aarabi ve ark., 2016; Traka, 2016).

2.3.4. Bitki Büyüme ve Gelişmesinde Kükürtün Rolü

Kükürt, bitkilerde birçok morfolojik ve fizyolojik özelliklerin düzenlenmesinde önemli bir roller oynar. Topraktaki S eksikliği; sapların daha kısa ve incilmesi, zayıf dallanma, genç yapraklarda klorozis oluşumu, yaprakların sayısında ve boyutunda azalma, sürgün boyunda azalma, erken yaprak dökümü ve biyokütlede azalma gibi ciddi hasarlara neden olur. Birçok tarımsal bitkinin daha iyi büyümesi ve üretkenliği için kükürtlü gübre kullanımı oldukça önemlidir (Piri ve Sharma, 2006; Al-Fraihat ve Ahmad, 2009). S ile bitkilerin yetiştirildiği toprağı gübrelemenin bitki boyunu, yaprak sayısını (Farhad ve ark., 2010; Rashid 2010), yaprak alanını (Meena, Meena ve Kumawat 2013; Shital, Khandagale ve Diksha, 2014) dallanma sayısını (Sah, Sewak ve Singh, 2013; Solanki ve ark., 2016), yaş ve kuru ağırlığını (Mishu ve ark., 2013; Singh ve ark., 2017) artırdığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur ve bu bulgular S ile gübrelemenin bitkilerin bir dizi büyüme özelliğini uyarabildiğini göstermiştir.

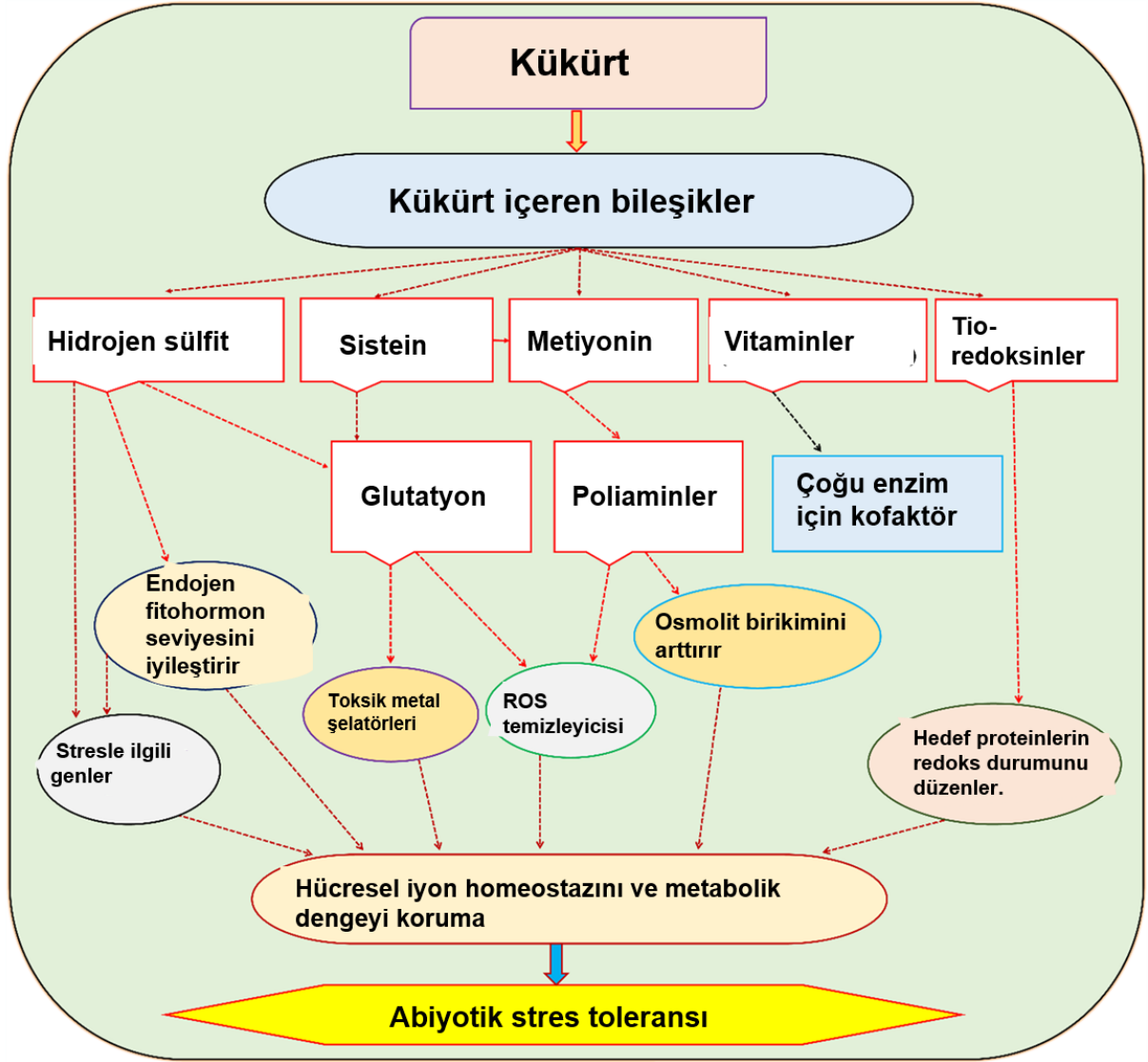
Ana metabolik yollardan birisi olan fotosentezde S, fotosentetik aparatın ve elektron taşıma sisteminin oluşumunda kilit bir role sahiptir. Rubisco'nun içeriği ve etkinliği üzerinde etkili olan S, bitkilerin birçok fizyolojik sürecini düzenleme potansiyeline sahip ana metabolik bileşiklerde bulunur (Fatma ve ark., 2014). Bitkilerdeki eksikliği, klorofil içeriğinde azalmaya, protein sentezi ve enzimatik aktivitelerinde inhibisyonuna, diğer mineral elementlerin alımında aksaklıklara, S içeren metabolitlerin biyosentezinin sınırlandırılmasına ve fizyolojik süreçleri engelleyen CO₂ asimilasyonun hızının azalmasına neden olur. Yapılan araştırmalar, S'ün dışsal uygulamasının bitkilerin birçok fizyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar, S uygulamasının klorofil ve karotenoid içeriğini, antosiyanin miktarını net fotosentez oranını (PN), Rubisco enziminin miktarını, stoma iletkenliğini (gs) ve CO₂ konsantrasyonunu (Ci) artırdığını ortaya koymuştur (Ahmad ve Abdin, 2000; Khan ve Mobin, 2005;

Masood, Iqbal ve Khan, 2012; Khan ve ark., 2015; Singh ve ark., 2017; Akmouche ve ark., 2019; Fatma ve ark., 2021).

Birçok bitki proteininin önemli bir parçası olan S, tohum üretiminde de kilit role sahiptir. S bitkilerde çiçek, tohum sayısı, tohum boyutu ve veriminde önemli düzeyde etkilidir. S eksikliğinde çiçeklerin sayısı ve gelişimi azalır, tohumların olgunlaşması gecikir tohumun boyutları ve sayısı sınırlanır. Bununla birlikte S eksikliğinde yağ içeriği ile verimini düşer. S uygulaması, tohumlardaki yağ asitlerinin kalitesini tohum sayısını, kuru ağırlığını, verimini, yağ asidi bileşimini ve depolanan proteinin miktarının artırır (Brunel-Muguet ve ark., 2015; Poisson ve ark., 2019; Serafin-Andrzejewska, Kozak ve Kotecki, 2020).

2.3.5. Kükürt Aracılı Abiyotik Stres Toleransı

Kuraklık, ağır metal, sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik stresler bitkilerin morfolojisi, fizyolojisi ve verimliliği üzerinde ciddi etkilere neden olmaktadır. Bitkilerde, S ve S içeren bileşikler, doğrudan antioksidanlar olarak hareket ederek veya antioksidan savunma sistemini düzenleyerek abiyotik stres toleransında görev alır. Ayrıca S, stres sinyalinin desteklemek ve çevresel streslere karşı bitki savunmasını geliştirmek için diğer biyolojik moleküllerle etkileşime girer (Khan, Fuller ve Baloch, 2008; Hasanuzzaman ve ark., 2018; Samanta, Singh ve Roychoudhury 2020). Bunların yanı sıra, bir metil grubu donörü olan S-adenosil-metiyoninde bulunur ve metilasyonu içeren herhangi bir reaksiyon, kükürt kaynağından etkilenebilir. Bu durum kükürtün DNA metilasyonu, histon proteinlerinin metilasyonu gibi epigenetik düzenlemeler için gerekli olduğunu ortaya koyar. Epigenetik düzenlemelerin stres belleğine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, adaptasyon mekanizmalarında epigenetik düzenlemeler kullandığında S, bitkinin değişen çevresel koşullara adaptasyonunda yardımcı olacak önemli bir faktör olarak değerlendirilebilir (Burstenbinder ve Sauter, 2012). Ayrıca, çeşitli mahsul bitkilerinde abiyotik stres toleransındaki S'ün rolü de Şekil 2.6'da sunulmaktadır. Son çalışmalar, dışsal bir S uygulamasının bitkilerdeki abiyotik streslerden etkilenen fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin bozulmalarını hafiflettiğini göstermiştir (Fatma ve ark., 2014; Guo ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018; Hussain ve ark., 2019; Liu ve ark., 2020; Sehar ve ark., 2021).



Şekil 2.6. Bitkilerde kükürt-aracılı abiyotik stres toleransı (Shah ve ark., 2022'den değiştirilerek alınmıştır)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada bitki materyali olarak kullanılan model organizma *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia ekotipine ait tohumlar, Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc)'dan Dr. Öğretim Üyesi Emre Aksoy (Orta Doğu Teknik Üniversitesi Üniversitesi) tarafından sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin içeriği

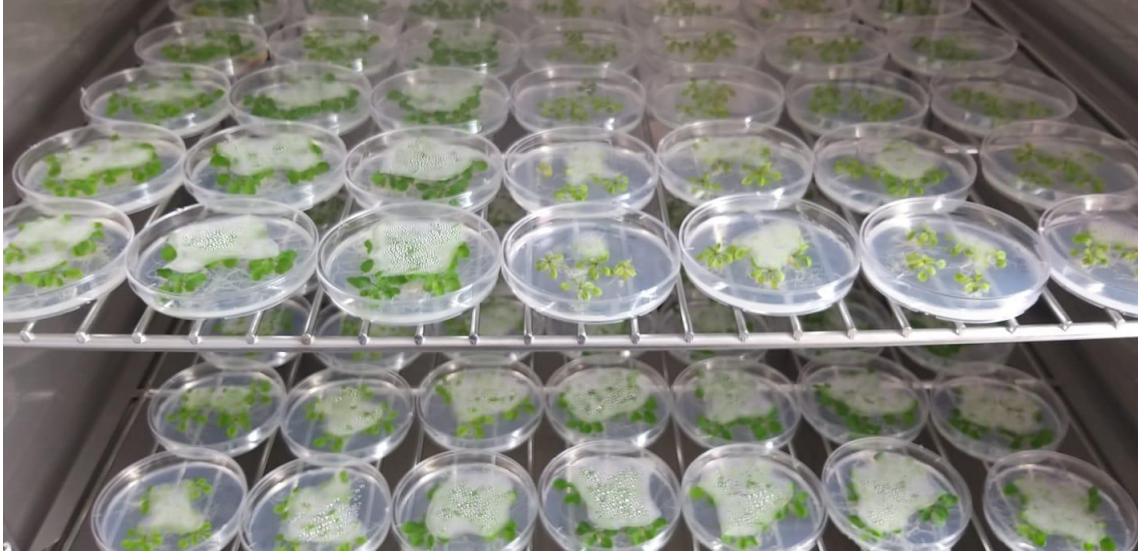
Makro Element	mg/L	mM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
Mikro Element	mg/L	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91
Vitaminler	mg/L	µM
Glisin	2.00	26.64
myo-İnositol	100.00	554.94
Nikotirik asit	0.50	4.06
Piridoksin HCl	0.50	2.43
Tiamin HCl	0.10	0.30

3.2. Bitki Yetiştirme Yöntemi

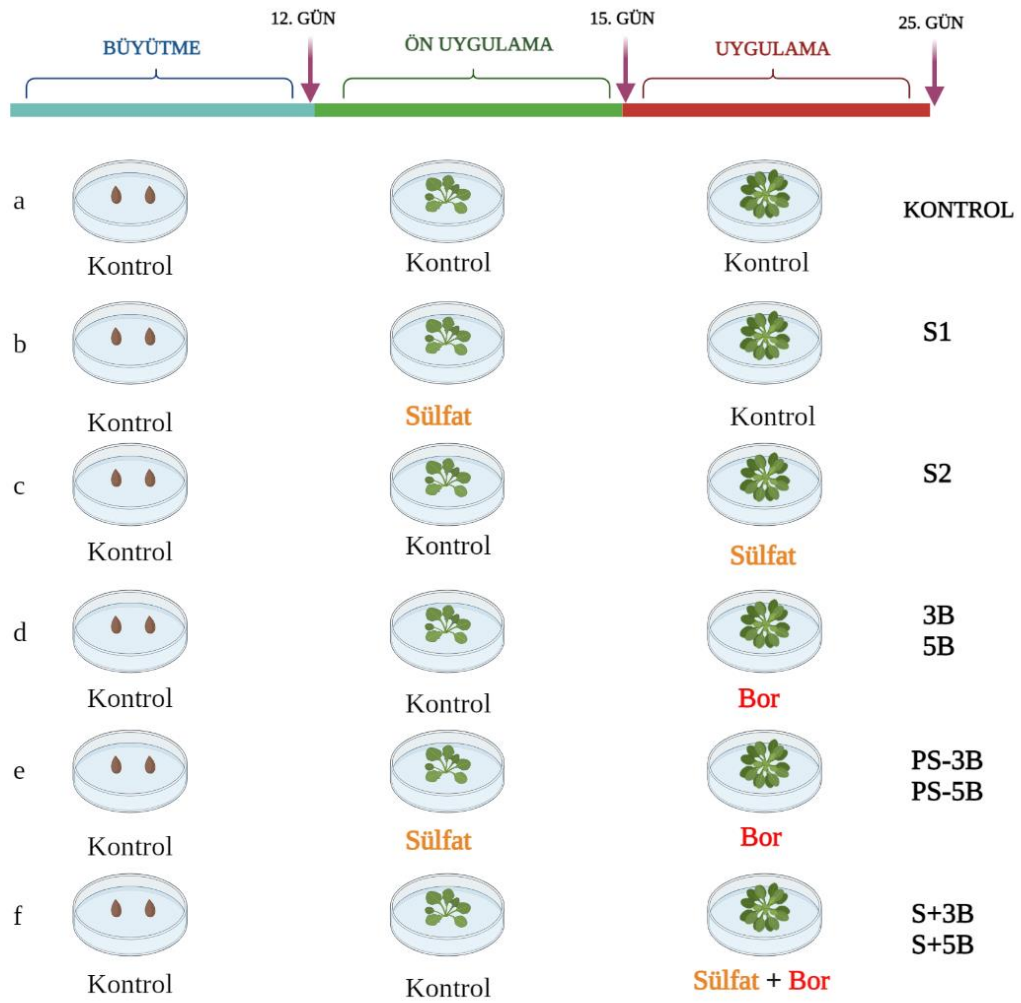
Çalışmada kullanılan *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia bitkisine ait tohumlar sırasıyla 2 dk %70'lik etanol ve 10 dk %2.5'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit) ile muamele edilerek yüzey sterilizasyonu (Kayıhan, Kayıhan ve Çiftçi, 2016) işlemi uygulanmış ve sonrasında in vitro koşullar altında MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri ortamını içeren petri kaplarına ekilmiştir (Çizelge 3.1.).

Sülfat uygulamaları (ön ve birlikte) için Mg_2SO_4 tipi sülfat ve konsantrasyonunu belirlemek için de 2 ve 3 mM konsantrasyonları literatür taraması sonucu ön çalışmalarda denemek üzere seçilmiştir. Yapılan gözlemler ve fotosentetik performans ölçümleri sonucunda, Arabidopsis bitkisinde sülfat uygulamaları için en etkin sülfat konsantrasyonunun 3 mM Mg_2SO_4 olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca bor (B) toksisite süresini ve konsantrasyonlarını belirlemek için de 5 ve 10 gün - 3, 5, 7 ve 8 mM B konsantrasyonları seçilmiş ve elde edilen sonuçlara göre, 7 mM ve 8 mM B konsantrasyonlarında bitkilerin fotosentetik etkinliği ortaya koyan performans indeks değerleri kontrol grubuna göre %50'nin altına düştüğü ve bitkilerde önemli düzeyde hasarlara neden olduğunu saptanmıştır. Buna bağlı olarak, bor toksisite konsantrasyonu ve süresi olarak 3 ve 5 mM B ve 10 gün olarak seçilmiştir.

Denemelerde tohumlar, 3 gün $+4^{\circ}C$ 'de karanlık koşullara maruz bırakılarak çimlenebilmek için ihtiyaç duydukları soğuk stratifikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Stratifikasyon sonrası petrielerde bulunan çimlenmiş tohumlar, $21^{\circ}C \pm 1$ sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot, $200 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ ışık şiddeti ve %50-60 nem koşullarındaki kontrollü iklim kabini (Şekil 3.1), rastgele deneme deseninde yetiştirilmiştir. 12 gün büyütülen bitkiler 3 mM sülfat içeren petri kaplarına transfer edilmiş ve 3 gün sülfat ön uygulamalarına (PS) tabii tutulmuştur. 3 günün sonunda ön uygulamasız (B) ve birlikte (S+B) uygulama grupları ile beraber farklı bor konsantrasyonları içeren (3 ve 5 mM H_3BO_3) petri kaplarına aktararak 10 gün süre ile bor toksisitesine maruz bırakılmışlardır (Şekil 3.2. ve Çizelge 3.2). 25 günün sonunda yukarıda belirtilen tüm gruplar hasat edilmiş ve ölçümler yapılmıştır.



Şekil 3.1. Kontrollü iklim kabininde yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* bitkileri



Şekil 3.2. Deney planı

Denemelerde uygulama gruplarına ait rumuzlar ve açıklamaları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneme gruplarına ait rumuzlar ve açıklamaları

Rumuz	Açıklama
K	25 Günlük kontrol grubu bitkileri (Şekil 3.1 a)
S1	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 3 mM sülfat ön uygulamasının ardından 10 gün kontrol koşullarına maruz kalan ön uygulama için kontrol bitkiler (Şekil 3.1 b)
S2	15 gün kontrol koşullarının ardından 10 gün 3 mM sülfat koşullarına maruz kalan bitkiler (Şekil 3.1 c)
3B	15 gün kontrol koşulları + 10 gün 3 mM B konsantrasyonuna maruz kalan toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 d)
PS-3B	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 3 mM sülfat ön uygulamasının ardından 10 gün 3 mM B konsantrasyonuna maruz kalan ön uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 e)
S+3B	15 gün kontrol koşullarının ardından 10 gün 3 mM sülfat ve 3 mM B konsantrasyonuna aynı anda maruz bırakılan birlikte uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 f)
5B	15 gün kontrol koşulları + 10 gün 5 mM B konsantrasyonuna maruz kalan toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 d)
PS-5B	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 3 mM sülfat ön uygulamasının ardından 10 gün 5 mM B konsantrasyonuna maruz kalan ön uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 e)
S+5B	15 gün kontrol koşullarının ardından 10 gün 3 mM sülfat ve 5 mM B konsantrasyonuna aynı anda maruz bırakılan birlikte uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri (Şekil 3.1 f)

3.3. Ölçüm ve Analizler

3.3.1. Fizyolojik ve Biyokimyasal Ölçümler

3.3.1.1. Yaprak Yüzey Alanı Ölçümü

Arabidopsis thaliana bitkilerinin uygulamalar sonunda elde edilen fotoğraf görüntülerinden Imagej@ programı (Maloof ve ark., 2013) kullanılarak yaprak yüzey alanı ($\text{cm}^2.\text{bitki}^{-1}$) hesaplanmıştır.

3.3.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle) Ölçümleri

Arabidopsis thaliana bitkilerinin uygulamalar sonrası yaş ağırlıkları tartılarak (g. bitki⁻¹) kaydedildikten sonra, 80°C'lik etüvde 48 saat kurutulup yeniden tartılmasıyla kuru ağırlıkları (gr. bitki⁻¹) belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere göre, yaş ağırlık tolerans indeksi (YATİ-%) ve kuru ağırlık tolerans indeksi (KATİ-%) Ahmad ve ark. (2009)'na göre hesaplanmıştır.

YATİ (%) = (Uygulamalara maruz kalan bitkilerin yaş ağırlığı/Kontrol bitkilerinin yaş ağırlığı) × 100

KATİ (%) = (Uygulamalara maruz kalan bitkilerin kuru ağırlığı/Kontrol bitkilerinin kuru ağırlığı) × 100

3.3.1.3. Bor ve Sülfat Miktarlarının Tayini

Arabidopsis thaliana bitkisinin uygulama sonrası yaprak dokularındaki toksisite semptomları fotoğraflandıktan sonra bor ve sülfat miktarlarını belirlemek için dokular 48 saat süreyle 80°C'lik etüvde kurutulmuştur. Kurutulan doku örnekleri havanda ezilerek toz haline getirildikten sonra her uygulama için ayrı porselen krozelerde 550°C'de 5 saat kül fırınında yakılmıştır. Yaş yakma için elde edilen külün üzerine 1 ml [HNO₃ + HClO₄ (3:1 v/v)] (Bai ve ark., 2015) ilave edilerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Özütlerdeki bor (B) içeriği, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer) cihazı ile belirlenmiştir. Sülfat miktarı ise Dionex ICS-3000 iyon kromatografi sistemi (Dionex Part of Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) ile tayin edilmiştir. Bor miktarı mg kg⁻¹ KA, sülfat miktarı ise µmol g⁻¹ KA olarak hesaplanmıştır.

3.3.1.4. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

Yaprak dokularındaki membran hasarının son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı ile oksidatif stres sonucu oluşan ve bir aktif oksijen türü olan hidrojen peroksit (H₂O₂)'in miktarı Esterbauer ve Cheeseman (1990)'ın metodu kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarındaki bitkilerden alınan 0.1 g yaprak örneği 4 ml %0.1 trikloroasetik asit (TCA) ile 4°C'de homojenize edilmiştir. Homojenat 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir ve elde edilen süpernatandan aşağıda belirtilen yöntemler izlenerek MDA ve H₂O₂ miktarı belirlenmiştir:

MDA miktarını belirlemek için cam tüpe alınan 0.5 ml süpernatanın üzerine 1 ml TCA-TBA-HCl (%15 trikloroasetik asit, %0.375 tiobarbitürik asit, 0.25 N HCl)

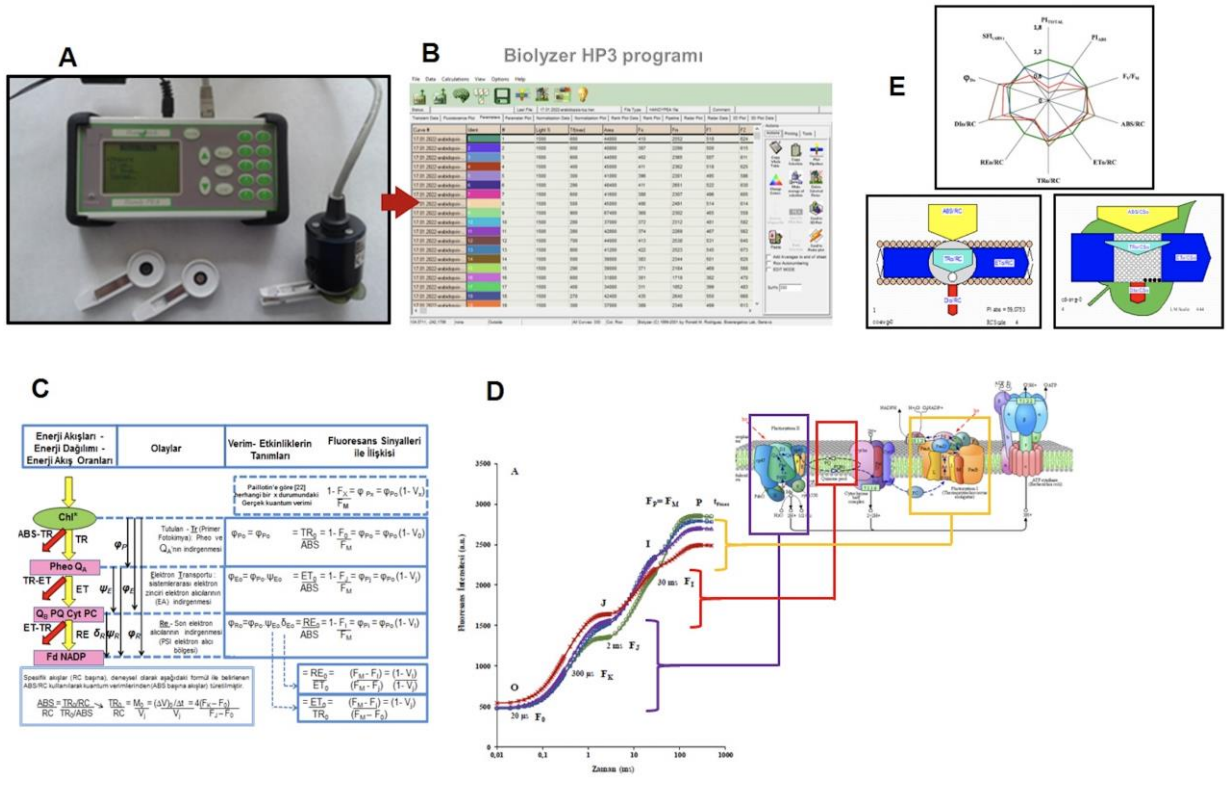
çözeltisi ve 0,5 ml pH'sı 7.6 olan 0.1 M Tris/HCl tamponundan eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, 97°C'lik sıcak su banyosunda 45 dk reaksiyona sokulmuştur ve buradan çıkarılan tüpler buz banyosuna konularak reaksiyon durdurulmuştur. Bu işlemde sonra reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 5 dk santrifüjlenip spektrofotometrede (Spekro UV-Vis Double Beam PC) 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki MDA miktarı $\text{nmol g}^{-1} \text{YA}$ olarak belirlenmiştir.

H_2O_2 miktarını belirlemek için cam tüpe alınan 0.5 ml süpernatanın üzerine 0.5 ml pH'sı 7.6 olan 0.1 M Tris/HCl tamponu ve 1 ml 1 M KI eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 90 dk karanlıkta bekletilmiştir ve spektrofotometrede (Spekro UV-Vis Double Beam PC) 390 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki H_2O_2 miktarı $\mu\text{mol g}^{-1} \text{YA}$ olarak belirlenmiştir.

3.3.1.5. Fotosentetik Aktivite Ölçümleri

Portatif Floresans Ölçüm Cihazı (HandyPEA, Hansatech Ltd.) ile polifazik klorofil a floresans ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). Polifazik klorofil a floresans verileri, tilakoid zarlardaki enerji akışı teorisini temel alan JIP-Testi ile biyofiziksel parametrelere çevrilerek, fotosistemlerin aktivite durumu, fonksiyonu ve yapısı hakkında oldukça ayrıntılı bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır.

Kontrol ve tüm uygulama gruplarındaki bitkilerden örneklenen yapraklar 30 dk karanlığa adapte edilmiş ve ölçümler ($n=18$) yapılmıştır. Fluorometre, ışık reaksiyonları sürecini kırmızı ışıkla (maximum 650 nm'de emisyon) uyarır ve 685 nm üzerindeki floresansı algılar. Ölçümler; 3 adet düzenli ışık yayan diyodun ürettiği bir saniyelik tek güçlü ışık pulsu ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tüm PSII reaksiyon merkezlerinin kapanması için yeterli olan eksitasyon şiddeti) ile 4 mm çapındaki yaprak alanında gerçekleştirilmiştir. Hızlı floresans kinetikleri (minimum floresans, F_o - maksimum floresans, F_M) 10 μs 'den 1 s'ye kadar kaydedilmektedir ve 20 μs 'de kaydedilen floresans şiddeti minimum floresans (F_o) olarak kabul edilmektedir (Strasser ve Strasser, 1995). Fotosentetik örneğin fizyolojik durumunu belirlemek için bir saniyelik ışımaya sırasında belirlenen altı zaman noktasından elde edilen veriler, Biolyzer HP3 programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen JIP-Testinin bazı parametreleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. A) HandyPEA cihazının genel görünümü, B) Biolyzer HP3 programında analiz görüntüsü, C) JIP-Testinin şematik bir sunumu D) Fotosentetik materyaldeki tipik polifazik klorofil a fluoresans yükselişi ve fotosentetik aparatındaki süreçler E) JIP-Test sonuçlarının grafiksel sunum türü (radar ve membran ile yaprak modelinde pipe-line) örnekleri (Toth ve ark., 2005; Strasser ve ark., 2010'dan modifiye edilmiştir).

Çizelge 3.3. JIP-Testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamalarının ve formüllerinin özeti (Strasser, Tsimilli-Michael ve Srivastava, 2004; Tsimilli-Michael ve Strasser, 2008; Strasser ve ark., 2010; Çiçek, Çakırlar ve Strasser, 2012; Guha ve ark., 2013)

Teknik ve hesaplanan fluoresans parametreleri	
$F_0 \equiv F_{20\mu s}$	Minimum fluoresans intensitesi (O basamağı); PSII'nin tüm reaksiyon merkezleri açık
$F_K \equiv F_{300\mu s}$	300 μs 'deki fluoresans intensitesi
$F_J \equiv F_{2ms}$	2 ms'deki fluoresans intensitesi (J basamağı)
$F_I \equiv F_{30ms}$	30 ms'deki fluoresans intensitesi (I basamağı)
$F_P \equiv F_M$	Maksimum fluoresans intensitesi (P basamağı); PSII'nin tüm reaksiyon merkezleri kapalı
$M_0 = (dV/dt)_0$	$4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$ Relative değişken klorofil fluoresans eğrisi V_t ($F_0 \equiv F_{20\mu s}$ için)'nin tahmini başlangıç eğimi (ms^{-1} 'deki) veya fotokimyanın başlangıç hızı
V_J	$(F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ Fluoresansın indüklediği eğride J basamağında relatif değişken fluoresans
V_I	$(F_I - F_0)/(F_M - F_0)$ Fluoresansının indüklediği eğride I basamağında relatif değişken fluoresans
$\varphi_{EO} = ET_0/ABS$	$[1 - (F_0/F_M)] \psi_0$ t=0'da elektron transportunun maksimum verimi
$\varphi_{DO} = DI_0/ABS$	$1 - TR_0/ABS$ PSII anten sisteminde fotokimya dışında kaybedilen enerjinin kuantum verimi
$SFI_{(abs)}$	PSII'nin yapısal ve fonksiyonel durumunu belirten indikatör
ΔV_{IP}	PSI'nin akseptör tarafındaki değişimi belirten indikatör
V_K/V_J	Oksijen oluşturan kompleks(OEC)'in inaktivasyonunu ve olası hasarını belirten indikatör
Spesifik akışlar- Her bir reaksiyon merkezi başına enerji akışları	
ABS/RC	$M_0 (1/V_J) (1/\varphi_{PO})$ Reaksiyon merkezi (RC) başına absorpsiyon (PSII anten klorofilleri için); t= 0'da absorplanan enerji akışı veya ortalama anten büyüklüğü
TR_0/RC	$M_0 (1/V_J)$ t= 0'da yakalanan enerji akışı (reaksiyon merkezi başına)
ET_0/RC	$M_0 (1/V_J) \psi_0$ t= 0'da elektron transportu (reaksiyon merkezi başına)

DI_0/RC	(ABS/RC) - (TR₀/RC) t= 0'da yayılan enerji akışı (reaksiyon merkezi başına); Fotokimya dışında kaybedilen enerji
RE_0/RC	M₀ (1/V_J)(1-V_i) RC başına Q _A 'dan PSI son elektron alıcılarına elektron transportun kuantum verimi
Fenomenolojik akışlar-Ölçüm yapılan yaprak alanı bazında enerji akışları	
ABS/CS_0	t= 0'da absorplanan enerji akışı
TR_0/CS_0	φ_{PO} (ABS/CS₀) , t= 0'da yakalanan enerji akışı
ET_0/CS_0	φ_{PO}·ψ₀·(ABS/CS₀) , t= 0'da elektron transportu
DI_0/CS_0	(ABS/CS₀) - (TR₀/CS₀) , Bir PSII'de fotokimya dışında kaybedilen enerji
Performans indeksleri ve bileşenleri	
RC/ABS	Reaksiyon merkezi başına PSII anten klorofilleri tarafından indirgenen Q _A miktarı
$φ_{PO}/(1 - φ_{PO})$	Primer fotokimyasal reaksiyonun etkinliğinin göstergesi
$ψ_0/(1 - ψ_0)$	Sistemden ayrılan elektronların sistemde biriken elektronlara oranı
$δR_0/(1-δR_0)$	İndirgenen PSI son elektron alıcılarının kuantum verimi
PI_{abs}	[γ_{RC}/(1 - γ_{RC})] X [φ_{PO}/(1 - φ_{PO})] X [ψ₀/(1 - ψ₀)] PSII tarafından foton absorpsiyonundan sistemler arası elektron alıcılarının indirgenmesine kadarki enerji korunumunun performans indeksi (Potansiyel)
PI_{Top}	[γ_{RC}/(1 - γ_{RC})] X [φ_{PO}/(1 - φ_{PO})] X [ψ₀/(1 - ψ₀)] X [δ_{RO}/(1-δ_{RO})] Toplam performans indeksi, PSI'in son elektron alıcısına kadar olan performans indeksi

3.3.1.6. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi

Arabidopsis thaliana yaprak dokularındaki klorofil (a+b) ve karotenoid (ksantofil+β-karoten) miktarları (mg ml⁻¹ g⁻¹ YA) Lichtenthaler (1987)'a göre belirlenmiştir. Bu yöntemde kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokusundan her bir uygulama için 15 tekrarlı olacak şekilde yapraklar tartılarak ependorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 1 ml %100'lük aseton eklenmiştir. Örnekler bir hafta +4 °C'de karanlıkta bekletilerek pigment içeriğinin asetona geçmesi sağlanmıştır. Ardından spektrofotometre (Shimadzu UV-Vis Double Beam) ile 470, 644.8 ve 661.6 nm dalga boylarında absorbanslar okunmuştur. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam klorofil (kl a+b)} = (7.05 \times A_{661.6}) + (18.09 \times A_{644.8})$$

$$\text{Karotenoid (x+c)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.9 \times \text{kl.a}) - (63.14 \times \text{kl.b})] / 214$$

3.3.1.7. Antosiyanin ve Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokularındaki antosiyanin içeriği Mancinelli ve ark. (1975)'na göre, flavonoid içeriği ise Mirecki ve Teramura (1984)'ya göre ölçülmüştür. Her bir uygulama 0.1 g taze yaprak örneğine 6 ml %79 metanol, %20 distile su ve %1 HCl'den oluşan karışım eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C'de 10000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatandan aşağıda belirtilen metotlar takip edilerek antosiyanin ve flavonoid içeriği saptanmıştır:

Antosiyanin içeriğini belirleyebilmek için, elde edilen süpernatanın spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 530 ve 657 nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedilmiştir. Yaprak dokularındaki antosiyanin miktarları (mg ml⁻¹ g⁻¹ YA) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Antosiyanin} = A_{530} - (A_{657}/3)$$

Flavonoid içeriğini belirleyebilmek için, elde edilen süpernatanın spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 300 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki flavonoid miktarı kontrole göre yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.3.1.8. Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.3.1.8.1. Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Arabidopsis thaliana kontrol ve uygulama gruplarına ait yaprak örneklerinin protein miktarları, Bradford (1976) yöntemine göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak saptanmıştır. 20 µl örnek çözelti ile 480 µl distile su karıştırıldıktan sonra, karışıma 5 ml Bradford çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile yaklaşık 30 saniye homojen hale getirilen karışım, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olacak şekilde okunmuştur.

3.3.1.8.2. Toplam Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Pütter (1974)'e göre belirlenmiştir. Yapraktan alınan örneklerle ölçülen bu metotta reaksiyon karışımı 3 ml olup 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 20.1 mM guaiakol, 12.3 mM H₂O₂ ve enzim özütü içermektedir. Reaksiyon, enzim özütünün ilavesiyle başlatılmıştır ve 10 dk'lık süre boyunca izlenmiştir. Toplam POD enzim aktivitesi, Guaiakol'ün ekstinksiyon katsayısı (6.39 mM.cm⁻¹, 436 nm) kullanılarak reaksiyon başlangıç hızından (nmol H₂O₂ dk⁻¹ mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

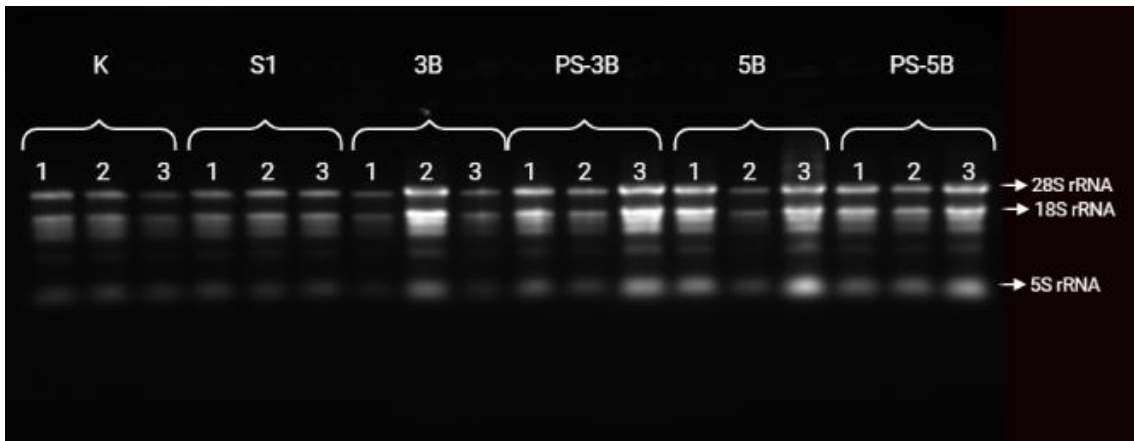
3.3.1.8.3. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzim aktivitesi Habig, Pabst ve Jakoby (1974)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon ortamı, 125 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 1 mM GSH, 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve 300 µg protein içermektedir. CDNB'nin eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır ve S-2,4-dinitrofenil glutasyonun oluşumu, 340 nm dalga boyunda absorbans değerlerindeki artış ölçülerek izlenmiştir. Ölçümler esnasında GSH ve CDNB'nin kendiliğinden gerçekleşen konjugasyonunu önlemek için her ölçümde kör yeniden hazırlanmıştır. Toplam GST enzim aktivitesi, ekstinksiyon katsayısı (9.6 mM.cm⁻¹, 340 nm) kullanılarak (nmol dk⁻¹ µg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.3.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

3.3.2.1. Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonun Belirlenmesi

Kontrol ve uygulama gruplarındaki bitkilerden hasatlar sırasında alınan 0.25 g yaprak örneklerinin RNA'ları 3 tekrarlı olarak Chomczynski ve Sacchi (1987)'ye göre modifiye edilerek izole edilmiştir. Kontrol ve tüm uygulama gruplarına ait bitkilerin taze yaprak örnekleri sıvı azot ile havanda ezildikten sonra üzerlerine 900 µl Qiazol konularak homojenize edilmiş ve 10 dakika çoklu vortekste karıştırılmıştır. Ardından 14000 rpm'de 5 dk 22°C'de santrifüj edilmiştir. 900 µl süpernatant üzerine faz ayrımını sağlamak için 180 µl kloroform eklenmiş ve tüpler 15 s boyunca çalkalanmıştır. Faz ayrımının meydana gelmesi için 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ependorf tüpler 15 dk 14000 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı yeni tüpe aktarılmış ve üzerine aynı hacimde izopropanol eklenmiştir. Tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dk 14000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Elde edilen RNA'nın üzerine 1 ml %75'lik etanol eklenmiş ve tekrar 5 dk 14000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Devamında süpernatant atılmış ve pellet oda sıcaklığında 10 dk kurutulmuştur. Ependorf tüplere 43 µl DEPC-dH₂O eklenmiş ve peleti çözdürmek için tüpler 10 dakika 65°C'ye maruz bırakılmıştır. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklanmıştır. Elde edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel ile yürütülmüş ve izole edilen RNA'ların saflığı ve bütünlüğü jel görüntüsüyle belirlenmiştir (Şekil 3.4.). İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Shimadzu BioSpec-nano UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiş ve konsantrasyonları ng/µl olarak Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüleri

3.3.2.2. RNA'lardan Tamamlayıcı Tek Zincirli DNA (cDNA) Sentezi

Çizelge 3.4. Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'ların konsantrasyonları

Tekrar Numarası	Uygulama Adı	RNA konsantrasyonu (ng/µl)	A260/A280
1	K	673,30	2,15
2	K	507,55	2,10
3	K	1059,72	2,14
4	S1	582,31	2,13
5	S1	446,72	2,07
6	S1	259,29	2,04
7	3B	195,21	2,07
8	3B	848,16	2,13
9	3B	586,3	2,14
10	PS-3B	259,65	1,95
11	PS-3B	1170,8	2,15
12	PS-3B	1245,99	2,18
13	5B	1046,27	2,15
14	5B	1760,44	2,14
15	5B	2316,61	2,17
16	PS-5B	1599,27	2,09
17	PS-5B	2250,12	2,20
18	PS-5B	1807,33	2,20

Tek zincirli DNA (cDNA) sentezi için "Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)" kullanılmış ve kit prosedürü uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar -80°C'de saklanmıştır. Bu yöntemle göre, içerisinde 2 µg RNA, 1 µl primer ve su bulunan karışım (son hacim 12 µl) hazırlanır ve soğuk bloklara alınır. Soğuk bloklardaki tüplerin üzerlerine 1 µl ters (reverse)

transkriptaz, 4 µl ters (reverse) transkriptaz tamponu ve 1 µl ters (reverse) transkriptaz inhibitörü ve 2 µl primer karışımı eklenir (son hacim 20 µl). Tüpler PCR (Thermo) cihazına yerleştirilir ve prosedüre göre cDNA eldesi için cihaz programı 42°C'de 60 dk ve ardından 70°C'de 5 dk inkübasyon olarak ayarlanır. Elde edilen cDNA tüpleri -80°C'de saklanmaktadır.

3.3.2.3. Primer tasarımı

NCBI, Primer3 ve İDT Oligo Analyzer programları kullanılarak hedef gen bölgelerini çoğaltmak için gerekli olan primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler, RT-PCR ile araştırılan nisbi gen ifade düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Hedef gen bölgesini çoğaltmak için kullanılacak olan primerler Vector NTI kullanılarak tasarlanmıştır. Actin-2 (ACT2)'yi kodlayan Arabidopsis geni house-keeping kontrol geni olarak ve gerçek zamanlı RT-PCR ile araştırılan genlerin nispi miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Primerlerin sekansları, T_m (primerlerin cDNA'ya tutunma sıcaklığı) değerleri ve primerlerin sekans büyüklükleri(baz çifti) Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

3.3.2.4. Gerçek Zamanlı (Real Time) Ters Transkriptaz (RT) PCR

Gerçek zamanlı PCR, "RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon)" ve floresans ölçümleri (Roche lightcycler 482) gerçek zamanlı döngü (real time cyclus) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemde kit prosedürü uygulanmıştır. Bu prosedüre göre, tüplerdeki son hacim 25 µl olacak şekilde konsantrasyonlar hedef gen primerleri için 0.5 µM, QuantiTect Master Mix için 1X ve cDNA için 100 ng/µl'dir. Tüpler öncelikle enzim aktivasyonlarının sağlanması için 95°C'de 15 dk daha sonra miktar tayini için 40 kez gerçekleşecek bir döngüye maruz bırakılmıştır. Bu döngü 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 s tutunma ve 72°C'de 30 s uzama olaylarını içermektedir. Son olarak erime eğrisi (melting curve) çizilmesini sağlayan veriler cihazın 65°C de 1 dk 99°C ise 5 s tutularak elde edilmiştir. Hedef sekanslar için nispi hesaplamalar bir iç referans geni, aktin miktarı ile normalize edilerek gerçekleştirilmiştir. Hedef ve referans genler aynı örnekten çoğaltılmış ve hedef genin normalize edilmiş başlangıç miktarları belirlenmiştir.

3.3.2.5. Normalize Edilmiş Gen Miktarı Hesaplanması

Gerçek zamanlı RT-PCR, toplam RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lardaki hedef ve house keeping referans genlerin çoğalmasından elde edilen C_T değerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Reaksiyonlar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki hedef ve referans genin miktarları C_T değerleri ve ilgili standart eğriler kullanılarak hesaplanmıştır. Hedef genin normalize

Çizelge 3.5. Tasarlanan primerlerin sekansları, AGI kodları ve gen adları

AGI Kodu	Gen Adı	Kısaltma	Yön	Sekans (5'-3')	Tm (°C)	Sekans boyutu (bp)
AT4G23100	Glutamate Cysteine Ligase	GSH1	Forward	CCATCATGCCAAAGGGGAGA	59,8	20
			Reverse	AACAGTACACGTTCCGAGCA	59,2	20
AT5G27380	Glutathione Synthetase 2	GSH2	Forward	GGTGCTTACCTCAGGAGCAA	58,8	20
			Reverse	GCGATCTTCGTGCGCATTAG	58,1	20
AT1G80760	Nod6-Like Intrinsic Protein 6;1	NIP6;1	Forward	CGTTTCCCTCTACCGCAAGT	59,3	20
			Reverse	TCTTCTGGTTACGATCGCC	59,6	20
AT4G27730	Oligopeptide Transporter 6	OPT6	Forward	ATGTTTCATGGCTCAGGTGGC	59,4	20
			Reverse	TGGGACAAGTCCATTGGCTG	59,9	20
AT5G10180	Sulfate Transporter 2;1	SULTR2;1	Forward	GGTGTGAAGACAGTGAGGCA	59,2	20
			Reverse	ATCGCCTCGGTTAGAGCAAC	58,9	20
AT1G77990	Sulfate Transporter 2;2	SULTR2;2	Forward	TCCAATGCTGAGTCACGAGG	59,1	20
			Reverse	ATTGCTTCCGTTAGGGCGAT	58,2	20
AT3G51895	Sulfate Transporter 3;1	SULTR3;1	Forward	ACTCACGAGTGGAGATGGGA	59,9	20
			Reverse	GCCGCCACCCAAAAGAATTT	59,9	20
AT4G02700	Sulfate Transporter 3;2	SULTR3;2	Forward	GGAATGGGCTCGTGGTTACA	59,6	20
			Reverse	GGCACCAAGCTCGAGTAAAG	57,9	20
AT1G23090	Sulfate Transporter 91	SULTR3;3	Forward	ATCCGACGTCGTTTCAGGTC	59,8	20
			Reverse	AGCTCGAGTATAGACCAACGA	59,1	21
AT3G15990	Sulfate Transporter 3;4	SULTR3;4	Forward	CCTGATGATCCGTTACAGAGGT	60,8	22
			Reverse	TGATTGCCCTGAGGAATGGCG	64,8	21
AT5G13550	Sulfate Transporter 4;1	SULTR4;1	Forward	CGAATTACCGTGGAGCGA	59,5	19
			Reverse	TACGACATTGCCTGGGGAAC	59,6	20
AT5G19600	Sulfate Transporter 3;5	SULTR3;5	Forward	CTCGACCATAACGGGCTTCA	59,3	20
			Reverse	TTTGCCACTTCCACTCAGCC	60,0	20
AT3G18780	Actin 2	ACT2	Forward	CTTGACCTTGCTGGACGTGA	59,6	20
			Reverse	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG	57,7	20

edilmiş miktarını hesaplamak için hedef gen miktarı referans gene bölünmüş ve ortalamalarının log dönüşümleri (\log_2) yapılmıştır. Log dönüşümleri yapılmış normalize edilmiş ifade değerleri birbirleri ile $2^{-\text{deltaCt}}$ karşılaştırılmıştır.

3.4. Veri Analizi

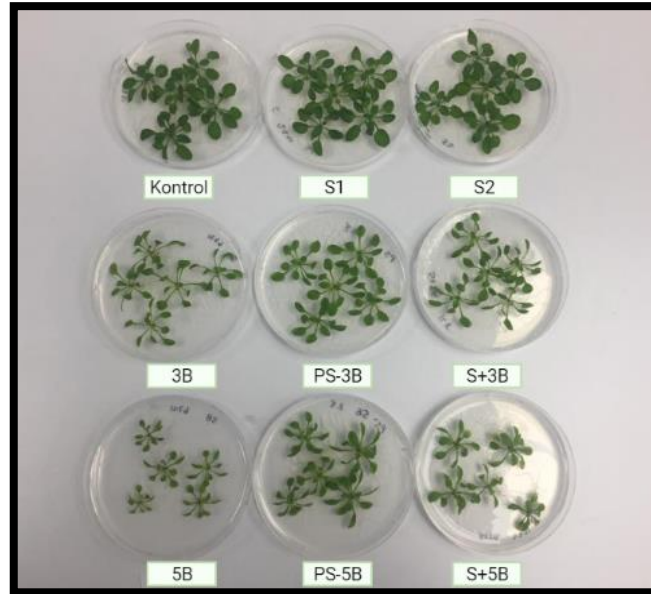
Denemeler rastgele deneme desenine göre 6 tekrarlı ve her bir tekrarda 5 bitki olacak şekilde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen verilere R istatistiksel yazılımı (R Core Team, 2014) için bir arayüz sağlayan R Studio programı (RStudio Team, 2016) kullanılarak istatistiki varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Her bir değişken için uygulamalar arasındaki farklar çoklu karşılaştırma testi olan Tukey ile %5 önem düzeyinde hesaplanmıştır. qRT-PCR verileri Student parametrik olmayan T-testi ile analiz edilmiştir ($P < 0.05$). Grafikler üzerindeki barlar standart hatayı göstermektedir ($\pm SH$).

4. BULGULAR

4.1. *A. thaliana*'da Sülfat Uygulamaları ile Bor Toleransının Kazanılmasında Belirlenen Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler

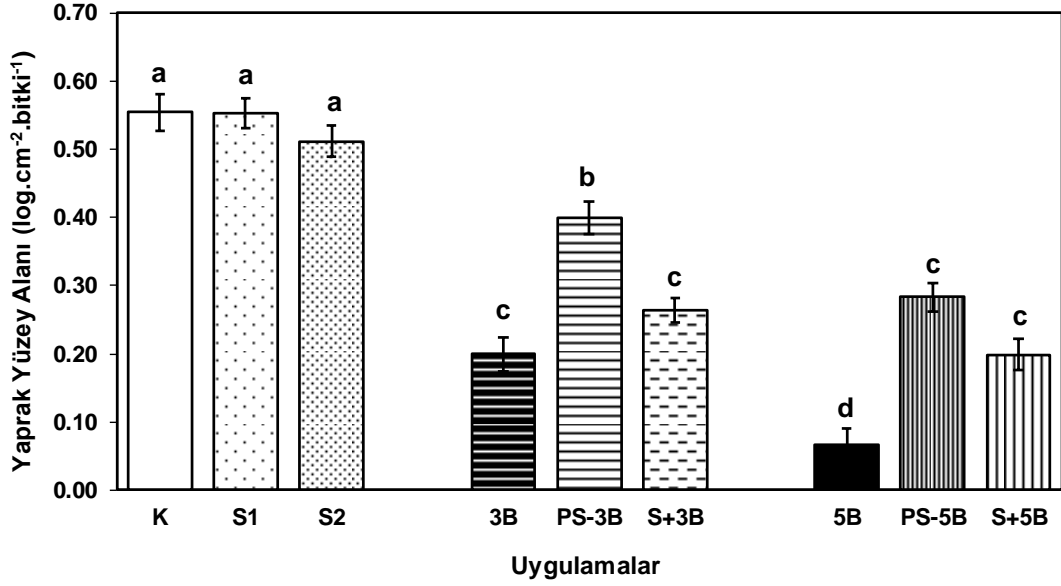
4.1.1. Bitki Büyümesi ve Yaprak Alanındaki Değişimler

Arabidopsis thaliana bitkilerinde, uygulamalara bağlı yaprak yüzey alanındaki değişimler ImageJ@ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Toksik B (3 mM B ve 5 mM B) ve/veya sülfat uygulamasına (ön veya birlikte) maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak yüzey alanları kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2.).



Şekil 4.1. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin deneme sonundaki genel görüntüsü

Bu azalma kontrole göre 3B için %64 iken 5B için ise %88 düzeyinde olmuştur. Bununla birlikte sülfat ön uygulama grupları, sadece bor uygulamalarına göre yaprak yüzey alanında artış sağlamıştır. Bu artışın 3B'a göre PS-3B gruplarında 2 kat, 5B'a göre PS-5B ise yaklaşık 4 kat olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2). Bununla birlikte 3B ve 5B'a göre birlikte sülfat uygulama (S+3B ve S+5B) gruplarında yaprak yüzey alanında sırası ile yaklaşık 1.3 kat ve 3 kat oranında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($P < 0.05$). Ancak, birlikte sülfat uygulamalarının iyileştirici etkisinin ön uygulamalardan daha az etkin olduğu görülmektedir.

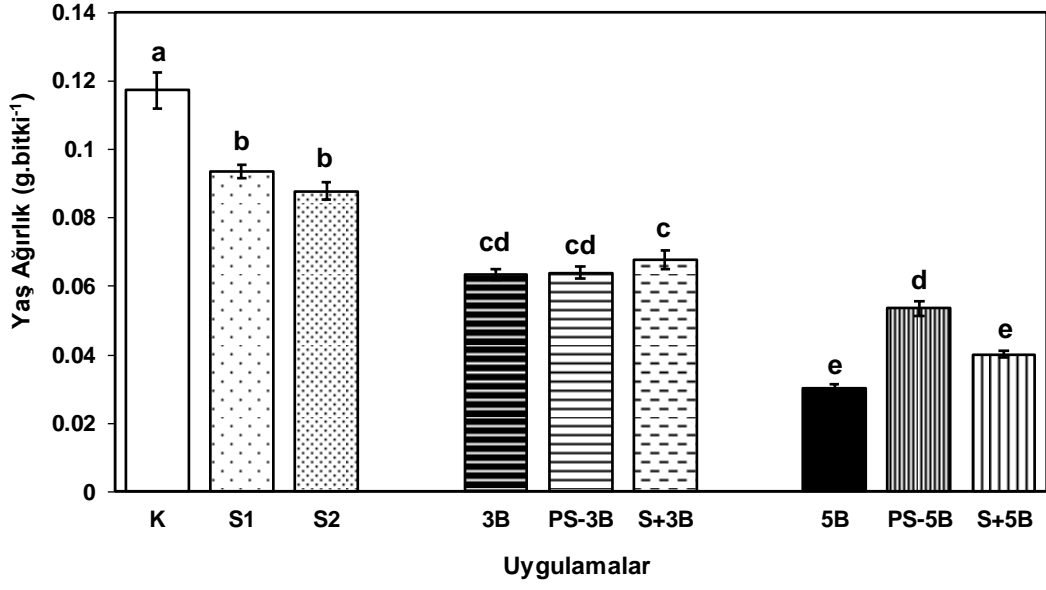


Şekil 4.2. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının yaprak yüzey alanı üzerine etkisi. Veriler normal dağılımlar sergilemediğinden logaritmik dönüşüm uygulanmış ve istatistiki analiz yapılmıştır.

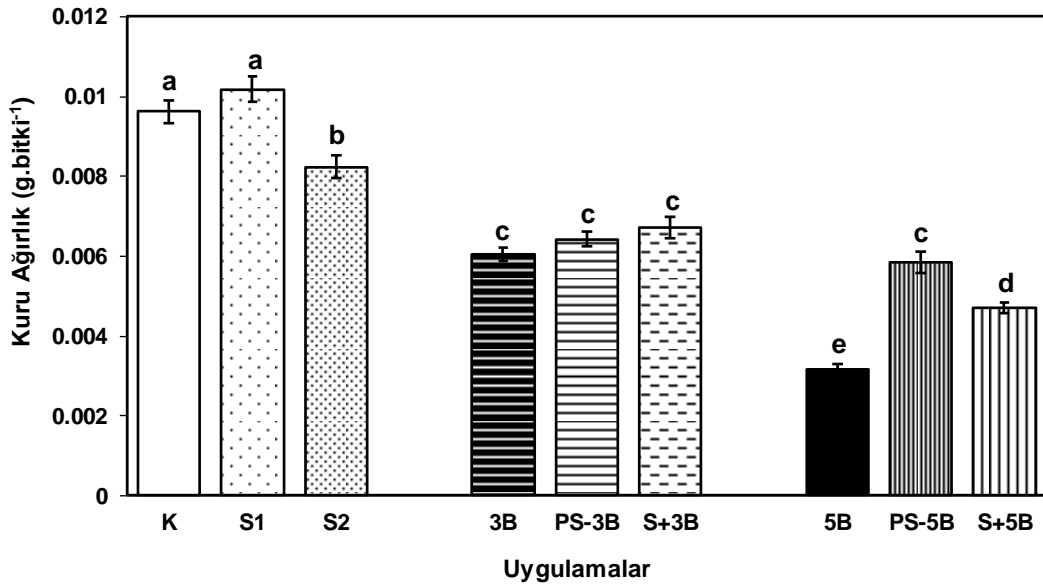
4.1.2. Bitki Biyokütlesindeki (Yaş ve Kuru Ağırlık) Değişimler

Arabidopsis bitkisinin uygulama gruplarına ait yaş ve kuru ağırlıkları incelendiğinde; kontrole göre 3B ve 5B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3 ve 4.4). Bitkilerin yaş ağırlıklarındaki bu azalmalar; 3B'da %46 olurken, 5B'de %74 oranında olmuştur ($P < 0.05$). Bitkilerin kuru ağırlıklarındaki azalma ise; kontrole göre 3B ve 5B'da sırası ile yaklaşık %37 ve %67 bulunmuştur. Buna karşın, sülfat uygulamaları 3mM bor toksisitesinde bitkilerin biyokütlelerinde önemli bir değişime yol açmamıştır. Bitkiler, PS-5B ve S+5B grupları 5B'e göre biyokütlede artış göstermektedir. 5B'e göre yaş ağırlıktaki artış PS-5B'de %77, S+5B için %33'tür. Kuru ağırlıkta bu artış sırasıyla %84 ve %48'dir. Biyokütledeki bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.3 ve 4.4).

Uygulamalar arası tolerans indeksleri incelendiğinde; orta dereceli toksisite gruplarındaki sülfat uygulamalarında değişim görülmemektedir, fakat yüksek toksisite gruplarındaki sülfat uygulamaları toksisiteye karşı tolerans kazanımı sağlamıştır. Özellikle sülfat ön uygulama grubunun (PS-5B), birlikte sülfat uygulamasına (S+5B) göre tolerans indeksinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.3. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının yaş ağırlık üzerine etkisi



Şekil 4.4. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi

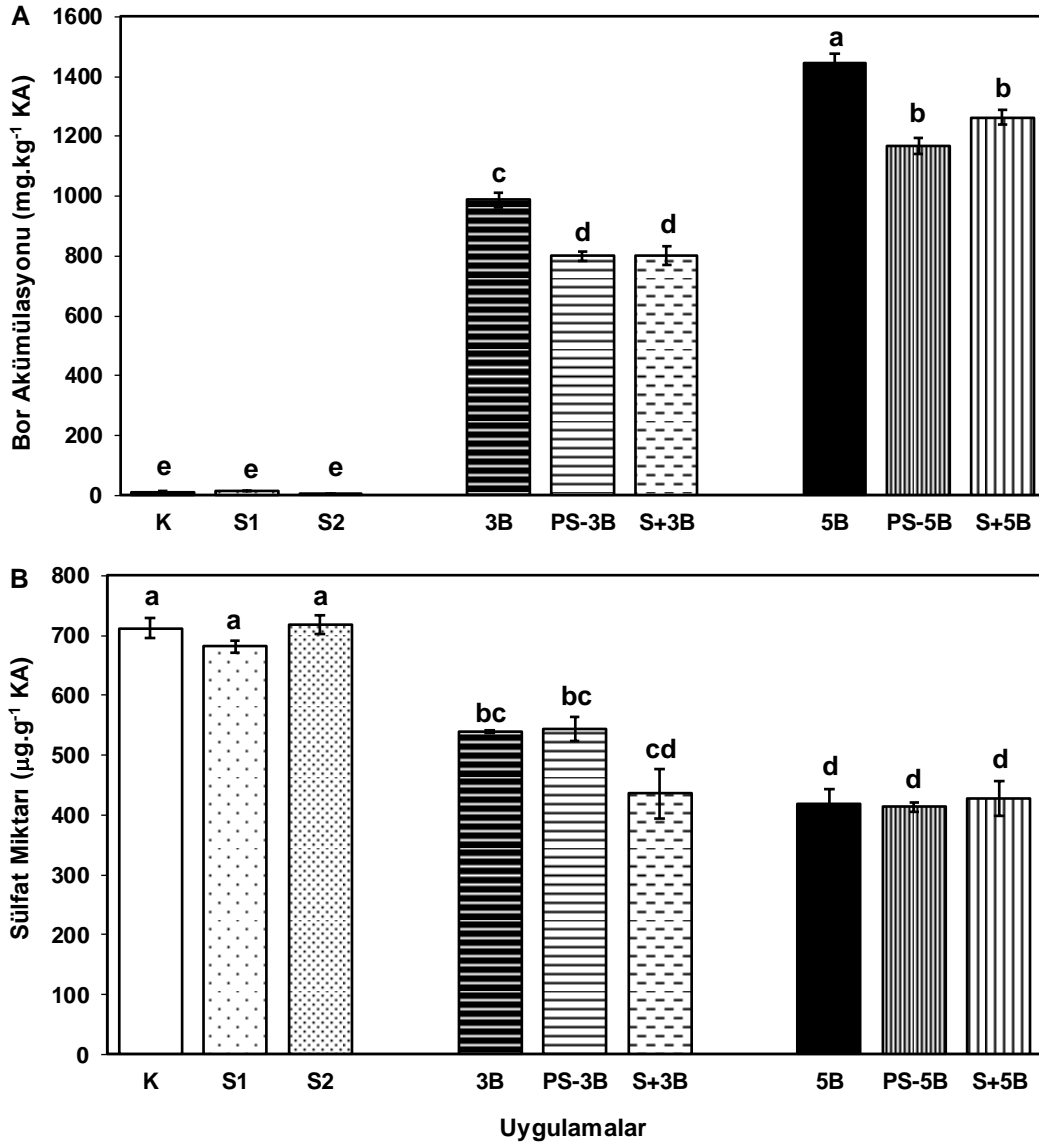
Çizelge 4.1. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarında *A. thaliana* bitkilerinin yaş (YA) ve kuru ağırlık (KA) değerlerinden hesaplanan tolerans indeksleri (Tİ)

UYGULAMALAR	YATİ (%)	KATİ (%)
S1	80	106
S2	75	86
3B	54	63
PS-3B	55	67
S+3B	58	70
5B	26	33
PS-5B	46	61
S+5B	34	49

4.1.3. Bor ve Sülfat Miktarlarındaki Değişimler

Artan toksik bor konsantrasyonuna maruz kalan Arabidopsis bitkilerinin kökleri vasıtasıyla aldığı bor elementinin, yapraklarındaki birikimi analiz edilmiştir (Şekil 4.5A). Arabidopsis bitkilerinin yapraklarında bor birikimi, toksisite artışına bağlı olarak kontrole göre yaklaşık 3B'da 79 kat, 5B'da ise 116 kat olduğu belirlenmiştir. En yüksek B birikimi, 5mM bor toksisite düzeyinde belirlenmiş olup, 1443 mg.kg kuru ağırlık⁻¹'tir. Bor toksistesine karşı tolerans kazanımının sağlanması için 3 mM konsantrasyonda Mg₂SO₄ tipi sülfat, ön sülfat uygulaması (PT) veya birlikte sülfat (S+B) uygulaması yapılmıştır. Her iki tip sülfat uygulamasında bor birikimi, 3B'a göre yaklaşık %19 oranda; PT-5B'da ve S+5B'da ise 5B'a göre sırası ile %19 ve 12 oranında daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5 A). Bu sonuçlar, sülfat ön uygulamasının (PT-B) birlikte uygulamaya (S+B) göre bor alımını azalttığı göstermektedir.

Bor birikimi bitkilerinin yapraklarında sülfat miktarının kontrollerine göre önemli düzeyde (P<0.05) azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.5 B). 5mM B uygulamasında 3mM B uygulamasına göre sülfat miktarının daha az olduğu saptanmıştır.

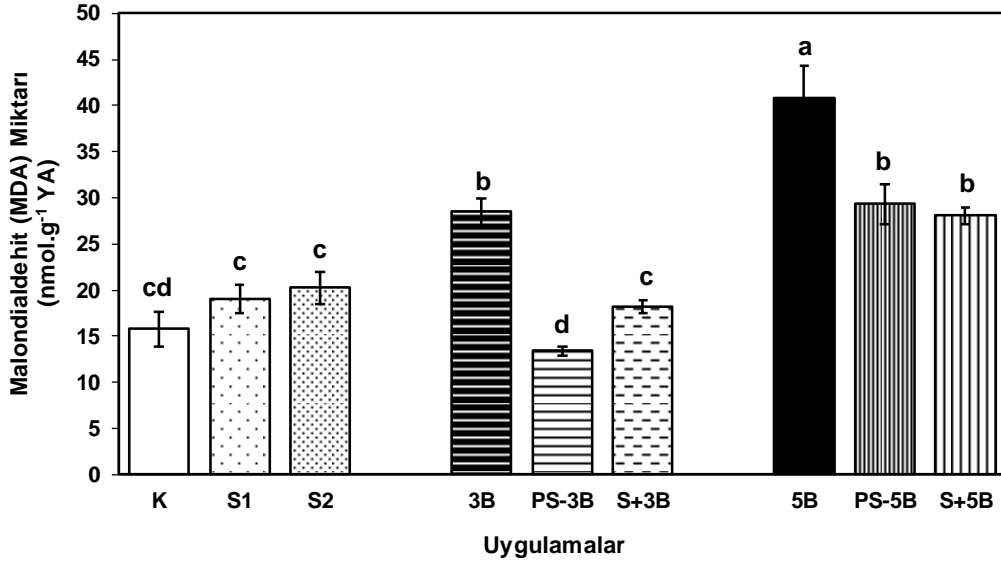


Şekil 4.5. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının bor (A) ve sülfat (B) miktarları üzerine etkisi

4.1.4. Membran Bütünlüğündeki Değişimler

Bor toksisiteye maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı kontrol grubuna göre önemli düzeyde artmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.6). Orta şiddetli toksisiteye (3B) karşı sülfat uygulamaları (PS-3B ve S+3B), oksidatif stres hasarını ortalama %45 civarında azalttığı belirlenmiştir. Yüksek şiddetli (5B) toksisite uygulaması, sülfat uygulamalarına göre (PS-5B ve S+5B) yaklaşık %30 daha fazla oksidatif hasara yol açmıştır (Şekil 4.6).

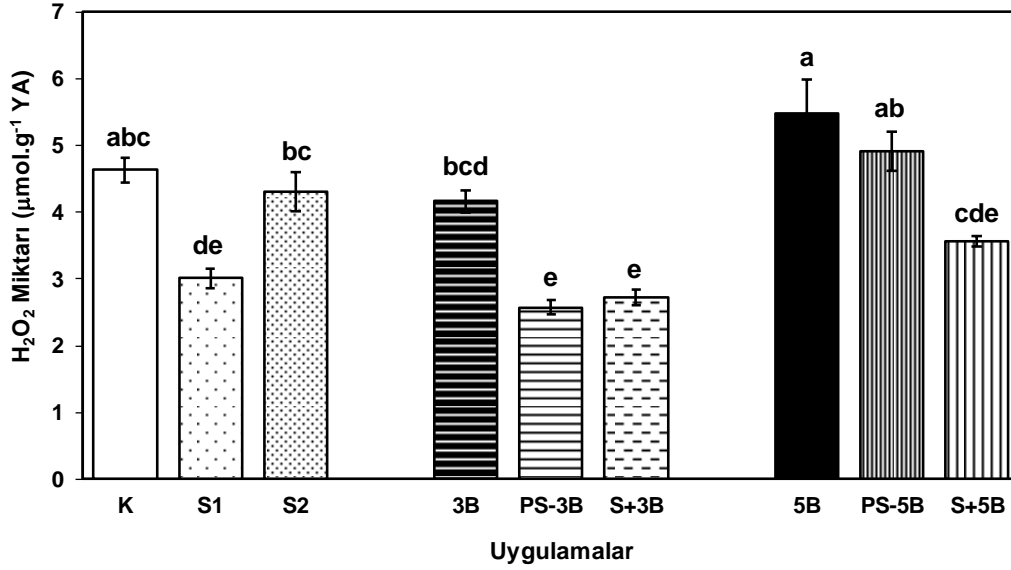
Sülfat uygulamaları (PS-B ve S+B) ise kontrol grupları gibi membran bütünlüğünü koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının MDA içeriği üzerine etkisi

4.1.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarındaki Değişimler

Arabidopsis thaliana bitkilerinde aktif oksijen türü olan H₂O₂ miktarı özellikle yüksek bor konsantrasyonunda (5B) istatistiksel açıdan önemli artış göstermiştir (Şekil 4.7). Sülfat uygulamalı 3 mM B toksisitesine (PS-3B ve S+3B) maruz bırakılan bitkilerin 3B uygulamasına göre hidrojen peroksit miktarının ortalama %36 azaldığı belirlenmiştir. Ancak, en yüksek B toksisitesinde (5B) sadece birlikte sülfat uygulamasında (S+5B), 5B'a göre %35 azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.7).



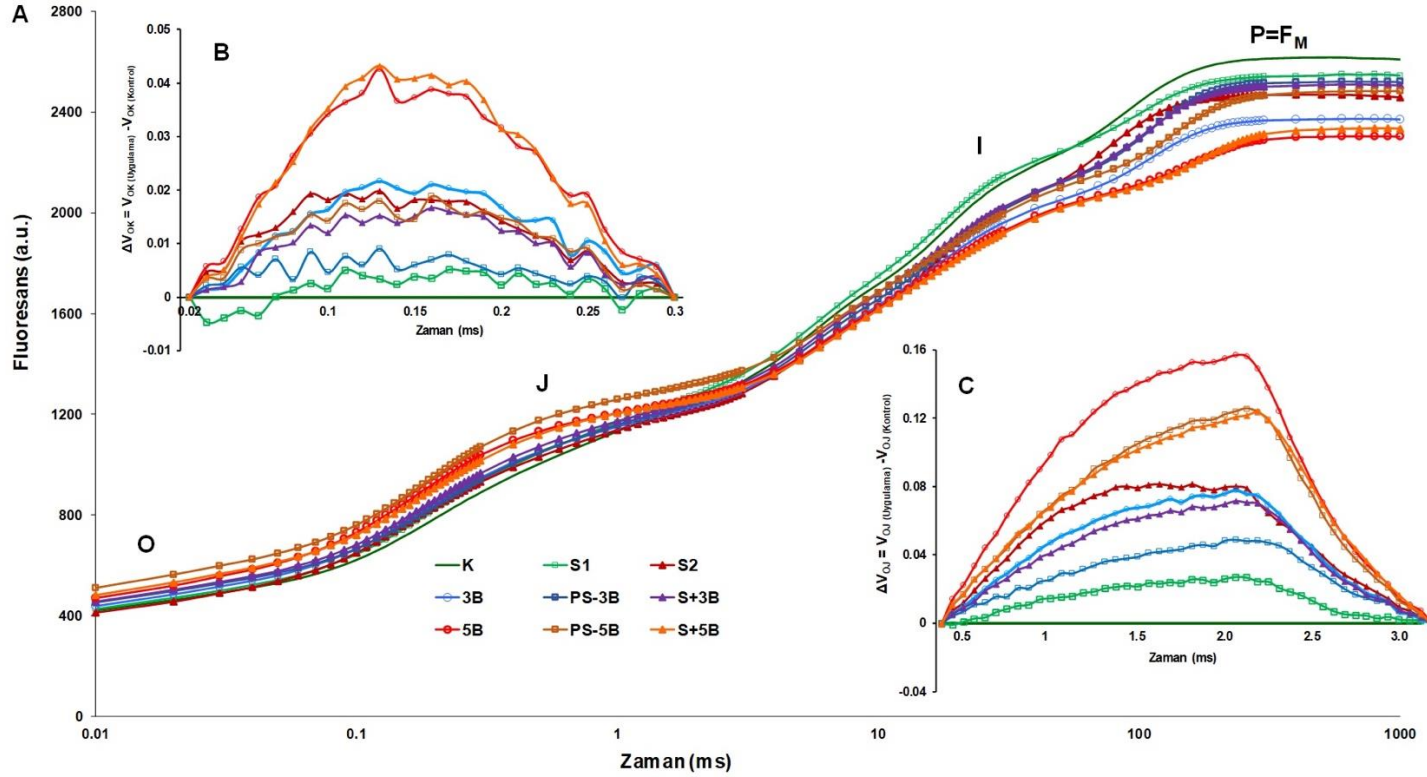
Şekil 4.7. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının H₂O₂ miktarı üzerine etkisi

4.1.6. Fotokimyasal Etkinlikteki Değişimler

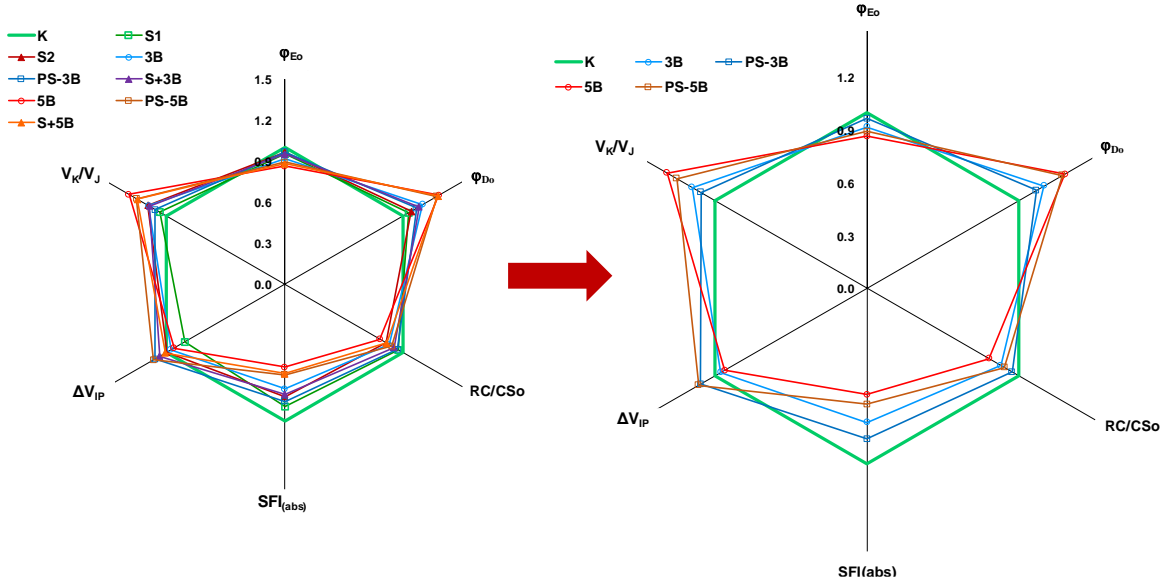
Polifazik klorofil floresans ölçümleri, toksik B ve/veya sülfat uygulamasına (ön veya birlikte) maruz kalan kontrol ve *Arabidopsis* bitkilerinin yapraklarının 30 dakika karanlığa uyumlanmasından sonra yapılmıştır. Floresans verilerinin analizi, fotosentetik aygıttaki enerji akışları teorisine dayanan ve JIP-Testi olarak adlandırılan hesaplamalara göre yapılmıştır. Bor toksisitesinin *Arabidopsis* yapraklarında belirlenen floresans yayılımları (transient) logaritmik zaman ölçeğinde grafiklendirilmiştir (Şekil 4.8). Polifazik floresans eğrisi [(O-J-I-P (Kautsky) eğrisi)]; O-J, J-I ve I-P olmak üzere üç temel basamaktan oluşmaktadır. Bu eğri, *Arabidopsis thaliana*'da toksik B düzeylerinin klorofil a floresans yayılımlarını etkilediği ve sülfat ön uygulamasının B toksisitesinin etkisini hafiflettiğini ancak 5mM B ile sülfatın birlikte uygulamasının iyileştirici etkisinin önemli olmadığını göstermektedir (Şekil 4.8A). Toksik B ve/veya sülfat uygulaması (ön veya birlikte) gruplarındaki bitkiler, kontrole göre değişimler göstermekle birlikte tipik OJIP polifazik artışı sergilemişlerdir. O ve J basamakları arasında sırası ile yaklaşık 150µs ve 300µs'de L ve K bandı olarak adlandırılan iki bant fotosentetik örneğin uygulama koşullarında kontrollerine göre fizyolojik durumundaki değişimleri göstermektedir (Şekil 4.8 B ve C). Bu iki bantta kontrole göre pozitif bir artış, fotosistemler arasındaki bağlantının (L bandı) ve oksijen oluşturuvcu kompleks (OEC)'nin (K bandı) uygulamalardan olumsuz etkilendiğini ifade

etmektedir. Bor uygulamaları kontrole göre L ve K bantlarında pozitif bir yükseliş yol açarak borun toksik etkisini göstermiştir (Şekil 4.8.B ve C).

Bor toksisitesine maruz kalan Arabidopsis bitkilerinde PS II'nin yapı ve fonksiyonelliği (SFI_{ABS}) olumsuz yönde etkilenmiştir (Şekil 4.9). Benzer şekilde, B toksisitesinin PSII'nin donör bölgesinde hasara (V_K/V_J) yol açtığı görülmektedir (Şekil 4.9) B toksisitesinin neden olduğu yapısal değişimlerin sülfat uygulamaları (PS-B ve S+B) ile önemli düzeyde hafifletildiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Bununla birlikte, uyarılma (eksiton) enerjisinin elektron taşınımına aktarımının kuantum verimi hakkında bilgi veren ϕ_{EO} (ET_O/ABS) değerleri Arabidopsis'te B konsantrasyonunun artışı ile anlamlı düzeyde azalmıştır (3B'da yaklaşık %10, 5B'da ise %14 oranında) (Şekil 4.9). Buna karşın, bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde fotokimya dışındaki enerji yayılımının kuantum verimini ($t=0sn$) ifade eden ϕ_{DO} (F_O/F_M) değeri istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır (3B'da yaklaşık %17, 5B'da ise %30 oranında) $P<0.05$) (Şekil 4.9). Ayrıca bor toksisitesi ile reaksiyon merkezi başına yakalanan enerjinin Q_A 'yi redükte etme kapasitesine sahip reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu gösteren RC/CS_o ; tüm uygulamalarda kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır. Bitkilerde artan B toksisitesi ile PS I'in akseptör (alıcı) bölgelerinin redoks durumu veya PS I'in kısmi miktarı hakkında bilgi veren ΔV_{IP} parametrelerindeki değişimler de incelenmiştir (Şekil 4.9). B toksisitesinin artışına bağlı olarak ΔV_{IP} değeri istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). Bitkinin fotosistemlerinde kuantum etkinliği ve enerji akış oranlarında B toksisitesinin meydana getirdiği değişimler sülfat uygulamaları ile hafifletildiği saptanmıştır (Şekil 4.9).



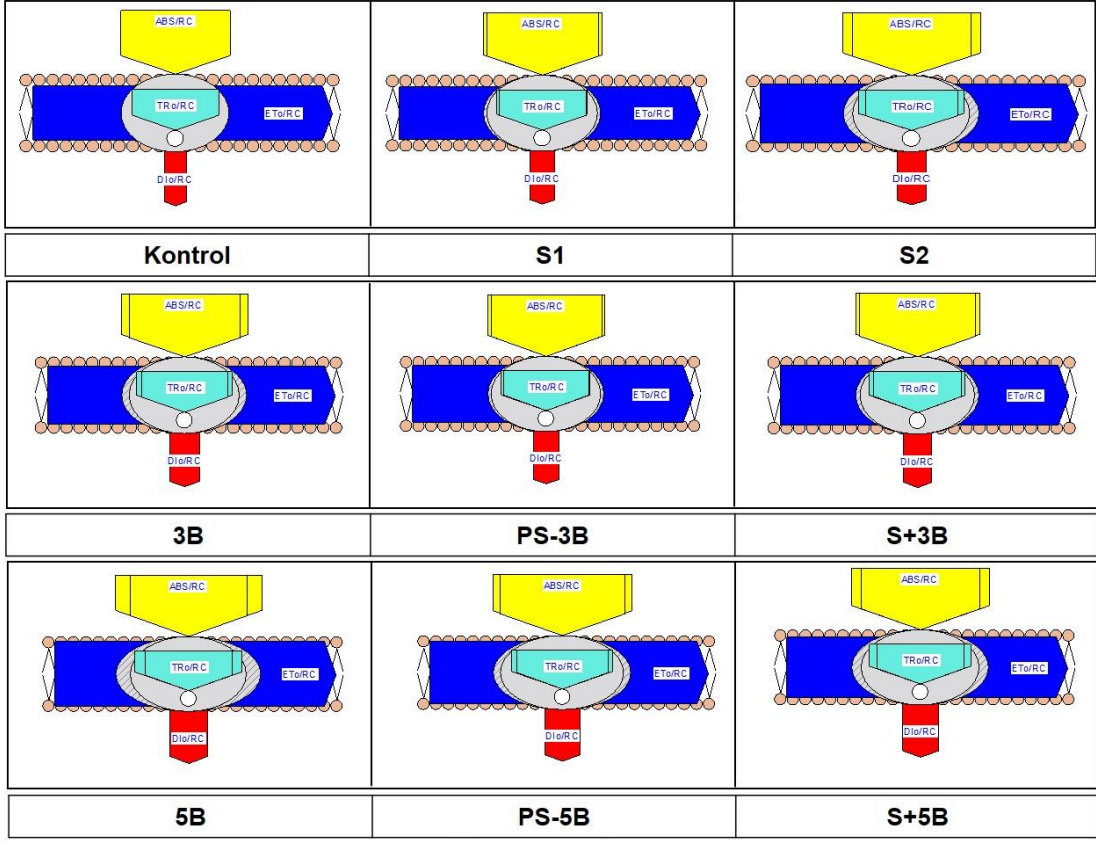
Şekil 4.8. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının *A. thaliana* bitkilerinin fotosentetik aygıtlardaki klorofil a floresans transienleri (A). Klorofil floresans yayılımları kaydedilmiş ve logaritmik zaman skalasında (0.01-1 s) grafikleri çizilmiştir. O ve J basamakları arasında sırası ile 150 μ s ve 300 μ s'de oluşan L (B) ve K (C) bantları.



Şekil 4.9. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamasının PSII'nin yapısal fonksiyonelliği (SFI), OEC'inde oluşan hasar durumu (V_K/V_J), eksitasyon enerjisinin kullanım etkinliği (ϕ_{E_o} ve ϕ_{D_o}), QA'yi indirgeyebilen reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu (RC/CS_o) ve PSI miktarı (ΔV_{IP}) üzerine etkileri (sağdaki grafik sadece B ve PS-B uygulamaları arasındaki değişimleri netleştirmek amacı ile sadeleştirilerek çizilmiştir)

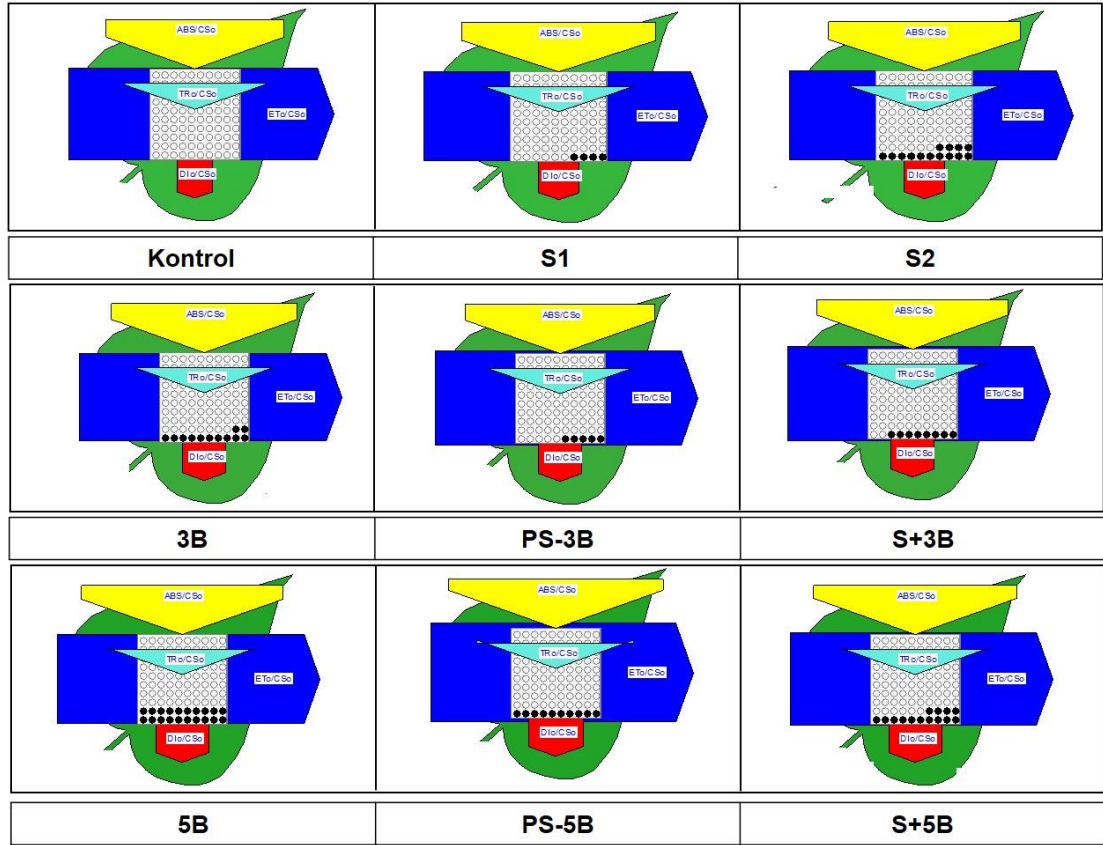
Toksik B ve/veya sülfat uygulamasına (ön veya birlikte) maruz kalan *Arabidopsis* bitkisinin PS II'deki spesifik ve fenomolojik enerji akışları sırası ile membran [reaksiyon merkezi başına (RC)] ve yaprak [yaprak alanı başına (CS_o)] *pipe-line* modeli ile incelenmiştir (Şekil 4.10 ve 11). Spesifik enerji akışları toksik B ve/veya sülfat uygulamalarından (ön veya birlikte) etkilenmiştir (Şekil 4.10): Spesifik akışları; reaksiyon merkezi başına absorbe edilen enerji (ABS/RC), yakalanan enerji akışı (TR_o/RC) ve elektron transportu (ET_o/RC) ve fotokimya dışında ısı şeklinde kaybedilen enerjiyi (DI_o/RC) ifade eden değerler, B toksisitesinin artışına bağlı olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($P < 0.05$). Sülfat uygulamaları ile membrandaki reaksiyon merkezleri başına meydana gelen bu etkilenmelerin hafifletildiği saptanmıştır (Şekil 4.10).

Membran Modeli (Spesifik Akışlar)



Uygulamalar

Şekil 4.10. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının *A. thaliana* bitkisinin yapraklarındaki spesifik enerji akışları (birim reaksiyon merkezi başına, RC). Okların boyutları, parametrelerin oransal değerlerini ifade etmektedir. Absorblanan (ABS/RC) ve yakalanan oksidasyon enerjisi (TR_o/RC), elektron taşınımı (ET_o/RC) ve fotokimya dışında kullanılan enerjisi (DI_o/RC) gösterilmiştir.



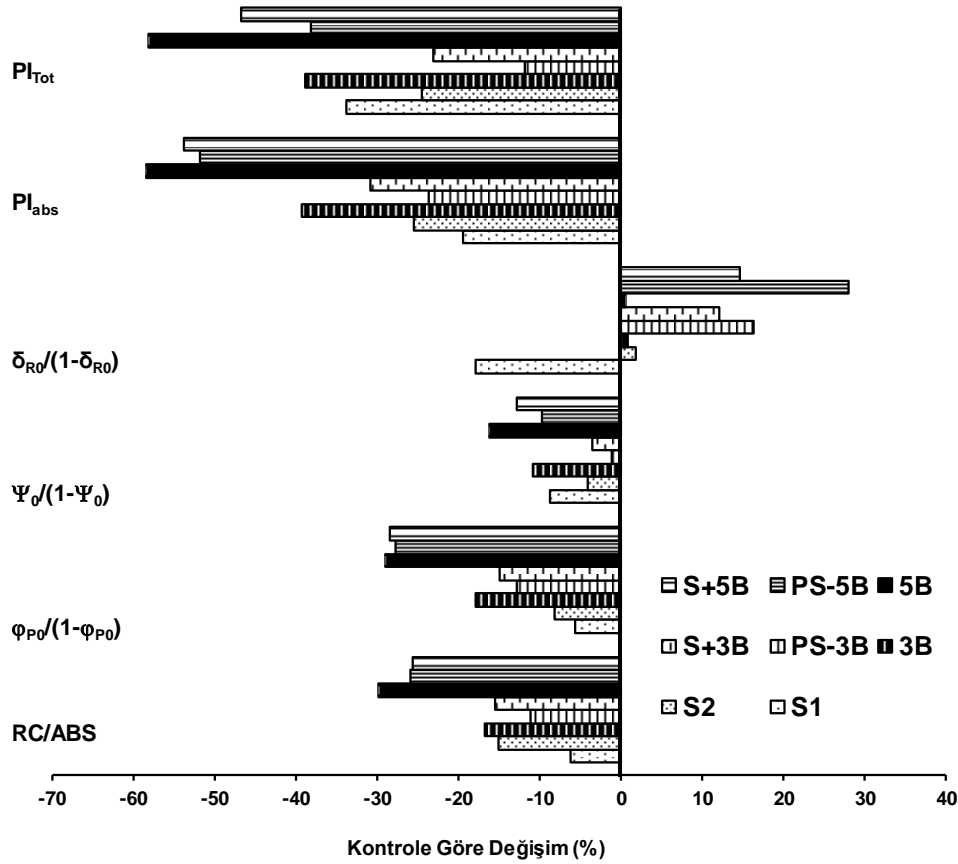
Uygulamalar

Şekil 4.11. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının *A. thaliana* bitkisinin birim yaprak alanı bazında enerji akışları (CS₀). Okların boyutları, parametrelerin oransal değerlerini ifade etmektedir. Absorplanan (ABS/CS₀) ve yakalanan oksidasyon (TR/CS₀) enerjileri, elektron transportu (ET/CS₀) ve fotokimya dışında kullanılan enerjisi (DI/CS₀) gösterilmektedir. Siyah noktalar inaktif, beyaz noktalar aktif RC'leri belirtilmektedir.

Bor toksisitesinin artışına bağlı olarak bitkilerin fenomenolojik enerji akışlarında da anlamlı değişimlerin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). Birim yaprak alanı başına soğurulan eksitasyon (uyarılma) enerjisi (ABS/CS₀), yakalanan enerji (TR₀/CS₀) miktarlarında özellikle toksik 5mM B konsantrasyonu kontrole göre önemli düzeyde artışa yol açmıştır (P<0.05). Absorblanan enerjinin fotokimyasal kullanımı (ET₀/CS₀) genel olarak önemli düzeyde bir değişim göstermemiş, enerjinin büyük bir kısmı ısı şeklinde (DI₀/CS₀) kaybedilmiştir. Bununla birlikte,

toksik bor uygulamaları tilakoid membranlarda inaktif reaksiyon merkezlerinin miktarında da artışa yol açmıştır.

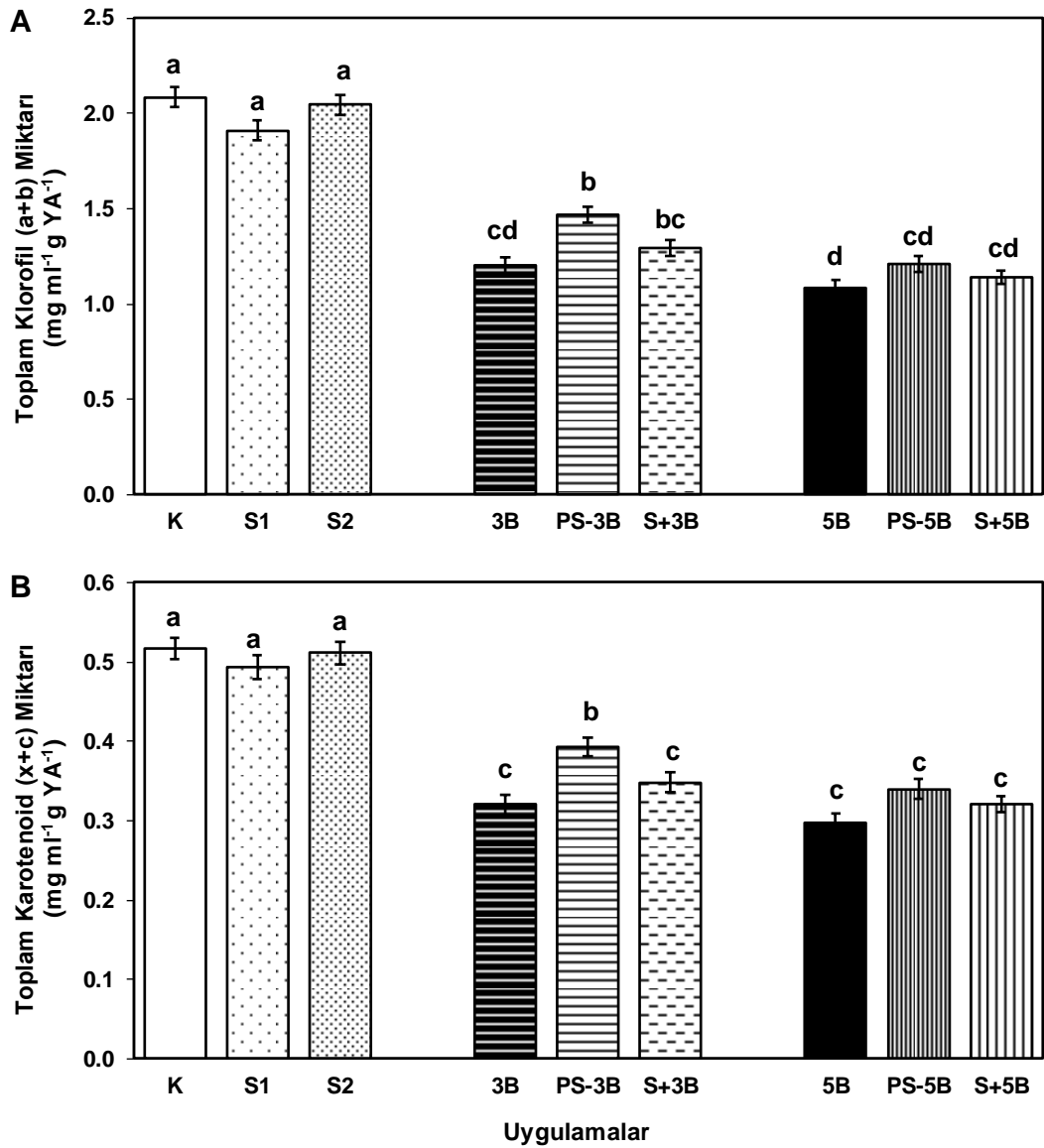
Bitkinin verimine doğrudan etki eden ve fotosentez süreci hakkında bilgi veren en hassas JIP Test parametrelerinden performans (canlılık) indeksleri (PI'leri - PI_{ABS} ve PI_{TOT}) incelendiğinde, B düzeyinin artışına bağlı olarak bitkilerde performans indeks parametrelerinin anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.12). PI_{ABS} ve PI_{TOT} 'deki bu azalmaların 3B'da %39 ve 5B'da, %59 oranında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). B toksisitesi altındaki bu etkilenme PI bileşenlerindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. PS II anten pigmentlerince reaksiyon merkezi başına indirgenen Q_A miktarı (RC/ABS) ile primer fotokimyasal reaksiyonun etkinliğindeki ($\phi_{PO}/(1 - \phi_{PO})$) azalma diğer bileşenlere göre daha fazladır. Sülfat uygulamaları özellikle sülfat ön uygulaması (PS-B) ile bor toksisitesinin PI'leri ve bileşenleri üzerindeki etkisini yaklaşık %20-25 oranında hafiflettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının *A. thaliana* bitkisinin total fotosentetik performans indeksi ve bileşenleri üzerine etkisi

4.1.7. Fotosentetik Pigment Miktarındaki Değişimler

Toksik bor düzeylerinin *Arabidopsis* bitkilerinin yapraklarında bulunan toplam klorofil a+b miktarının kontrole göre anlamlı düzeyde azalmasına yol açtığı ve toplam klorofil miktarındaki azalmanın her iki B konsantrasyonunda sırayla %42 ve %48 oranında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13A). Bor toksisitesinin neden olduğu klorozisin sülfat uygulamaları ile iyileştirildiği, ancak bu etkinin sadece PS-3B uygulamasında anlamlı olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Bitkilerin toplam karotenoid (x+c) miktarındaki değişimler, toplam klorofil (a+b) miktarındaki değişimlere benzer bir örüntü sergilemiştir (Şekil 4.13B).

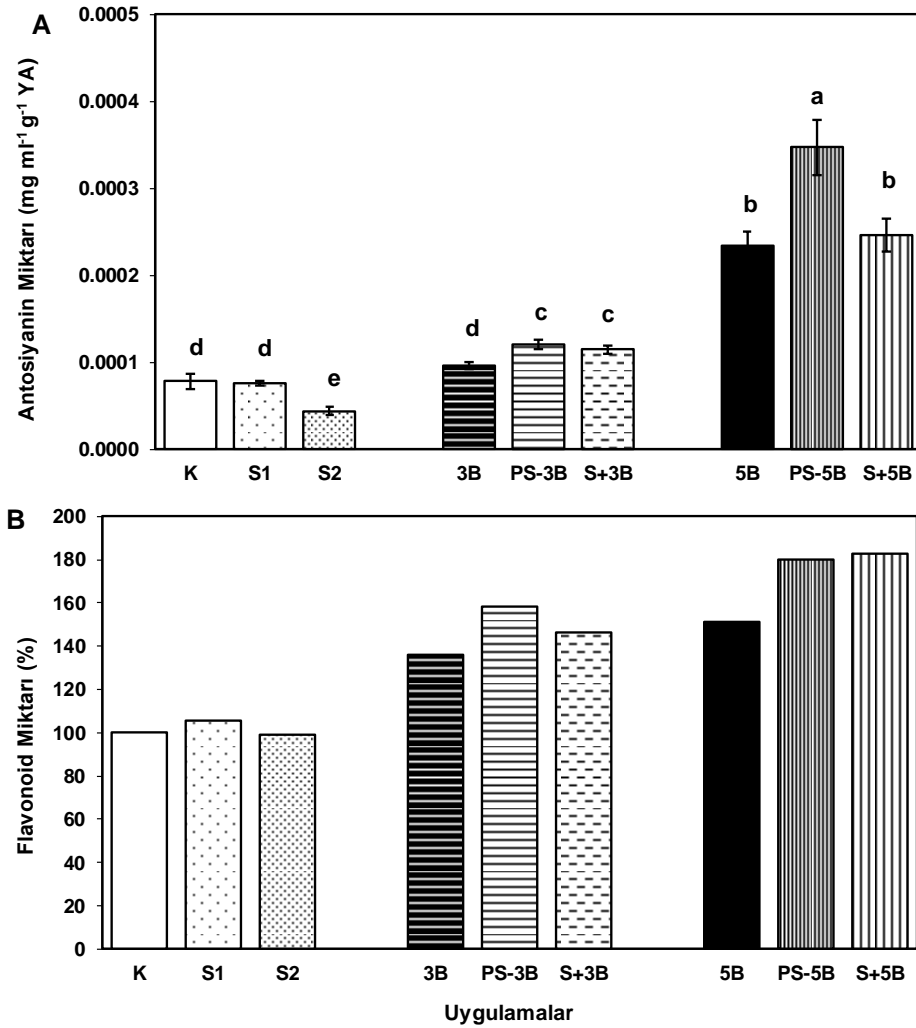


Şekil 4.13. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının toplam klorofil (a+b) (A) ve karotenoid içerikleri üzerine etkisi

4.1.8. Tolerans Kazanımında Savunma Sistemlerinin Rolü

4.1.8.1 Antosiyanin ve Flavonoid Pigment Miktarındaki Değişimler

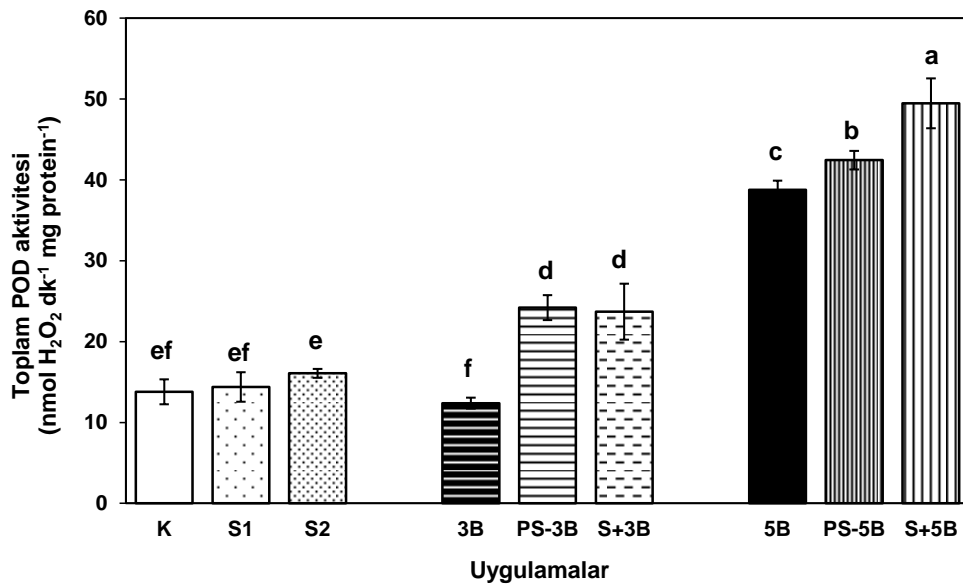
Bitkilerin yapraklarında ön (PS-3B) ve birlikte (S+3B) sülfat uygulamaları 3 mM B toksisitesine göre sırası ile %26, ve %20 oranında antosiyanin birikimine neden olmuştur. Bu etki, yüksek B toksisitesi altındaki bitkilerde sadece sülfat ön uygulamasında anlamlı bulunmuştur (%48) (Şekil 4.14A). Flavonoid miktarındaki değişimler antosiyanin ile uyumlu sonuçlar göstermiştir. Kontrole göre 3B ve 5B grubunda flavonoid miktarı (sırasıyla; %36, %51) artmıştır. Flavonoid miktarı 3B'ye göre PS-3B'de %17 ve S+3B'de ise %7 oranında birikime yol açmıştır. Bununla birlikte yüksek toksisiteye (5mM B) maruz kalan bitkilerin yapraklarına göre, flavonoid içeriği PS-5B ve S+5B uygulamalarında yaklaşık %20 artmıştır (Şekil 4.14B).



Şekil 4.14. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının antosiyanin (A) ve flavonoid (B) miktarlarına etkisi

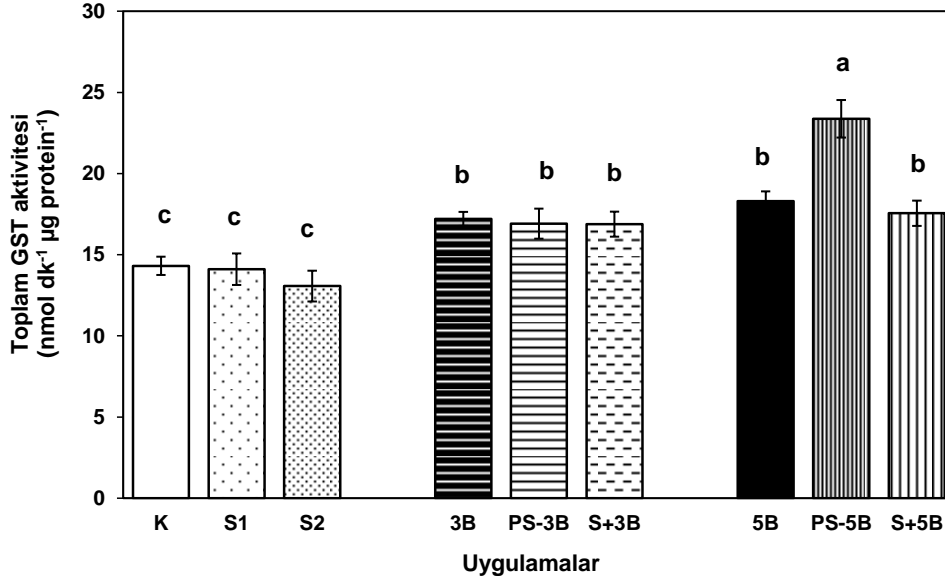
4.1.8.2. POD ve GST Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

Arabidopsis thaliana bitkisinin yapraklarında toksisite ile birlikte peroksidaz (POD) enziminin aktivitesi de artmıştır. POD aktivitesinin kontrole göre PS-3B'de %75 ve S+3B'de %72 düzeyinde arttığı belirlenmiştir. Kontrole göre POD aktivitesi yüksek toksik B düzeylerinde 2.8 kat, PS-5B'de 3.1 kat ve S+5B'de 3.6 kat artmıştır. PS-3B ve S+3B uygulamaları 3B'ye göre %90'dan daha fazla POD aktivitesinde artış göstermiştir. Yüksek toksisite uygulamalarında ise POD aktivitesi 5B'ye göre PS-5B'de %9, S+5B'de ise %28 kat artmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Glutasyon-S-Transferaz (GST) enziminin aktivitesi orta toksisite uygulamalarında (3B, PS-3B ve S+3B) birbirlerine göre anlamlı bir değişim göstermezken, bu uygulamalarında kontrole göre yaklaşık %19 oranında artmıştır (Şekil 4.16). Yüksek B toksisitesinde ise en fazla GST aktivitesi PS-5B'de belirlenmiştir (kontrole göre %63 artış). 5B uygulamasına göre GST aktivitesi sadece PS-5B uygulamasında anlamlı düzeyde artmıştır (%28).

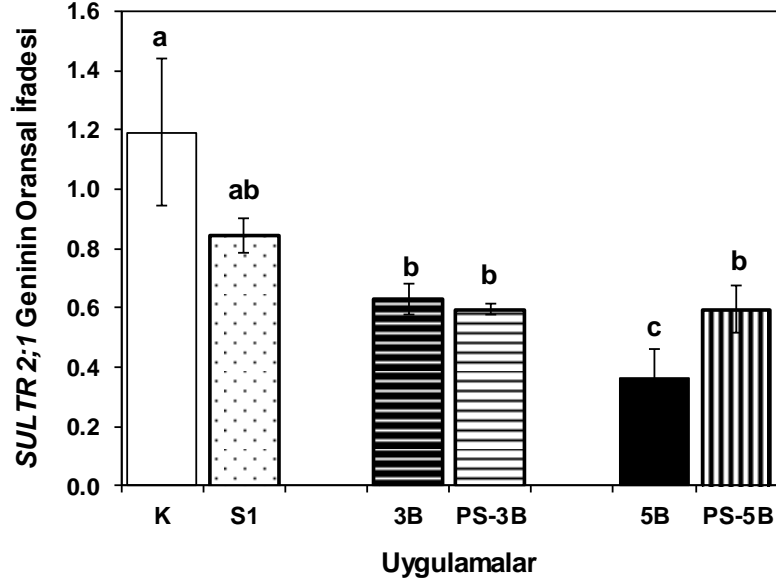


Şekil 4.16. *A. thaliana* bitkisinde sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarının GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.2. Sülfat ve/veya Toksik Bor Uygulamalarına Maruz Kalan *A. thaliana* Bitkisinde Sülfat ve Bor Taşınımında Yer Alan Bazı Genlerin Oransal İfade Değişimleri

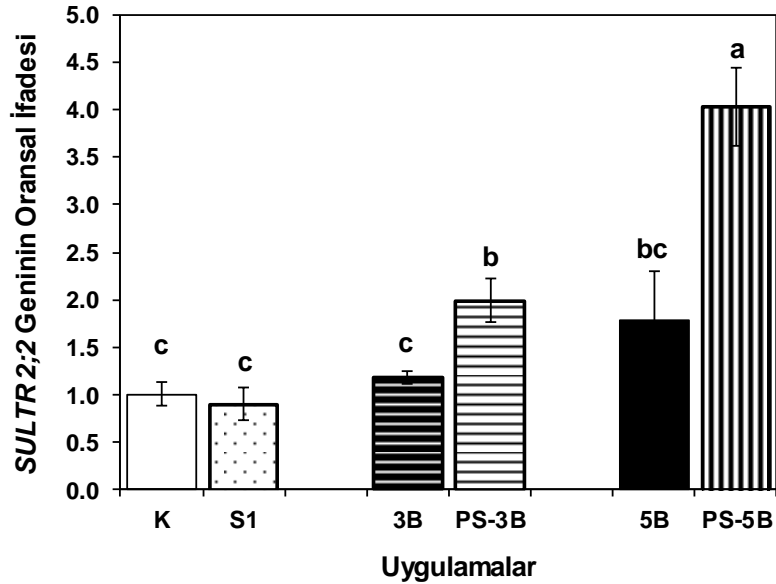
Tüm fizyolojik ve biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde, bor toksisitesine karşı tolerans kazanımında sülfat uygulamalarının etkili olduğu, ancak sülfat ön uygulamasının hafifletici etkisinin biraz daha fazla olması nedeni ile sadece sülfat ön uygulama grubu gen ifade analizlerinde kullanılmıştır.

Ön sülfat uygulamaları ile bor toksisitesine maruz bırakılan bitkilerde, bazı bor alımında ve sülfat alımı/atımında kritik rol oynayan taşıyıcılar ile ilgili genlerin oransal ifade değişimleri incelendiğinde; *SULTR 2;1* (Sulfate Transporter 2;1) geninin oransal ifadesi kontrole göre, sırası ile 3B, PS-3B, 5B ve PS-5B uygulamalarında %47, %50, %69 ve %50 oranında azalmaktadır ve bu azalma istatistiki olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). Ayrıca sülfat ön uygulamasında 5B'a göre *SULTR 2;1* geninin oransal ifadesi %63 artmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.17.)



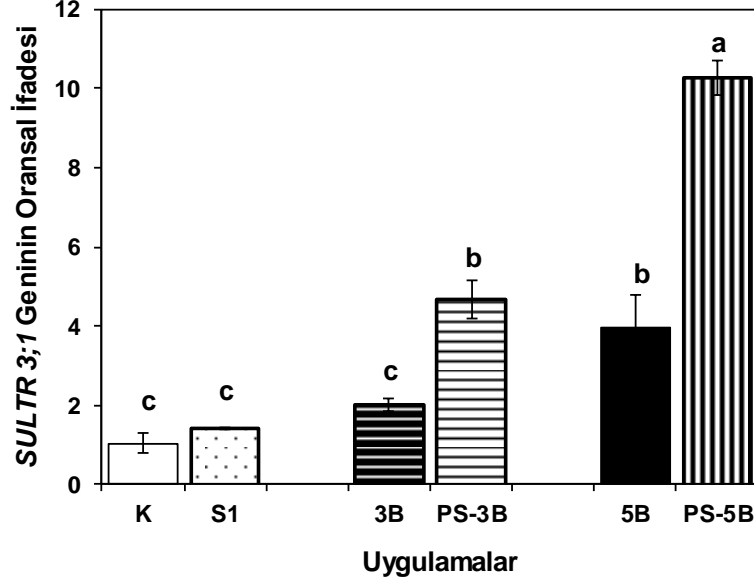
Şekil 4.17. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 2;1* geninin oransal ifadesi

SULTR 2;2 (Sulfate Transporter 2;2) geninin ifadesinde ön uygulama grupları (PS-3B ve PS-5B) toksisite ile paralel bir artış göstermektedir, bu artış kontrole göre sırasıyla yaklaşık 2 kat ve 4 kattır. Ayrıca PS-5B uygulaması 5B grubuna göre yaklaşık 2.2 kat, PS-3B'de ise 3B'ye göre 1.7 kat artış sergilemiştir ($P < 0.05$) (Şekil 4.18.).



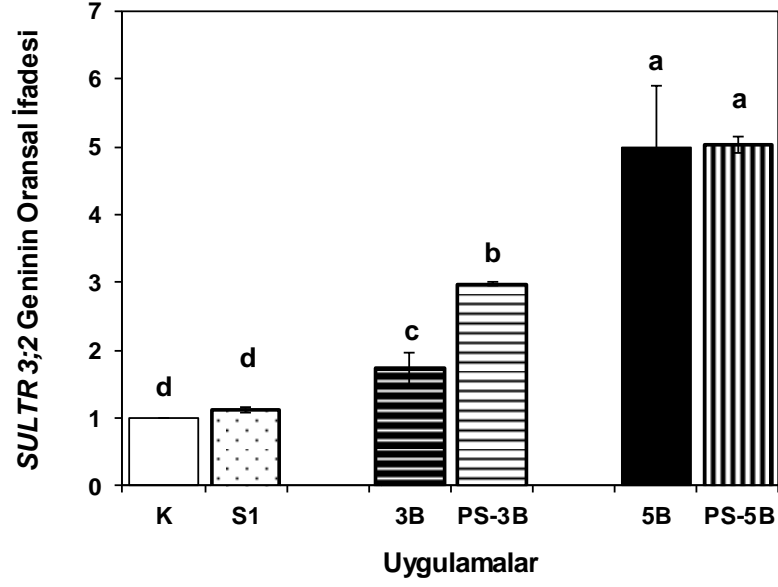
Şekil 4.18. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 2;2* geninin oransal ifadesi

Arabidopsis thaliana bitkisinde *SULTR 3;1* (Sulfate Transporter 3;1) geninin ifadesi kontrole göre, PS-3B, 5B, PS-5B uygulamalarındaki (sırasıyla yaklaşık 4.5 kat, 3.9 kat, 10 kat) artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). PS-3B uygulaması genin ifadesini 3B'a göre yaklaşık 2.3 kat arttırırken; PS-5B uygulaması 5B'a göre 5.2 kat arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.19.).



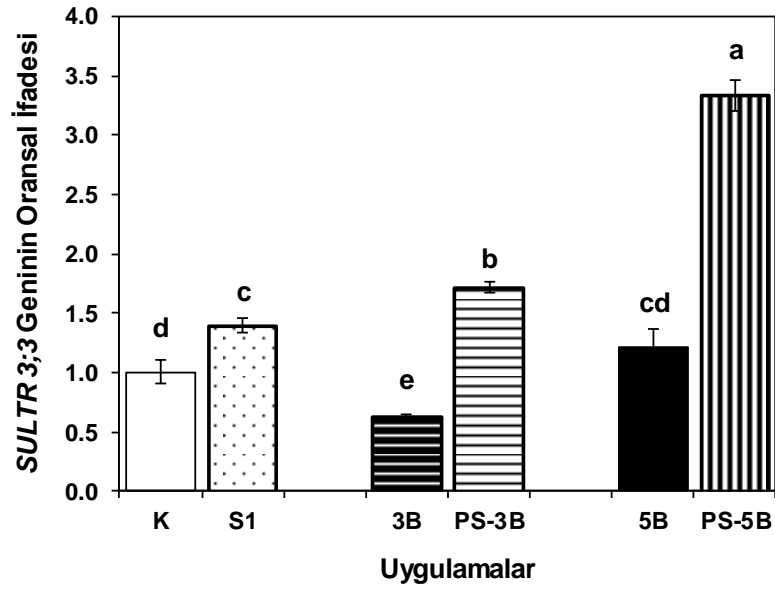
Şekil 4.19. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 3;1* geninin oransal ifadesi

Toksisite arttıkça *SULTR 3;2* (Sulfate Transporter 3;2) geninin oransal ifadesinde de artış görülmektedir. Kontrole göre genin ifadesinde artan bor toksisitesinin (3B ve 5B) sırasıyla 1.7 kat ve 5 kat; sülfat ön uygulamalarının (PS-3B ve PS-5B) ise 3 ve 5 kat artış sağladığı bulunmuştur (Şekil 4.20.). Ayrıca gen, PS-3B'de 3B'ye göre 1.7 kat ifade olmuştur ($P<0.05$). Ancak; 5B ve PS-5B arasındaki ifade değişimi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.20.).



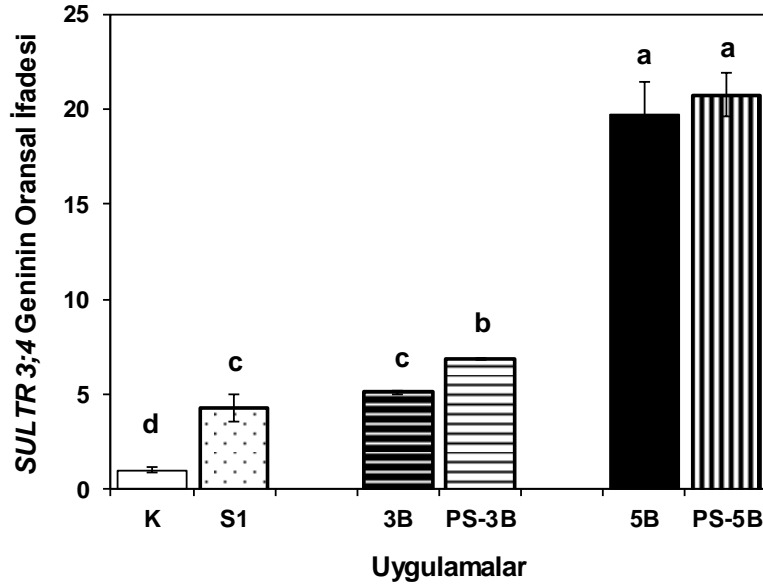
Şekil 4.20. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 3;2* geninin oransal ifadesi

SULTR 3;3 (Sulfate Transporter 3;3) geninin ifadesinde sadece ön uygulama gruplarında önemli düzeyde ifade olmuştur. PS-3B grubu 3B göre 2.8 kat artmıştır, PS-5B grubu ise 5B grubuna göre 5.4 kat artmıştır. *SULTR 3;3* geninin ifadesi 3B grubunda kontrole göre %40 azalırken, 5B grubunda ise kontrollerine göre %20 artmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.21).



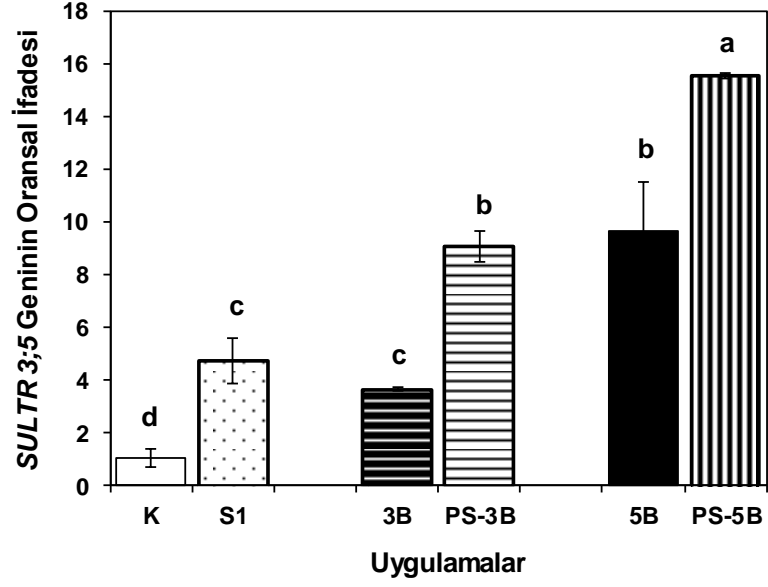
Şekil 4.21. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 3;3* geninin oransal ifadesi

SULTR 3;4 (Sulfate Transporter 3;4) geninde kontrole göre tüm uygulamadaki artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($P<0.05$). Ön uygulama grupları (S1, PS-3B ve PS-5B) kontrole göre sırasıyla 4.2 kat, 6.8 kat ve 21 kat artarken, ön uygulamasız toksisite uygulamalarında (3B ve 5B) genin ifadesi kontrollerine göre sırasıyla 5.1 kat ve 19.5 kat artmıştır. Ayrıca, bu genin ifadesindeki değişimler sadece orta düzeydeki toksik bor uygulamalarında (3B ve PS-3B) anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.22.).



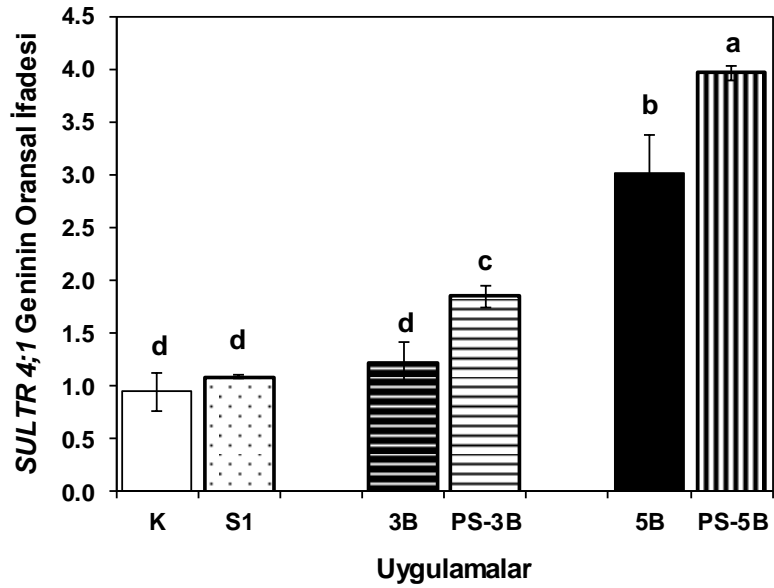
Şekil 4.22. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 3;4* geninin oransal ifadesi

SULTR 3;5 (Sulfate Transporter 3;5) geninin oransal ifade artışı kontrole göre bütün gruplarda istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) Ön uygulamalı ve uygulamasız gruplar arasındaki farklar ise PS-3B'de 3B'ye göre 2.5 kat artarken, PS-5B'de 5B'ye göre 1.6 kat artmıştır (Şekil 4.23).



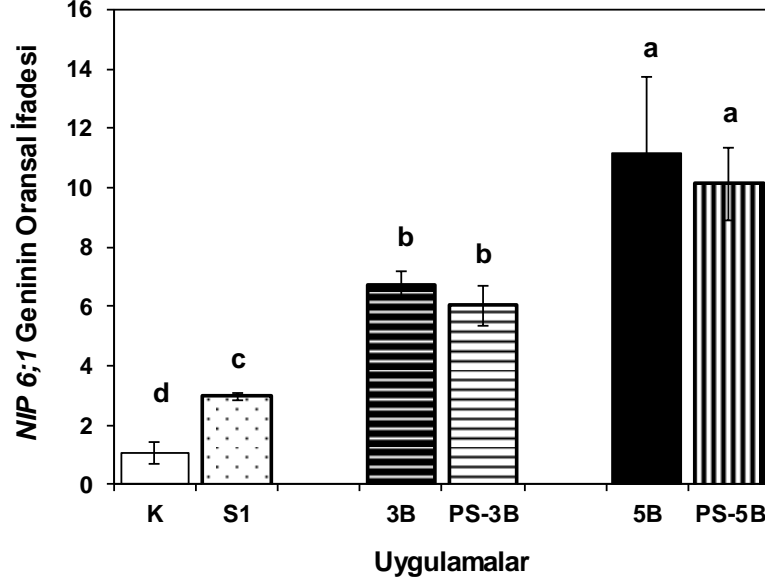
Şekil 4.23. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 3;5* geninin oransal ifadesi

SULTR 4;1 (Sulfate Transporter 4;1) geninin oransal ifadesi bor toksisitesinin artışına bağlı olarak artmış ancak bu etki sadece 5B’de anlamlı bulunmuştur. Bununla beraber sülfat ön uygulamaları genin ifadesi hem kontrole hem de bor uygulamalarına göre önemli düzeyde arttırmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *SULTR 4;1* geninin oransal ifadesi

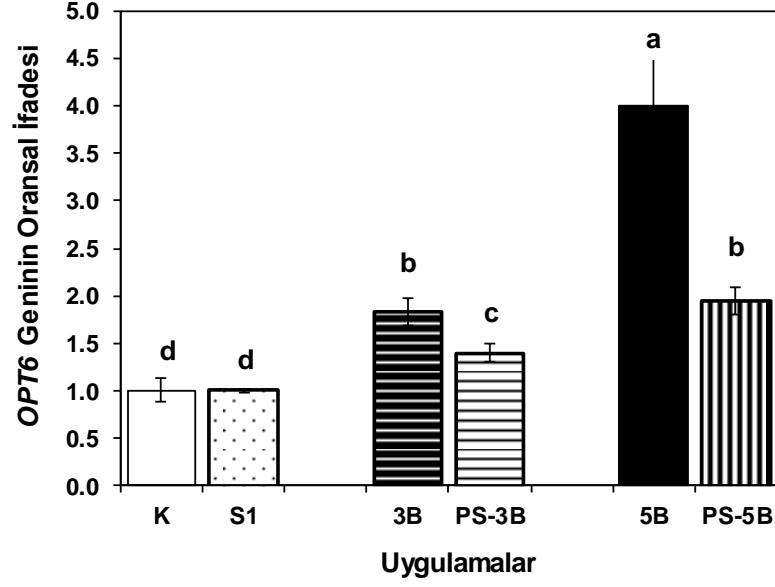
NIP 6;1 (nod6-Like Intrinsic Protein 6;1) geninin oransal ifadesinde kontrole göre tüm uygulamalardaki artışları istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$) (3-10 kat arasında artışlar). Buna karşın, sülfat ön uygulama ile bor toksisite grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.25.).



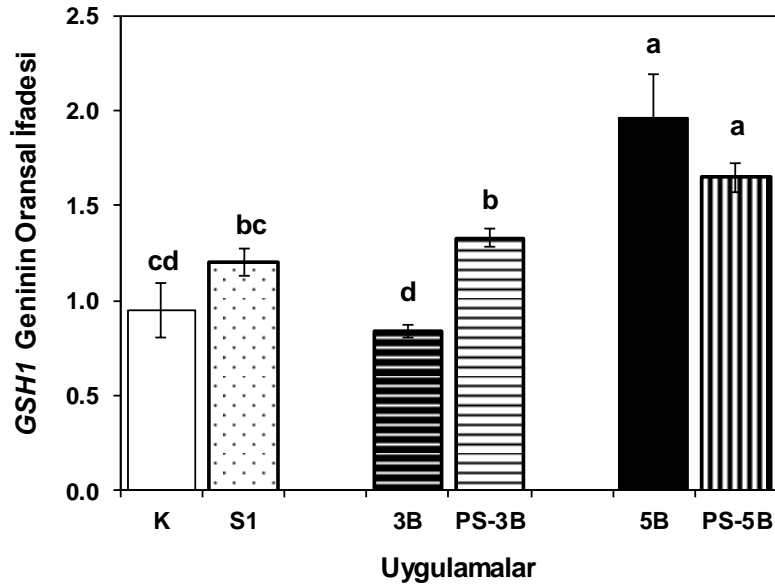
Şekil 4.25. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *NIP 6;1* geninin ifade oranları

OPT6 (Oligopeptide Transporter 6) geninin oransal ifadesinde tüm uygulamalarda kontrole göre önemli düzeyde artış gözlemlenmiştir. Genin ifadesi, sülfat ön uygulaması ile ön uygulamasız bor uygulamasına göre anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.26.).

GSH1 (Glutamate Cysteine Ligase) geninin kontrole göre ifadesindeki değişimin 3B uygulaması dışındaki diğer tüm bor uygulamalarında kontrole göre önemli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.27). Genin ifadesi, sülfat ön uygulaması 3B'a göre %58 oranında anlamlı şekilde artarken, PS-5B ve 5B grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 4.27.).

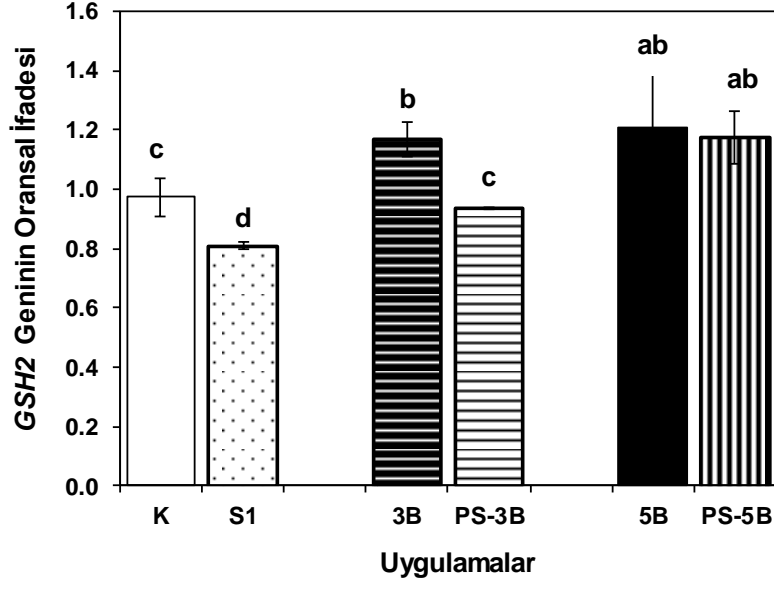


Şekil 4.26. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *OPT6* geninin oransal ifadesi



Şekil 4.27. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *GSH1* geninin oransal ifadesi

GSH2 (Glutathione Synthetase 2) geninin kontrole göre ifadesindeki değişim, PS-3B uygulaması hariç diğer tüm bor uygulamalarında kontrole göre önemli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.28.). Geninin ifadesi kontrole göre 3B, 5B ve PS-5B uygulamalarında yaklaşık %20 oranında artarken, sülfat ön uygulamaları uygulamasız gruplara göre ifadede azalmaya neden olmuş, ancak bu değişim sadece PS-3B'de önemli bulunmuştur.



Şekil 4.28. Sülfat ve/veya toksik bor uygulamalarına maruz kalan *A. thaliana* bitkisinde *GSH2* geninin oransal ifadesi

5. TARTIŞMA

Bitkiler için mutlak gerekli bir mikro besin maddesi olan bor elementinin, toksik düzeyleri, özellikle kurak ve yarı kurak bölge topraklarında üretim ve verimi etkileyen önemli bir tarımsal problemdir. Toksik bor düzeyleri bitkilerin pek çok metabolik süreçlerini ve hücre fonksiyonlarını etkilemekte ve bu etkilenme bitkinin türüne, gelişim evresine, toksisiteye maruz kaldığı süreye ve bor tipine bağlı olarak farklılık göstermektedir (El- Hamdaoui ve ark., 2003).

Son yıllarda bitkilerin bor toksisitesine karşı toleranslarını artırmak için, bazı uygulamalar yapılarak, tolerans kazanımı sağlanabilmektedir. Bitkilerin toksik bor düzeyleri ile birlikte tuz (Alpaslan ve Gunes 2001; Grieve ve ark., 2010; Esteban ve ark., 2016; Huanca-Mamani ve ark., 2018), kalsiyum (Siddiqui ve ark., 2013), nitrik oksit (Esim ve Atıcı, 2013), silikon (Akçay ve Erkan, 2016; Kaya ve ark., 2020a), mannitol (Çoşkun ve ark., 2014), benzoik asit (Farghaly ve ark., 2022), giberellik asit (Kaya ve ark., 2020b) ve arbuskular mikoriza (Liu ve ark., 2018) gibi uygulamalara maruz bırakıldığında, bor toksisitesinin neden olabileceği hasarları hafifletilebileceği bildirilmiştir. Bitkinin tolerans kazanımında bor, ya bu maddeler ile yarışa girerek ya da bor toksisitesinin neden olduğu oksidatif hasarı azaltarak rol almaktadır. Birçok araştırmada bor kazanımı birlikte uygulamalar ile ilişkilendirilmektedir. Bunun yanı sıra, çeşitli metallerin (Se, Mn, Mg, Cd, Zn, Cr vb.) detoksifikasyonunda kükürt içeren bileşiklerin rolü ile ilgili literatürde çalışmalar bulunmaktadır (Khan ve ark., 2015; Sheng ve ark., 2016; Singh ve ark., 2017; Adhikari ve ark., 2018; Terzi ve Yıldız, 2021). Bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde kükürt bağımlı detoksifikasyon ve kükürt yolağındaki süreçler ile ilgili çok sınırlı bilgi bulunmaktadır (Kayıhan ve ark., 2019). Ancak, bor toksisitesine karşı sülfat ön veya birlikte uygulamaları ile tolerans kazanımında kükürt metabolizmasının rolü ile ilgili araştırmalara literatürde rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, iki farklı toksik bor konsantrasyonunda (3 ve 5mM) sülfat ön uygulamalı ve uygulamasız grupların yapraklarındaki bor ve sülfat birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.5A ve B). Bitki kökleri ile alınan bor, kök hücrelerine hücre zarından pasif difüzyon yoluyla ve/veya kanal proteinleri aracılığı ile

alınabilmektedir (Dordas ve ark., 2000; Pereira ve ark., 2021). Bunun yanı sıra, bor elementinin kökten yapraklara kadar olan uzun mesafelere taşınımı ise transpirasyon akımı ile hem ksilemle, hem de floem ile bazı bileşikler kompleks oluşturarak (polioller -şeker alkoller-) taşındığı bildirilmektedir (Landi ve ark., 2019; Brdar-Jokanović, 2020; Pereira ve ark., 2021). Bor konsantrasyonunun artışına bağlı olarak klorozis semptomlarının ve yapraklarındaki bor birikiminin arttığı, bu etkinin sülfat uygulamaları ile önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1, 4.5A ve 4.13A). Sülfat uygulamaları yapılan gruplarda sülfat miktarının her iki toksik B grupları içinde önemli düzeyde değişim göstermemesi ve B birikiminin azalması, bu gruplarda alınan sülfatın metabolize edildiğinin bir göstergesi olabilir (Şekil 4.5A ve B). Buna ilaveten SULTR3 ve SULTR4 grupları sülfat taşıyıcılarının gen ifade artışları sülfatın alındığını ve B tolerans kazanımında işlev gördüğünü düşündürmektedir (Şekil 4.19-24). B toksisitesi birikimine bağlı olarak bitkilerin biyokütlesinde de önemli bir azalmaya neden olduğunu saptanmıştır (Şekil 4.3 ve 4). Sülfat uygulamalarının yüksek B toksisitesine maruz kalan bitkilerde büyüme inhibisyonunu önemli ölçüde hafifletmiştir. Yaprak yüzey alanındaki değişimlerin aynı örüntüyü sergilediği, sülfat uygulamasının toksik bor düzeyinin olumsuz etkilerini iyileştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlar, sülfat ve B elementinin alımında ve taşınımında bir yarışın olmadığını, sülfat uygulamalarının B alımını daha iyi düzenlenerek, sınırlandırıldığını ve böylece B toksisitesinin olumsuz etkilerinin hafifletildiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, sülfat beslemesinin Mn, Cr ve Cd ile yapılan çalışmalarda toksisitesinin iyileştirilmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Sheng ve ark., 2017; Singh ve ark., 2017; Adhikari ve ark., 2018).

Bor toksisitesi membranlarda lipid peroksidasyonlarına neden olarak, membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır (Hua ve ark., 2021). Bitkilerde MDA miktarı, bor toksisitesinin artışa bağlı olarak kontrole göre önemli düzeyde (yaklaşık 2 – 2.6 kat) artmıştır (Şekil 4.6). Sülfat uygulamaları MDA miktarını toksik bor uygulamalarına göre önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuç, sülfat uygulamalarının membran bütünlüğünün borun toksik etkilerine karşı korunduğunu ortaya koymaktadır.

Bitkilerde bor toksisitesinin etkilediği en önemli metabolik süreçlerinden biri de fotosentezdir (Han ve ark., 2009; Landi ve ark., 2013) ve klorofil a fluoresans

ölçümleri ile bu olumsuz etkilenme detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur. Klorofil a floresans yayılımındaki (transientler) değişimler, fotosentetik aygıtlardaki eksitasyon enerjisinin kullanımı ve elektron taşınımı ile ilişkili süreçler hakkında ayrıntılı bilgi sağlayarak, bitkilerin stres altındaki fizyolojik durumunu ortaya koymaktadır (Kalaji ve ark., 2016; Chen ve ark., 2016). Fotosistemlerin redoks durumundaki değişiklikleri yansıtan OJIP eğrisinin şekli, çevresel streslere karşı oldukça değişkenlik sergilemektedir (Strasser ve ark., 2004; Umar ve ark., 2019). Bu çalışmada da bor toksisitesinin bitkilerin floresans geçişlerini olumsuz yönde etkilediği ve bu etkinin sülfat uygulamaları ile hafifletildiği görülmektedir (Şekil 4.8A). Bitkiler, tüm B ve sülfat uygulamalarında tipik OJIP polifazik artışı sergilemişlerdi: O ve J fazları arasında fotosentetik örneğin uygulama koşullarındaki fizyolojik durumunu gösteren K ve L bantları da bor toksisitesinden etkilenmiştir. PSII birimleri arasındaki enerjisel bağlantı veya işbirliği L-bandı analiz edilerek ortaya konulur (Oukarroum ve diğerleri 2007, Tsimilli-Michael ve Strasser 2008). Pozitif L-bandı değerleri, düşük enerji bağlantısını ve olumsuz etkilenmeyi, diğer bir ifade ile tilakoid membranlardaki ayrışmayı göstermektedir (Yusuf ve ark. 2010; Sharma ve ark. 2014; Chen ve ark., 2021). Bu çalışmada, toksik bor düzeylerinde gözlemlenen daha yüksek pozitif L-bandı genliği; sistemin daha az kararlılığını ve/veya PSII birimler arasındaki iş birliğinde azalma olduğunu ya da tilakoid membranların bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir (Şekil 4.8B). Bununla birlikte sülfat uygulamaları, muhtemelen bitkilerin uyarılma enerjisini daha verimli kullanmasını ve sistemin daha kararlı olmasını sağlamıştır. K bandı ise; oksijen oluşturan kompleksten (OEC) P680 reaksiyon merkezine elektron transferini ifade etmektedir (Skotnica ve ark., 2000). K bandında belirlenen büyük pozitif genlik, PSII 'nin akseptör (alıcı) ve donör (verici) bölgeler arasındaki dengesizlikle ilişkili olup oksijen oluşturan kompleksin (OEC) bozunumunu göstermektedir (Strasser ve ark., 2004; Martinazzo ve ark., 2012; Li ve ark., 2014; Gururani ve ark., 2015). Artan bor toksisitesi ile oluşan yüksek pozitif K bandı PSII'ye doğru olan elektron taşınımındaki güçlü sınırlanmayı sülfat uygulamalarına göre daha belirgin şekilde ortaya koymaktadır (Şekil 4.8C). Bunun yanı sıra, OEC'nin inhibisyonu ve muhtemel hasarını belirten V_k/V_j değeri de Arabidopsis bitkilerinde K bandında gözlenen trende benzer şekilde bor toksisitesinin artışına bağlı olarak arttırırken (yaklaşık %15-%32),

sülfat uygulamaları ile bu olumsuz etkinin hafifletildiği saptanmıştır (Şekil 4.9). Buna karşın toksik bor düzeylerinde RS/CSo'nun azalışı Q_A 'yi indirgeyen reaksiyon merkezlerinin miktarının azaldığını ifade etmektedir (Şekil 4.9). ϕ_{EO} değerlerinde belirlenen değişimler, B toksisitesi altında absorblanan eksitasyon enerjisinin elektron taşınımında etkin bir şekilde kullanılmadığı ve bu durumun kuantum verimini negatif etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.9). Ayrıca bor toksisitesi (3 ve 5mM B) PSII/PSI oranını veya PSI'in kısmi miktarını yansıtan (Ceppi ve ark., 2012; Umar ve ark., 2019; Arslan, 2022) ΔV_{IP} değerini azaltırken, her iki sülfat uygulamalarında da hem kontrole hem de bor uygulamalarına göre artmıştır (Şekil 4.9). I-P faz genliğinin boyutu (ΔV_{IP}) NADP ve ferredoksinin (Fd) indirgendiği PS I'in etrafındaki elektron taşıma kapasitesi hakkında da bilgi sağlar. Bu bulgular, PSI'in bor toksisitesinden olumsuz etkilendiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yüksek bor konsantrasyonlarında bitkiler tarafından absorblanan enerjinin fotokimyadan çok, ısı formunda kaybedildiği [ϕ_{DO} (F_O/F_M)'de artış] ve fotokimyasal kullanımın azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). D_I/RC 'de artışlarda bu sonucu desteklemektedir (Şekil 4.10). Fotokimyasal olmayan yatıştırma oksijen oluşturan komplekslerin etkinliğindeki sınırlama ile bağlantılı olabilir (Sun ve ark., 2016). B toksisitesi altındaki bitkilerin PSII'lerinin muhtemelen çok fazla inaktif reaksiyon merkezine sahip olması ve PSII akseptör bölgesinin redükte olması nedeni ile donör kısımdan (OEC'den) gelen elektronları kabul edememektedir. Bunlara ilaveten, PSII'nin yapısal ve fonksiyonelliğini yansıtan $SFI_{(ABS)}$ değerindeki azalma fotosentetik yapıda hasarın olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.9). B toksisitesinin (3 ve 5mM B) fotosistemlerde yol açtığı yapısal ve fonksiyonel bozulma (yaklaşık %25-40) sülfat uygulamaları (özellikle ön uygulama) ile iyileştirilerek, bitkilerde bor tolerans sağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.9).

Fotosentetik örneğin tilakoid membranlarında gerçekleşen enerji akışlarını analiz eden JIP testine göre Arabidopsis bitkisinde reaksiyon merkezi başına (RC başına) olan spesifik enerji akış parametreleri, toksik B ve/veya sülfat uygulamalarında (ön veya birlikte) olumsuz etkilenmiştir (Şekil 4.10): Reaksiyon merkezi başına, absorbe edilen [veya ortalama anten büyüklüğünü (ABS/RC)], tutulan enerji akışı (TR_O/RC) ve elektron taşınımı (ET_O/RC) ile ısı şeklindeki

enerji kaybı [fotokimyasal olmayan kullanım (DI_o/RC)] bor toksisitesine bağlı olarak önemli derece artmıştır (şekil 4.10). Stirbet ve Govindjee (2012) ABS/RC, TR_o/RC ve DI_o/RC 'deki artışın birbiri ile bağlantılı olduğunu ve bu durumun bitkilerin yapısal özelliklerine ve fotosentetik aktiviteleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular fenomolojik enerji akışları ile de paralellik sergilemekte ve ölçüm yapılan yaprak alanı başına hesaplanan tüm enerji akışlarında artışların olduğu belirlenmiştir (şekil 4.11). Sülfat ve/veya toksik B uygulamalarında kontrole göre fenomolojik enerji akışları ile ilişkili tüm parametrelerdeki artışlar, aktif reaksiyon merkezlerinin Q_A redükte etmeyen inaktif reaksiyon merkezlerine dönüşmesinin sonucudur.

Toksik bor koşullarına maruz kalan *A. thaliana*'da fotosentetik performans indeksleri (PI_{ABS} ve PI_{TOT}) ve komponentleri bor konsantrasyonunun artışına bağlı olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (şekil 4.12). Sülfat uygulamalarının (özellikle sülfat ön uygulaması) bor toksisitesinin olumsuz etkilerini iyileştirilerek, *Arabidopsis* bitkisinin B toksisitesine karşı tolerans kazanımı sağlayabildiği canlılık göstergesi olan performans indeks ve bileşenlerindeki artış ile ortaya konulmuştur.

Klorofil a floresans analiz (JIP test) sonuçları, B toksisitesi nedeni ile bitkilerin fotokimyasal performansındaki düşüşün, inaktif reaksiyon merkezindeki artıştan ve enerjinin ısı şeklinde kaybindan (fotokimyasal olmayan kullanım) kaynaklandığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde bor toksisitesinin PSII'nin fonksiyonelliğini PSI'e göre daha fazla etkilediği ancak bu etkilenmenin fotosentetik aktiviteyi durduracak (fotoinhisyon) şiddette olmadığı ve sülfat uygulamaları ile hafifletilebildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar biyokütle ve MDA miktarındaki değişimler ile de doğrulanmaktadır.

Bitkilerde fotosentetik pigment grubundan olan klorofiller, fotosistemlerin anten komplekslerinde ve reaksiyon merkezinde yer alıp eksitasyon enerjisini absorblamasından birincil derecede sorumludur (Scott, 2011). Bor toksisitesi

uygulanan bitkilerinin yapraklarında toplam klorofil a+b miktarının anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13A). Toksik bor koşulları altındaki bitkilerin klorofil miktarlarındaki azalma; tilakoid zarlarında oluşan hasarlara bağlı olarak fotosentetik kapasitedeki azalmalardan kaynaklanabileceği gibi klorofil pigmentlerinin foto-oksidasyonu veya yıkımındaki artış (klorozis) ile de ilişkili olabilir (Şekil 4.1; Şekil 4.12). Sülfat uygulamaları klorofil pigment miktarını arttırmış ancak bu artış sadece PS-3B uygulamasında anlamlı olmuştur.

Işık toplayıcı anten komplekslerinin bir diğer pigmenti olan karotenoidler, pigment-protein komplekslerinin kararlılığını sağlama, aşırı eksitasyon enerjisini ısı şeklinde yayarak tilakoid membranlarda oluşabilecek fotooksidatif hasarlara karşı korumada önemli rol oynarlar (Yao ve Liu, 2007; Ekmekçi, Tanyolaç ve Ayhan, 2008; Dankov ve ark., 2009). Bu çalışmada B toksisitesine bağlı olarak bitkilerinde toplam karotenoid miktarları kontrollerine göre önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.13B). Sülfat uygulamaları ise bitkilerin karotenoid miktarında artış sağladığı belirlenmiş, ancak bu etkinin sadece PS-3B uygulamasında iyileştirici olabileceği görülmektedir (Şekil 4.13B). Landi ve ark. (2013) bor toksisitesi altında karotenoid miktarında meydana gelen azalmanın nedeninin fotosentetik yapının foto-korumasına aktif olarak katkıda bulunan ve antioksidan moleküller olarak işlev görebilen antosiyaninlerin birikimi ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, flavonoidlerinde, reaktif oksijen türlerinin üretimini indükleyen çeşitli metalleri şelatlayarak, metal toksisitesine karşı bitki savunmasını artırabildikleri bildirilmiştir (Khalid ve ark., 2019). Arabidopsis bitkisinde de bor toksisitesi ile karşılaştırıldığında sülfat uygulamalarında flavonoid ve antosiyanin pigmentlerinin sentezlerindeki artış, bu pigmentlerin bor toksisitesinin yol açabileceği oksidatif hasarlara karşı savunmada rol oynadıklarının ve fotosistemleri koruduklarının işareti olabilir. Farklı bitkiler ile yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Baskar ve ark., 2018; Stetsenko ve ark., 2020).

Bitkilerde çeşitli stres koşullarında oluşan reaktif oksijen moleküllerinin (ROS) detoksifikasyon sürecinde birçok enzim rol almaktadır. Askorbat peroksidaz (APX), Glutasyon redüktaz (GR), Guaiakol peroksidaz (POD) ve Glutasyon S

transferaz (GST) gibi metaloid detoksifikasyonunda yer alan enzimatik antioksidantlar, stres koşullarında sentezi artan ve reaktif bir yan ürünü olan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda doğrudan/dolaylı olarak rol oynamaktadır (Kumar ve ark., 2017). Bunlardan POD enziminin, oksidatif hasarlarda süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesiyle ve/veya çeşitli diğer süreçlerde oksijenin indirgenmesi ile oluşan H_2O_2 'in bertaraf edilmesinde oldukça önemli rolü vardır (Mathews, Volkenburgh ve Boyer, 1984; Noctor ve Foyer, 1998). Toksik bor düzeyleri ile yapılan bir çalışmada POD enziminin aktivitesinin hafif artış gösterdiği bildirilmiştir (Kayıhan, Kayıhan ve Çiftçi, 2016). Bu çalışmada POD enzim aktivitesi yüksek toksisite gruplarında artmıştır (Şekil 4.15.) ve bu artışın sadece B uygulamasına göre sülfat uygulamalarında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca H_2O_2 miktarındaki değişimin de POD aktivitesi ile uyumludur (Şekil 4.7.). Sülfat uygulamaları ile yüksek bor toksisite seviyelerinde POD aktivitesinin artışı, bu enzimin ROT detoksifikasyonunda etkin bir şekilde görev aldığını ve toksisitenin olumsuz etkisini hafiflettiğini açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, H_2O_2 'in detoksifikasyonunda yer alan diğer bir enzim de Glutasyon-S-Transferaz (GST) olup, redükte glutasyonu (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalize eder. Yapılan birçok çalışmada GST aktivitesinin toksisite ile birlikte arttığı ve oluşan glutasyon ile toksik metalleri konjuge ederek detoksifikasyonu sağladığı bildirilmiştir (Dixon, Skipsey ve Edwards, 2010; Islam, 2017; Yadav ve ark., 2018). Bu çalışmada, GST enziminin aktivitesinin en fazla PS-5B grubunda arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen bu sonuç, bor stresi altında sülfat ön uygulamasının GST enziminin aktivitesini tetikleyerek glutasyon ile bor arasında konjugasyon oluşturup metabolik faaliyetlerden boru uzaklaştırdığını düşündürmektedir. Özellikle GSH1 geninin ifade artışı da bulguyu destekler niteliktedir.

Bitkiler, metal şelasyonu, metal alım taşıyıcılarının regülasyonu ve vakuolde biriktirme gibi içsel savunma cevaplarını artırarak bir dereceye kadar metal toksisitesine karşı koyabilmektedirler (Arif ve ark., 2019). Bununla birlikte, bitkilerde sülfat uygulamalarının metal toksisitesinin olumsuz etkisini azaltarak iyileştirdiği/hafiflettiği ve tolerans kazanımı sağlayabildiği bildirilmiştir (Anjum ve ark., 2008, Hassan ve ark., 2005; Dixit ve ark., 2015; Sheng ve ark., 2016; Guo

ve ark.,2017). Bu nedenle, metal stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede kritik rol oynayan kükürt içeren esansiyel amino asitlerin ve kükürt biyosentez metabolitlerinin sentezi için sülfat alımı ile bitki bünyesinde taşınımı ve kullanımı oldukça önemli bir biyolojik bir süreçtir. Sülfat alım miktarını optimize etmek ve S metabolizması talebini karşılamak için sülfat taşıyıcıları, spesifik organlarda, hücre tiplerinde ve hücre altı bölmelerde ifade edilir ve hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde düzenlenir.

Bitkilerde sülfat alımı ve taşınması sülfat taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu çalışmada öncelikle *Arabidopsis thaliana*'nın yaprak dokularındaki sülfat taşıyıcılarının transkripsiyonel düzenlenmesine odaklandık. Çünkü bor, ksilem ile yaprak dokularına aktarılır ve yaprak kenarlarında birikir ve büyüme sırasında birikmeye devam eder (Reid ve Fitzpatrick 2009). *Arabidopsis thaliana* bitkisinde sülfat taşıyıcıları SULTR gen ailesi tarafından kodlanır ve işlevlerine göre 5 gruba ayrılmaktadır (Buncher, Takahashi ve Hawkesford, 2004). Bu gruplardan SULTR1;1, SULTR1;2 ve SULTR1;3, grup 1 sülfat taşıyıcılarının üyeleridir. Bunlar arasında SULTR1;1 ve SULTR1;2 sülfatın hücrelerden alımı için aktif taşıma sistemleridir ve kökteki epidermal ve kortikal hücrelerinden sülfat sızıntısının önlenmesinden sorumludur. SULTR1;3 ise sülfatın sürgünden köke taşınımında rol oynamaktadır (Yoshimoto ve ark., 2003). Bitki bünyesine sülfat alımından birincil sorumlu olan ve köklerde lokalize olan 1. grup (SULTR 1;1, SULTR 1;2) taşıyıcılar sülfata yüksek afinite gösterirken, 2. grup taşıyıcılar (SULTR 2;1 ve SULTR 2;2) düşük afinite gösterir. SULTR 2;1 ve SULTR 2;2 genlerinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinde hem yaprakların floem ve ksilem parankima hücrelerinde hem de köklerin perisikl ve ksilem parankimasında ifade edildiği ve uzun mesafelerde sülfat taşınımından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2000; Yoshimoto ve ark., 2002). Ayrıca mayada SULTR 2;1 ifadesini SULTR 3;5 geninin ifadesi sinerjik olarak etkilediği sülfat alım kapasitesini artırmak için SULTR3;5 ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (Kataoka ve ark., 2004a; Davidiana ve Kopriva, 2010). Bu çalışmada, SULTR 2;1 geninin ifadesi, artan B toksisitesi ile birlikte kontrollerine göre önemli seviyede azaldığı, ancak PS-5B grubunda 5B grubuna göre daha fazla ifade olduğu saptanmıştır (Şekil 4.17.). PS-5B grubundaki SULTR 2;1

genindeki ifade artışı, aynı grupta SULTR 3;5 geninde aşırı ifade olmasını tetiklemiş olabilir (Şekil 4.23.). SULTR 2;2 genin sülfat ön uygulamalı gruplarda daha fazla ifade olması, yapraklara uzun mesafeli sülfat taşınımında daha etkin olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.18.).

3. grup (SULTR3) sülfat taşıyıcıları kloroplast membranında lokalize olduğu ve kloroplastta sülfat alımından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Takahashi, 2019). Ayrıca *sultr3;1* mutantında sistein (Cys) seviyelerindeki düşüşün nedeni de kloroplastların sülfat indirgenme bölgelerinden biri olduğudur (Zuber ve ark., 2010; Hell ve Wirtz, 2011; Cao ve ark., 2013). Tüm 3. grup sülfat taşıyıcılarının ifadesinin susturulduğu beşli mutant *Arabidopsis thaliana* bitkisinde Cys ile birlikte glutatyon (GSH) miktarı da düşmesi, GSH üretimi için SULTR3 taşıyıcıları önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Chen ve ark., 2019). Bu çalışmada tüm uygulama gruplarında incelenen 3. grup sülfat taşıyıcılarının genelinde kontrole göre artış söz konusudur. Özellikle SULTR 3;1, SULTR 3;3, SULTR 3;5 genleri toksisiteye karşı tüm sülfat ön-uygulama gruplarında daha fazla ifade olmuştur (Şekil 4.19, 4.21, 4.23.). Bu sonuç SULTR3 izoformlarının transkripsiyonel düzenlenmesinin toksisiteye karşı tolerans kazanımında sülfatın asimilasyonunda Cys, GSH ve hatta absisik asit (ABA) biyosentezi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Metabolizma için kükürt kazanımında önemli yollardan biri vakuolar sülfat havuzlarıdır. 4. grup (SULTR4) sülfat taşıyıcıları vakuol zarında (tonoplasta) yer alırlar ve sülfatın vakuolden sitozole geçişini sağlamaktadırlar (Takahashi, 2019). SULTR 4;1 ve SULTR 4;2'nin sülfat açlığında ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Kataoka ve ark., 2004b). Bu çalışmada ifade değişimi araştırılan SULTR 4;1 geni, kontrole göre artmıştır (Şekil 4.24.). Genin ifadesinin özellikle sülfat ön uygulamalarında, toksik B düzeylerine göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bitkilerin ön uygulama gruplarında toksik B gruplarına göre, SULTR3 ve SULTR4 grubu genlerinin ifadelerindeki artış, paralellik göstermektedir. Elde edilen bu bulgular, ön uygulama gruplarında vakuolden sitozole geçen sülfatın, sonrasında kloroplast üzerinde lokalize olan SULTR3 taşıyıcıları ile alınarak kükürt asimilasyonuna katılmış olabileceği düşünülmektedir.

Kükürt asimilasyonunda görev alan Adenozin-5'-fosfosülfat redüktaz (APSR) enzimi için substrat olan glutatyonun (GSH) biyosentezi plastidlerde başlar. Plastidlerde bulunan glutamat-sistein ligaz enzimi, glutatyon sentezinin ilk basamağını katalize eder. Glutamat sistein ligaz enzimini ise GSH1 geni kodlar (Han ve ark., 2019). Glutamat sistein ligaz enziminin ürünü olan γ -glutamil sistein (γ -EC), sitozolde bulunan GSH2 sentaz enzimi tarafından glutatyonu dönüştürülür (Hell ve Bergmann, 1990; Wang ve Oliver, 1996; Noctor ve ark., 2011). GSH sentaz enzimi GSH2 geni tarafından ifade edilir. Çalışmalar sırasında GSH1 geninin yüksek toksisite gruplarında (5B ve PS-5B) ifadesi artmıştır (Şekil 4.27.). GSH2 geninde ise 3B, 5B ve PS-5B gruplarının ifadesi kontrole göre artmıştır. Bu sonuçlar ise bor toksisitesinin glutatyon biyosentezini indüklediğini göstermektedir (Şekil 4.28).

OPT6 geni, glutatyonun hem indirgenmiş (GSH) hem de okside (GSSG) formuna yüksek afinite gösteren oligopeptit taşıyıcısını ifade eder. Bu taşıyıcı havuz dokularından glutatyonu kendine bağlayarak uzun mesafe taşınımı gerçekleştirebilmektedir (Cagnac ve ark., 2004; Stancey ve ark., 2008; Wongkaew ve ark., 2018). İncelenen OPT6 geninin ifadesinde 3B ve 5B gruplarında artış belirlenmiş olup, bu durum detoksifikasyon sürecinde glutatyonun önemli rolünü vurgulamaktadır (Şekil 4.26.).

Arabidopsis thaliana bitkisinde NIP II (Nodulin intrinsic protein) gen ailesi borik asit alınımından sorumludur ve bu genlerin dokulara göre ifade profilleri değişmektedir. Ağırlıklı olarak NIP 5;1 köklerde, NIP 6;1 sürgün nodlarında, NIP 7;1 gelişen çiçeklerde ifade olmaktadır. NIP 6;1 ile NIP 5;1 birbirlerine benzerlik göstermekte fakat NIP 6;1 sürgün taşınımında daha aktif görev almaktadır. Genellikle bor eksikliğinde bu genin ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Tanaka, Wallace ve Takano, 2008; Miwa ve ark., 2010). Fakat tez çalışmalarında bu gene ait ifadeler toksisiteyle birlikte artış göstermektedir (Şekil 4.25.). Bunun sebebi borun sürgünlerde vakuolde şelatlanması olabilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde;

Literatürde bor toksitesine karşı kükürt aracılı tolerans kazanımı ile ilgili çalışmaların olmasının yanı sıra, bor toksitesinin oluşturduğu oksidatif hasarlara karşı bor tolerans kazanımında kükürt bağımlı detoksifikasyonla ilgili metabolik yollardaki değişiklikler, ilk defa bütüncül olarak bu tez kapsamında incelenmiştir.

- Arabidopsis bitkilerinde toksik bor düzeylerinin (3 ve 5mM B) bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkilediği biyokütlerde azalışla görülmektedir. Ancak bor birikimine bağlı olarak toksik borun etkilerin sülfat uygulamaları ile hafifletildiği ve bitkilerin daha toleranslı bir genotip sergiledikleri tespit edilmiştir.
- Bitkinin kökleriyle alınan sürgünlere ve yapraklara taşınan toksik bor konsantrasyonları yapraklarda fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiştir. JIP test sonuçları, bor toksitesi nedeni ile bitkilerin fotokimyasal etkinliklerindeki azalmanın, tilakoid membranın dissosiyasyonu, inaktif reaksiyon merkezindeki artışı ve enerjinin ısı şeklinde kaybindan (fotokimyasal olmayan kullanım) kaynaklandığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, model bitki *Arabidopsis thaliana*'da bor toksitesinin PSII'nin yapı ve fonksiyonelliğini PSI'e göre daha fazla etkilediği ancak bu etkilenmenin fotosentetik aktiviteyi durduracak (fotoinhisyon) şiddette olmadığı ve sülfat uygulamaları ile hafifletilebildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar biyokütle ve MDA miktarındaki değişimler ile doğrulanmaktadır.
- Toksik borun yapraklarda birikimi sonucunda üretilen reaktif oksijen türlerine karşı, bitkilerin oluşturduğu savunma sistemlerinden bazı antioksidan enzimler ve polifenolik bileşikler grubunda yer alan antosiyanin ve

flavonoidler aktive olmuştur. Bu bağlamda, toksik bor düzeylerinin oluşturduğu oksidatif zararlara karşı özellikle sülfat uygulamaları ile POD, GST ve bunlara ilaveten antosiyanin ve flavonoid miktarlarındaki artışlarla birlikte üstesinden gelindiği ve tolerans kazanımının sağlandığı görülmektedir.

- Sülfat ön uygulamalı B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana*'da sülfat taşınımında ve glutatyon biyosentezinde görev alan bazı genlerin transkripsiyonel regülasyonundaki artışlar *Arabidopsis thaliana*'da bor toksisitesinin etkisini hafifletmede rolü olabileceğini göstermektedir.

Öneriler;

- Tezin, bütüncül kurgusu ve *Arabidopsis thaliana* bitkisinde çalışılmış olması bu konuda yapılacak çalışmalara model olma potansiyeline sahiptir. Bor tolerans kazanımının model bitkide fizyolojik, biyokimyasal ve transkript düzeyde yaklaşımlar ile ortaya konulması, diğer çevresel stres faktörlerine karşı toleransın kazandırılması ve/veya toleranslı tarımsal bitkilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara yön verici olabilir.
- Yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla model bitki *Arabidopsis*'te sülfat uygulamaları ile kükürt metabolik sürecinde yer alan basamaklarda transkriptomik ve proteomik değişimler incelenebilir ve bunların tolerans kazanımındaki rolü daha ayrıntılı olarak ortaya konulabilir.
- Bor toksik topraklarda tarımsal üretimi mümkün kılmak için ilave S beslemesi yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Aarabi, F., Kusajima, M., Tohge, T., Konishi, T., Gigolashvili, T., Takamune, M. and Maruyama-Nakashita, A., Sulfur deficiency–induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants, *Science Advances*, 2(10), e1601087, **2016**.
- Aarabi, F., Naake, T., Fernie, A. R. and Hoefgen, R., Coordinating sulfur pools under sulfate deprivation, *Trends in Plant Science*, 25(12), 1227-1239, **2020**.
- Acar, Y.S., İşkil, R. ve Erden, Y., Bor stresi altında *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi, *Journal of Boron*, 3(3), 145-150, **2018**.
- Adhikari, S., Ghosh, S., Azahar, I., Adhikari, A., Shaw, A.K., Konar, S. and Hossain, Z., Sulfate improves cadmium tolerance by limiting cadmium accumulation, modulation of sulfur metabolism and antioxidant defense system in maize, *Environmental and Experimental Botany*, 153, 143-162, **2018**.
- Ahmad, A. and Abdin, M.Z., Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein contents and on the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.), *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185(1), 49-5, **2000**.
- Ahmad, S., Ahmad, R., Ashraf, M.Y., Ashraf, M. and Waraich, E.A., Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages, *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 647-654, **2009**.
- Akçay, U.C. ve Erkan, I.E., Silicon induced antioxidative responses and expression of BOR2 and two PIP family aquaporin genes in barley grown under boron toxicity, *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 318-326, **2016**.
- Akmouche, Y., Cheneby, J., Lamboeuf, M., Elie, N., Laperche, A., Bertheloot, J. and Brunel-Muguet, S., Do nitrogen-and sulphur-remobilization-related parameters measured at the onset of the reproductive stage provide early indicators to adjust N and S fertilization in oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under N-and/or S-limiting supplies? *Planta*, 250(6), 2047-2062, **2019**.
- Al-Fraihat, A.H. and Ahmad, H. Effect of different nitrogen and sulphur fertilizer levels on growth, yield and quality of onion (*Allium cepa* L.), *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 5(2), 155-166, **2009**.
- Alpaslan, M. ve Gunes, A., 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, **2001**.

Amir, R., Cohen, H. and Hacham, Y., Revisiting the attempts to fortify methionine content in plant seeds, *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4105-4114, **2019**.

Anjum, N.A., Umar, S., Ahmad, A., Iqbal, M. and Khan, N.A., Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione, *Plant Growth Regulation*, 54(3), 271-279, **2008**.

Anonim. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, bor sektör raporu, http://www.etimaden.gov.tr/storage/uploads/2018/05/2017-Bor-Sekto%CC%88r-Raporu-23_05_2018.pdf (Erişim Tarihi:**24.06.2020**).

Archana, N.P. and Verma, P., Boron deficiency and toxicity and their tolerance in plants: a review, *Journal of Global Biosciences*, 6, 4958-4965, **2017**.

Ardıç, M., Sekmen, A.H., Tokur, S., Ozdemir, F. and Turkan, I., Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity, *Plant Biology*, 11(3), 328-338, **2009**.

Arif, N., Sharma, N.C., Yadav, V., Ramawat, N., Dubey, N.K., Tripathi, D.K. and Sahi, S., Understanding heavy metal stress in a rice crop: toxicity, tolerance mechanisms, and amelioration strategies, *Journal of Plant Biology*, 62(4), 239-253, **2019**.

Arslan, Ö., Boron toxicity impacts on photosystem II photochemical efficiency of sage (*Salvia officinalis*), *Botanica Serbica*, 46(1), 113-119, **2022**.

Atique-ur-Rehman, F.M., Rashid, A., Nadeem, F., Stuerz, S., Asch, F., Bell, R.W. and Siddique, K.H.M., Boron nutrition of rice in different production systems. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, 38(25), 10-1007, **2018**.

Awazuhara, M., Kim, H., Goto, D. B., Matsui, A., Hayashi, H., Chino, M. and Fujiwara, T., A 235-bp region from a nutritionally regulated soybean seed-specific gene promoter can confer its sulfur and nitrogen response to a constitutive promoter in aerial tissues of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, 163(1), 75-82, **2002**.

Bai, X.Y., Dong, Y.J., Wang, Q.H., Xu, L.L., Kong, J. and Liu, S., Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass, *Biologia Plantarum*, 59(1), 163-170, **2015**.

Bar-Peled, M., Urbanowicz, B.R. and O'Neill, M.A., The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II—insights from nucleotide sugar formation and diversity, *Frontiers in Plant Science*, 3, 92, **2012**.

Bashir, K., Takahashi, R., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects, *Frontiers in Plant Science*, 4, 15, **2013**.

- Baskar, V., Venkatesh, R. and Ramalingam, S., Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. In *Antioxidants And Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, Gupta, D.K., Palma J.M., Corpas, F.J. (Eds.), Springer, Switzerland, 253-268, **2018**.
- Bassil, E., Hu, H. and Brown, P.H., Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion, *Plant Physiology*, 136(2), 3383-3395, **2004**.
- Beck, J.B., Schmuths, H. and Schaal, B.A., Native range genetic variation in *Arabidopsis thaliana* is strongly geographically structured and reflects Pleistocene glacial dynamics, *Molecular Ecology*, 17(3), 902-915, **2008**.
- Bick, J.A. and Leustek, T., Plant sulfur metabolism—the reduction of sulfate to sulfite, *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 240-244, **1998**.
- Bienert, M.D., Muries, B., Crappe, D., Chaumont, F. and Bienert, G.P., Overexpression of X intrinsic protein 1;1 in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis* reduces boron allocation to shoot sink tissues, *Plant Direct*, 3(6), e00143, **2019**.
- Blaser-Grill, J., Knoppik, D., Amberger, A. and Goldbach, H., Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells, *Plant physiology*, 90(1), 280-284, **1989**.
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254, **1976**.
- Brdar-Jokanović, M., Boron toxicity and deficiency in agricultural plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1424, **2020**.
- Brown, P.H. and Shelp, B.J., Boron mobility in plants, *Plant and Soil*, 193(1), 85-101, **1997**.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H. and Römheld, V., Boron in plant biology, *Plant biology*, 4(02), 205-223, **2002**.
- Brunel-Muguet, S., Mollier, A., Kauffmann, F., Avice, J.C., Goudier, D., Sénécal, E. and Etienne, P., SuMoToRI, an ecophysiological model to predict growth and sulfur allocation and partitioning in oilseed rape (*Brassica napus* L.) until the onset of pod formation, *Frontiers in Plant Science*, 6, 993, **2015**.
- Buchner, P., Takahashi, H. and Hawkesford, M.J., Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport, *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1765-1773, **2004**.
- Burstenbinder, K. and Sauter, M., Early events in the ethylene biosynthetic pathway-regulation of the pools of methionine and S-adenosylmethionine. *Annual Plant Reviews*, 44, 22, **2012**.

- Cagnac, O., Bourbonloux, A., Chakrabarty, D., Zhang, M.Y. and Delrot, S., AtOPT6 transports glutathione derivatives and is induced by primisulfuron, *Plant Physiology*, 135(3), 1378-1387, **2004**.
- Camacho-Cristóbal, J.J., Rexach, J. and González-Fontes, A., Boron in plants: deficiency and toxicity, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1247-1255, **2008**.
- Cao, L., Waldon, D., Teffera, Y., Roberts, J., Wells, M., Langley, M. and Zhao, Z. Ratios of biliary glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH): a potential index to screen drug-induced hepatic oxidative stress in rats and mice. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(8), 2635-2642, **2013**.
- Capaldi, F.R., Gratão, P.L., Reis, A.R., Lima, L.W. and Azevedo, R.A., Sulfur metabolism and stress defense responses in plants, *Tropical Plant Biology*, 8(3), 60-73, **2015**.
- Ceppi, M.G., Oukarroum, A., Çiçek, N., Strasser, R.J. and Schansker, G., The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress, *Physiologia Plantarum*, 144(3), 277-288, **2012**.
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L. and Ruiz, J.M., Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity, *Annals of Botany*, 100(4), 747-756, **2007**.
- Chan, K. X., Phua, S.Y. and Van Breusegem, F., Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses, *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4237-4250, **2019**.
- Chang, C. and Meyerowitz, E. M., Molecular cloning and DNA sequence of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(5), 1408-1412, **1986**.
- Chaudhary, K., Agarwal, S. and Khan, S., Role of phytochelatin (PCs), metallothioneins (MTs), and heavy metal ATPase (HMA) genes in heavy metal tolerance. In *Mycoremediation and environmental sustainability* (pp. 39-60). Springer, Cham, **2018**.
- Chen, S., Rotaru, A.E., Liu, F., Philips, J., Woodard, T.L., Nevin, K.P. and Lovley, D. R., Carbon cloth stimulates direct interspecies electron transfer in syntrophic co-cultures, *Bioresource technology*, 173, 82-86, **2014**.
- Chen, S., Yang, J., Zhang, M., Strasser, R. J. and Qiang, S., Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 126-140, **2016**.

- Chen, Z., Zhao, P.X., Miao, Z.Q., Qi, G.F., Wang, Z., Yuan, Y. and Xiang, C.B., SULTR3s function in chloroplast sulfate uptake and affect ABA biosynthesis and the stress response, *Plant Physiology*, 180(1), 593-604, **2019**.
- Chen, X., Zhou, Y., Cong, Y., Zhu, P., Xing, J., Cui, J., Xu, W., Shi, Q., Diao, M. and Liu, H-Y., Ascorbic acid-induced photosynthetic adaptability of processing tomatoes to salt stress probed by fast OJIP fluorescence rise. *Frontiers in Plant Science*, 12, 594400, 2021.
- Cheng, M.C., Ko, K., Chang, W.L., Kuo, W.C., Chen, G.H. and Lin, T.P., Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis, *The Plant Journal*, 83(5), 926-939, **2015**.
- Choi, E.Y., Kolesik, P., McNeill, A.N.N., Collins, H., Zhang, Q., Huynh, B.L. and Stangoulis, J., The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant, Cell and Environment*, 30(8), 984, **2007**.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry*, 162 (1), 156-159, **1987**.
- Chormova, D. and Fry, S.C., Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted in vitro by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins, *New Phytologist*, 209(1), 241-251, **2016**.
- Choudhary, S., Zehra, A., Mukarram, M., Wani, K.I., Naeem, M., Khan, M.M.A. and Aftab, T., Salicylic acid-mediated alleviation of soil boron toxicity in *Mentha arvensis* and *Cymbopogon flexuosus*: Growth, antioxidant responses, essential oil contents and components, *Chemosphere*, 276, 130153, **2021**.
- Cobbett, C.S., Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825-832., **2000**.
- Coskun, Y., Olgunsoy, P., Karatas, N., Bulut, F. ve Yarar, F., Mannitol application alleviates boron toxicity in wheat seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(7), 944-952, **2014**.
- Çakmak, I., and Römheld, V., Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants, *Plant and Soil*, 193(1), 71-83, **1997**.
- Çakmak, I., Kurz, H. and Marschner, H., Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower, *Physiologia Plantarum*, 95(1), 11-18, **1995**.
- Çatav, Ş.S., Genç, T.O., Kesik Oktay, M. and Küçükakyüz, K., Effect of boron toxicity on oxidative stress and genotoxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 502-508, **2018**.

Çiçek, N., Çakırlar, H. ve Strasser, R.J., Arpa bitkisinde Ultraviyole-B stresinin fotosistem II etkinliği üzerine etkisi, *Anadolu University of Sciences and Technology-C: Life Sciences and Biotechnology*, 2(1), **2012**.

Dankov, K., Busheva, M., Stefanov, D. and Apostolova, E.L. Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 49-56, **2009**.

Davidian, J.C. and Kopriva, S., Regulation of sulfate uptake and assimilation—the same or not the same? *Molecular Plant*, 3(2), 314-325, **2010**.

Dell, B. and Huang, L., Physiological response of plants to low boron, *Plant and Soil*, 193(1), 103-120, **1997**.

Dixit, D., Srivastava, N.K. and Sharma, S., Boron deficiency induced changes in translocation of $^{14}\text{CO}_2$ -photosynthate into primary metabolites in relation to essential oil and curcumin accumulation in turmeric (*Curcuma longa* L.), *Photosynthetica*, 40(1), 109-113, **2002**.

Dixit, G., Singh, A.P., Kumar, A., Singh, P.K., Kumar, S., Dwivedi, S. and Tripathi, R. D., Sulfur mediated reduction of arsenic toxicity involves efficient thiol metabolism and the antioxidant defense system in rice, *Journal of Hazardous Materials*, 298, 241-251, **2015**.

Dixon, D.P., Skipsey, M. and Edwards, R., Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, *Phytochemistry*, 71(4), 338-350, **2010**.

Dordas, C., Chrispeels, M.J. and Brown, P.H., Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology*, 124(3), 1349-1362, **2000**.

Droux, M., Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey, *Photosynthesis Research*, 79(3), 331-348, **2004**.

Dugger, W.M., Boron in plant metabolism. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, 15(b) 626-650, **1983**.

Durbak, A.R., Phillips, K.A., Pike, S., O'Neill, M.A., Mares, J., Gallavotti, A. and McSteen P., Transport of boron by the tassel-less1 aquaporin is critical for vegetative and reproductive development in maize, *The Plant Cell*, 26(7), 2978-2995, **2014**.

Ekmekçi, Y., Erdal, Ş.Ç., Nalçaiyi, A.S.B. and Cicek, N., Acquisition of boron tolerance by salt pretreatment in two sunflower cultivars, *Turkish Journal of Botany*, 44(2), 153-166, **2020**.

Ekmekçi, Y., Tanyolac, D. and Ayhan, B., Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars, *Journal of Plant Physiology*, 165(6), 600-611, **2008**.

- El-Hamdaoui, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Bonilla, I. and Bolanos, L., Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the Rhizobium leguminosarum-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress, *Plant, Cell and Environment*, 26(7), 1003-1011, **2003**.
- El-Shintinawy, F., Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves, *Photosynthetica*, 36(4), 565-573, **2000**.
- Eraydin, E., Topraklarda Bor Absorpsiyonu Üzerine Bazı Anyonların Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2000**.
- Esim, N. ve Atici, O., Nitric oxide alleviates boron toxicity by reducing oxidative damage and growth inhibition in maize seedlings (*Zea mays* L.), *Australian Journal of Crop Science*, 7(8), 1085-1092, **2013**.
- Esteban, V., Cartagena, P.P., Iturrieta, L.T. and Bastías, E., Remediation of salt and boron-affected soil by addition of organic matter: An investigation into improving tomato plant productivity, *Idesia*, 34(3), 25-32, **2016**.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods in Enzymology*, 186, 407-421, **1990**.
- Fageria, N.K., Filho, M.B., Moreira, A. and Guimarães, C.M., Foliar fertilization of crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, 32(6), 1044-1064, **2009**.
- Farghaly, F.A., Salam, H.K., Hamada, A.M. and Radi, A.A., Alleviating excess boron stress in tomato calli by applying benzoic acid to various biochemical strategies, *Plant Physiology and Biochemistry*, 182, 216-226, **2022**.
- Farhad, I.S.M., Islam, M.N., Hoque, S. and Bhuiyan, M.S.I., Role of potassium and sulphur on the growth, yield and oil content of soybean (*Glycine max* L.), *An Academic Journal of Plant Sciences*, 3(2), 99-103, **2010**.
- Fatma, M., Asgher, M., Masood, A. and Khan, N.A., Excess sulfur supplementation improves photosynthesis and growth in mustard under salt stress through increased production of glutathione, *Environmental and Experimental Botany*, 107, 55-63, **2014**.
- Fatma, M., Iqbal, N., Gautam, H., Sehar, Z., Sofu, A., D'Ippolito, I. and Khan, N.A., Ethylene and sulfur coordinately modulate the antioxidant system and ABA accumulation in mustard plants under salt stress, *Plants*, 10(1), 180, **2021**.
- Feldmann, K.A. and Goff, S.A., The first plant genome sequence - *Arabidopsis thaliana*, *Advances in Botanical Research*, 69, 91-117, **2014**.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A. and Ehwald, R., The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II, *Plant Physiology*, 121(3), 829-838, **1999**.

Foyer, C.H. and Noctor, G., Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications, *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(4), 861-905, **2009**.

Fu, L., Wang, M., Han, B., Tan, D., Sun, X. and Zhang, J. Arabidopsis myrosinase genes AtTGG4 and AtTGG5 are root-tip specific and contribute to auxin biosynthesis and root-growth regulation, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 892, **2016**.

Fuentes-Lara, L.O., Medrano-Macías, J., Pérez-Labrada, F., Rivas-Martínez, E.N., García-Enciso, E.L., González-Morales, S. and Benavides-Mendoza, A., From elemental sulfur to hydrogen sulfide in agricultural soils and plants, *Molecules*, 24(12), 2282, **2019**.

Funakawa, H. and Miwa, K., Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II, *Frontiers in Plant Science*, 6, 223, **2015**.

García-Sánchez, F., Simón-Grao, S., Martínez-Nicolás, J.J., Alfosea-Simón, M., Liu, C., Chatzissavvidis, C., Pérez-Pérez J.G. and Cámara-Zapata, J.M., Multiple stresses occurring with boron toxicity and deficiency in plants, *Journal of Hazardous Materials*, 397, 122713, **2020**.

Giansoldati, V., Tassi, E., Morelli, E., Gabellieri, E., Pedron, F. and Barbaferi, M., Nitrogen fertilizer improves boron phytoextraction by *Brassica juncea* grown in contaminated sediments and alleviates plant stress, *Chemosphere*, 87(10), 1119-1125, **2012**.

Gill, S.S. and Tuteja, N., Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930, **2010**.

Goldbach, H.E. and Wimmer, M.A., Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(1), 39-48, **2007**.

Goldbach, H.E., Yu, Q., Wingender, R., Schulz, M., Wimmer, M., Findeklee, P. and Baluška, F., Rapid response reactions of roots to boron deprivation, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(2), 173-181, **2001**.

Grieve, C.M., Poss, J.A., Grattan, S.R., Suarez, D.L. and Smith, T.E., The combined effects of salinity and excess boron on mineral ion relations in broccoli, *Scientia Horticulturae*, 125(3), 179-187, **2010**.

Guha, A., Sengupta, D. and Reddy, A.R. Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 119, 71-83, **2013**.

Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Carmassi, G., Massa, D. and Pardossi, A., Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water, *Environmental and Experimental Botany*, 73, 57-63, **2011**.

- Guo, P., Li, Q., Qi, Y.P., Yang, L.T., Ye, X., Chen, H.H. and Chen, L.S., Sulfur-mediated-alleviation of aluminum-toxicity in *Citrus grandis* seedlings, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2570, **2017**.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J. and Tran, L.S.P., Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition, *Molecular Plant*, 8(9), 1304-1320, **2015**.
- Günel, S., Hardman, R., Kopriva, S., and Mueller, J.W., Sulfation pathways from red to green, *Journal of Biological Chemistry*, 294(33), 12293-12312, **2019**.
- Güneş, A., Söylemezoğlu, G., İnal, A., Bağcı, E.G., Çoban, S. ve Şahin, O., Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity, *Scientia Horticulturae*, 110(3), 279-284, **2006**.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139, **1974**.
- Han, S., Tang, N., Jiang, H.X., Yang, L.T., Li, Y. and Chen, L.S. CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress, *Plant Science*, 176(1), 143-153, **2009**.
- Han, Z., Nan, D., Yang, H., Sun, Q., Pan, S., Liu, H. and Hu, X., Carbon quantum dots based ratiometric fluorescence probe for sensitive and selective detection of Cu²⁺ and glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 298, 126842, **2019**.
- Hardulak, L.A., Preuss, M.L. and Jez, J.M., Sulfur metabolism as a support system for plant heavy metal tolerance. In *Detoxification of Heavy Metals* (pp. 289-301). Springer, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Mahmud, J.A., Nahar, K., Mohsin, S.M., Parvin, K. and Fujita, M., Interaction of sulfur with phytohormones and signaling molecules in conferring abiotic stress tolerance to plants, *Plant Signaling and Behavior*, 13(5), e1477905, **2018**.
- Hassan, M.J., Wang, Z. and Zhang, G., Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice, *Journal of Plant Nutrition*, 28(10), 1785-1800, **2005**.
- Hawkesford, M.J., Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum*, 117(2), 155-163, **2003**.
- Hell, R. and Bergmann, L., λ-Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization, *Planta*, 180(4), 603-612, **1990**.

Hell, R. and Wirtz, M., Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*, The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists, 9, **2011**.

Hellal, F.A., Taalab, A.S. and Safaa, A.M., Influence of nitrogen and boron nutrition on nutrient balance and sugar beet yield grown in calcareous soil. Ozean Journal of Applied Science, 2, 95-112, **2009**.

Hendrix, S., Jozefczak, M., Wójcik, M., Deckers, J., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., Glutathione: A key player in metal chelation, nutrient homeostasis, cell cycle regulation and the DNA damage response in cadmium-exposed *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry, 154, 498-507, **2020**.

Henriet, C., Aimé, D., Térézol, M., Kilandamoko, A., Rossin, N., Combes-Soia, L. and Gallardo, K., Water stress combined with sulfur deficiency in pea affects yield components but mitigates the effect of deficiency on seed globulin composition, Journal of Experimental Botany, 70(16), 4287-4304, **2019**.

Hohmann, N., Schmickl, R., Chiang, T.Y., Lučanová, M., Kolář, F., Marhold, K. and Koch, M.A., Taming the wild: resolving the gene pools of non-model Arabidopsis lineages, BMC Evolutionary Biology, 14(1), 1-21, **2014**.

Howarth, J. R., Parmar, S., Barraclough, P.B. and Hawkesford, M.J., A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status, Plant Biotechnology Journal, 7(2), 200-209, **2009**.

Hu, H., Penn, S.G., Lebrilla, C.B. and Brown, P.H. Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants (the mechanism of phloem mobility of boron), Plant Physiology, 113, 649-655, **1997**.

Hua, T., Zhang, R., Sun, H. and Liu, C., Alleviation of boron toxicity in plants: Mechanisms and approaches, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 51(24), 2975-3015, **2021**.

Huanca-Mamani, W., Arias-Carrasco, R., Cárdenas-Ninasivincha, S., Rojas-Herrera, M., Sepúlveda-Hermosilla, G., Caris-Maldonado, J.C. and Maracaja-Coutinho, V., Long non-coding RNAs responsive to salt and boron stress in the hyper-arid Lluteno maize from Atacama Desert. Genes, 9(3), 170, **2018**.

Huang, Q., Wang, M. and Xia, Z., The SULTR gene family in maize (*Zea mays* L.): Gene cloning and expression analyses under sulfate starvation and abiotic stress. Journal of Plant Physiology, 220, 24-33, **2018**.

Huang, X.Y., Li, M., Luo, R., Zhao, F.J. and Salt, D.E., Epigenetic regulation of sulfur homeostasis in plants, Journal of Experimental Botany, 70(16), 4171-4182, **2019**.

- Hubberten, H.M., Klie, S., Caldana, C., Degenkolbe, T., Willmitzer, L. and Hoefgen, R., Additional role of O-acetylserine as a sulfur status-independent regulator during plant growth, *The Plant Journal*, 70(4), 666-677, **2012**.
- Hussain, M., Khan, M.A., Khan, M.B., Farooq, M. and Farooq, S., Boron application improves growth, yield and net economic return of rice, *Rice Science*, 19(3), 259-262, **2012**.
- Hussain, S.J., Masood, A., Anjum, N.A. and Khan, N.A., Sulfur-mediated control of salinity impact on photosynthesis and growth in mungbean cultivars screened for salt tolerance involves glutathione and proline metabolism, and glucose sensitivity, *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(8), 1-13, **2019**.
- Islam, S., Rahman, I.A., Islam, T. and Ghosh, A., Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: gaining an insight to their physiological and stress-specific roles, *PLoS one*, 12(11), e0187504, **2017**.
- Jeschke, V., Weber, K., Moore, S.S. and Burow, M., Coordination of glucosinolate biosynthesis and turnover under different nutrient conditions, *Frontiers in Plant Science*, 1560, **2019**.
- Jez, J.M., Structural biology of plant sulfur metabolism: from sulfate to glutathione, *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4089-4103, **2019**.
- Kabir, A.H., Hossain, M.M., Khatun, M.A., Mandal, A. and Haider, S.A., Role of silicon counteracting cadmium toxicity in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1117., **2016**.
- Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A. and Ladle, R.J., Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 1-11, **2016**.
- Kastori, R., Plesničar, M., Panković, D. and Sakač, Z., Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency, *Journal of Plant Nutrition*, 18(9), 1751-1763, **1995**.
- Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T. and Takahashi, H., Root-to-shoot transport of sulfate in Arabidopsis. Evidence for the role of SULTR3; 5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature, *Plant Physiology*, 136(4), 4198-4204, **2004b**.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P. and Takahashi, H., Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 16(10), 2693-2704, **2004a**.
- Kaya, C., Ashraf, M., Al-Huqail, A.A., Alqahtani, M.A. and Ahmad, P., Silicon is dependent on hydrogen sulphide to improve boron toxicity tolerance in pepper

plants by regulating the AsA-GSH cycle and glyoxalase system, *Chemosphere*, 257, 127241, **2020a**.

Kaya, C., Sarıoğlu, A., Ashraf, M., Alyemeni, M.N. and Ahmad, P., Gibberellic acid-induced generation of hydrogen sulfide alleviates boron toxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 153, 53-63, **2020b**.

Kayıhan, C., Öz, M.T., Eyidoğan, F., Yücel, M. and Öktem, H.A., Physiological, biochemical, and transcriptomic responses to boron toxicity in leaf and root tissues of contrasting wheat cultivars, *Plant Molecular Biology Reporter*, 35(1), 97-109, **2017**.

Kayıhan, D.S., Boron Toxicity Responsive Regulations of Antioxidative Metabolism at Physio-biochemical, Transcriptional and Post-transcriptional Levels in Plants, *Doktora Tezi*, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, **2018**.

Kayıhan, D.S., Kayıhan, C. and Çiftçi, Y.Ö., Excess boron responsive regulations of antioxidative mechanism at physio-biochemical and molecular levels in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 337-345, **2016**.

Kayıhan, D.S., Kayıhan, C. and Ciftci, Y.O., Regulation of boron toxicity responses via glutathione-dependent detoxification pathways at biochemical and molecular levels in *Arabidopsis thaliana*, *Turkish Journal of Botany*, 43(6), 749-757, **2019**.

Keren, R., Bingham, F.T. and Rhoades, J.D., Effect of clay content in soil on boron uptake and yield of wheat, *Soil Science Society of America Journal*, 49(6), 1466-1470, **1985**.

Khalid, M., Bilal, M. and Huang, D.F., Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens—A review, *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1), 211-230, **2019**.

Khan, M., Fuller, M. and Baloch, F. Effect of soil applied zinc sulphate on wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on a calcareous soil in Pakistan, *Cereal Research Communications*, 36(4), 571-582, **2008**.

Khan, M.I.R., Nazir, F., Asgher, M., Per, T.S. and Khan, N.A., Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat, *Journal of Plant Physiology*, 173, 9-18, **2015**.

Khan, N.A. and Mobin, M., The influence of gibberellic acid and sulfur fertilization rate on growth and S-use efficiency of mustard (*Brassica juncea*), *Plant and Soil*, 270(1), 269-274, **2005**.

- Klochko, K., Kaufman, A.J., Yao, W., Byrne, R.H. and Tossell, J. A., Experimental measurement of boron isotope fractionation in seawater, *Earth and Planetary Science Letters*, 248(1-2), 276-285, **2006**.
- Kobayashi, M., Ohno, K. and Matoh, T., Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. II. Characterization of the boron-polysaccharide complex, *Plant and Cell Physiology*, 38(6), 676-683, **1997**.
- Koch, M. A. and Matschinger, M., Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6272-6277, **2007**.
- Koornneef, M. and Meinke, D., The development of *Arabidopsis* as a model plant, *The Plant Journal*, 61(6), 909-921, **2010**.
- Koornneef, M., Van Eden, J., Hanhart, C.J., Stam, P., Braaksma, F.J. and Feenstra, W.J., Linkage map of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Heredity*, 74(4), 265-272, **1983**.
- Kopriva, S. and Gigolashvili, T., Glucosinolate synthesis in the context of plant metabolism. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 80, pp. 99-124). Academic Press, **2016**.
- Kopriva, S. and Koprivova, A. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future, *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1775-1783, **2004**.
- Kopriva, S. and Koprivova, A., Sulphate assimilation: a pathway which likes to surprise. In *Sulphur in plants* (pp. 87-112). Springer, Dordrecht, **2003**.
- Kopriva, S., Malagoli, M. and Takahashi, H., Sulfur nutrition: impacts on plant development, metabolism, and stress responses, *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4069-4073, **2019**.
- Krämer, U., The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*, *Elife*, 4, e06100, **2015**.
- Kumar, V., Shriram, V., Hoque, T.S., Hasan, M.M., Burritt, D.J. and Hossain, M. A., Glycinebetaine-mediated abiotic oxidative-stress tolerance in plants: physiological and biochemical mechanisms, In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, 2, 111-133, **2017**.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I.E. and Araniti, F., Boron toxicity in higher plants: an update, *Planta*, 250(4), 1011-1032, **2019**.
- Landi, M., Pardossi, A., Remorini, D. and Guidi, L., Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess, *Environmental and Experimental Botany*, 85, 64-75, **2013**.

- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A. and Davies, J. P., Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Biology*, 51(1), 141-165, **2000**.
- Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R. and Meyerowitz, E.M., The DNA of *Arabidopsis thaliana*, *Molecular and General Genetics MGG*, 194(1), 15-23, **1984**.
- Li, T., Hu, Y., Du, X., Tang, H., Shen, C. and Wu, J., Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreya grandis* cv. Merrillii seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems, *PLOS one*, 9(10), e109492, **2014**.
- Lichtenthaler, H.K., Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148, 350-382, **1987**.
- Liu, C., Dai, Z., Cui, M., Lu, W. and Sun, H., Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate boron toxicity in *Puccinellia tenuiflora* under the combined stresses of salt and drought, *Environmental Pollution*, 240, 557-565, **2018**.
- Liu, J., Hou, H., Zhao, L., Sun, Z. and Li, H., Protective Effect of foliar application of sulfur on photosynthesis and antioxidative defense system of rice under the stress of Cd, *Science of the Total Environment*, 710, 136230, **2020**.
- Lloyd, A.M., Barnason, A.R., Rogers, S.G., Byrne, M.C., Fraley, R.T. and Horsch, R.B., Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*, *Science*, 234(4775), 464-466, **1986**.
- Lovatt, C.J. and Bates, L.M., Early effects of excess boron on photosynthesis and growth of *Cucurbita pepo*, *Journal of Experimental Botany*, 35(3), 297-305, **1984**.
- Lukaszewski, K.M. and Blevins, D.G., Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism, *Plant Physiology*, 112(3), 1135-1140, **1996**.
- Lunn, J.E., Droux, M., Martin, J. and Douce, R., Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine (thiol) lyase in spinach leaves, *Plant Physiology*, 94(3), 1345-1352, **1990**.
- Macho-Rivero, M.Á., Camacho-Cristóbal, J.J., Herrera-Rodríguez, M.B., Müller, M., Munné-Bosch, S. and González-Fontes, A., Abscisic acid and transpiration rate are involved in the response to boron toxicity in *Arabidopsis* plants, *Physiologia Plantarum*, 160(1), 21-32, **2017**.
- Mahboobi, H., Yücel, M. and Öktem, H.A., 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, **2002**.

- Maloof, J.N., Nozue, K., Mumbach, M.R. and Palmer, C.M., LeafJ: an ImageJ plugin for semi-automated leaf shape measurement, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (71), e50028, **2013**.
- Mancinelli, A.L., Yang, C.P.H., Lindquist, P., Anderson, O.R. and Rabino, I., Photocontrol of anthocyanin synthesis: III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin, *Plant Physiology*, 55(2), 251-257, **1975**.
- Martinazzo, E.G., Ramm, A. and Bacarin, M.A., The chlorophyll a fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of *Prunus persica*, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24(4), 237-246, **2012**.
- Maruyama-Nakashita, A., Transcriptional regulation of genes involved in sulfur assimilation in plants: Understanding from the analysis of high-affinity sulfate transporters, *Plant biotechnology*, 25(4), 323-328, **2008**.
- Maruyama-Nakashita, A., Metabolic changes sustain the plant life in low-sulfur environments, *Current opinion in plant biology*, 39, 144-151, **2017**.
- Maruyama-Nakashita, A. and Ohkama-Ohtsu, N., Sulfur assimilation and glutathione metabolism in plants. Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance, M. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. Burritt, M. Fujita, LS. Tran, (Eds), Springer, Cham, 287-308, **2017**.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. and Takahashi, H., A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation, *The Plant Journal*, 38(5), 779-789, **2004a**.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. and Takahashi, H., Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation, *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1843-1849, **2004b**.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. and Takahashi, H., Induction of SULTR1; 1 sulfate transporter in Arabidopsis roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation, *Plant and Cell Physiology*, 45(3), 340-345, **2004c**.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T. and Takahashi, H., Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots, *The Plant Journal*, 42(3), 305-314, **2005**.
- Masood, A., Iqbal, N. and Khan, N.A., Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard, *Plant, Cell and Environment*, 35(3), 524-533, **2012**.

- Maruyama-Nakashita, A., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., Saito, K. and Takahashi, H., Sulfur-responsive elements in the 3'-nontranscribed intergenic region are essential for the induction of SULFATE TRANSPORTER 2; 1 gene expression in Arabidopsis roots under sulfur deficiency, *The Plant Cell*, 27(4), 1279-1296, **2015**.
- Matthes, M.S., Robil, J.M. and McSteen, P., From element to development: the power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants, *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1681-1693, **2020**.
- Matthews, M.A., Van Volkenburgh, E. and Boyer, J.S., Acclimation of leaf growth to low water potentials in sunflower, *Plant, Cell and Environment*, 7(3), 199-206, **1984**.
- Mazid, M., Khan, T.A. and Mohammad, F., Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine*, 3(2), 232-249, **2011**.
- Meena, K.K., Meena, R.S. and Kumawat, S.M., Effect of sulphur and iron fertilization on yield attributes, yield and nutrient uptake of mungbean (*Vigna radiata*), *Indian Journal of Agricultural Science*, 83(4), 472-476, **2013**.
- Mirecki, R.M. and Teramura, A.H., Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean: V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion, *Plant Physiology*, 74(3), 475-480, **1984**.
- Mishu, H.M., Ahmed, F., Rafii, M.Y., Golam, F. and Latif, M.A., Effect of sulphur on growth, yield and yield attributes in onion (*Allium cepa* L.), *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1416-1422, **2013**.
- Mitchell-Olds, T. and Schmitt, J., Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis, *Nature*, 441(7096), 947-952, **2006**.
- Miwa, K., Aibara, I. and Fujiwara, T., *Arabidopsis thaliana* BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron, *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(3), 349-355, **2014**.
- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K. and Fujiwara, T., Plants tolerant of high boron levels, *Science*, 318(5855), 1417-1417, **2007**.
- Miwa, K., Tanaka, M., Kamiya, T. and Fujiwara, T., Molecular mechanisms of boron transport in plants: involvement of Arabidopsis NIP5; 1 and NIP6; 1. Mips and their Role in the Exchange of Metalloids, T.P. Jahn, G.P. Bienert (Eds), Springer Science+Business Media, New York, 83-96, **2010**.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. and Therios, I., Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh), *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 54-62, **2006**.

- Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497, **1962**.
- Nable, R.O., Bañuelos, G.S. and Paull, J.G., Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193(1), 181-198, **1997**.
- Nakai, Y. and Maruyama-Nakashita, A., Biosynthesis of sulfur-containing small biomolecules in plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3470, **2020**.
- Nocito, F.F., Lancilli, C., Giacomini, B. and Sacchi, G.A., Sulfur metabolism and cadmium stress in higher plants, *Plant Stress*, 1(2), 142-156, **2007**.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279, **1998**.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C.H., Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1283-1304, **2002**.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y.I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. and Foyer, C.H., Glutathione in plants: an integrated overview, *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 454-484, **2012**.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. and Foyer, C.H., Glutathione, *Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9, e0142, **2011**.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P. and Darvill, A.G., Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109-139, **2004**.
- Onuh, A.F. and Miwa, K., Regulation, diversity and evolution of boron transporters in plants, *Plant and Cell Physiology*, 62(4), 590-599, **2021**.
- Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G. and Strasser, R J., Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering, *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 438-446, **2007**.
- Öz, M.T., Turan, Ö., Kayihan, C., Eyidoğan, F., Ekmekçi, Y., Yücel, M. and Öktem, H.A., Evaluation of photosynthetic performance of wheat cultivars exposed to boron toxicity by the JIP fluorescence test, *Photosynthetica*, 52(4), 555-563, **2014**.
- Ozturk, M., Sakcali, S., Gucl, S. ve Tombuloglu, H., Boron and plants. In: *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Dordrecht: Springer; p. 275–311, **2010**.
- Pandey, A., Khan, M.K., Hakki, E.E., Gezgin, S. and Hamurcu, M., Combined boron toxicity and salinity stress-An insight into its interaction in plants, *Plants*, 8(10), 364, **2019**.

Pandey, D.K. and Pandey, N., Screening of wheat genotypes for their susceptibility to boron deficiency, *Research in Environment and Life Sciences* (1), 37-42, **2008**.

Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A., Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks, *Plant Science*, 166(2), 539-547, **2004**.

Papadakis, I. E., Tsiantas, P. I., Tsaniklidis, G., Landi, M., Psychoyou, M. and Fasseas, C., Changes in sugar metabolism associated to stem bark thickening partially assist young tissues of *Eriobotrya japonica* seedlings under boron stress. *Journal of Plant Physiology*, 231, 337-345, **2018**.

Pereira, G.L., Siqueira, J.A., Batista-Silva, W., Cardoso, F.B., Nunes-Nesi, A. and Araújo, W.L., Boron: more than an essential element for land plants? *Frontiers in Plant Science*, 11, 2234, **2021**.

Piri, I.S.S.A. and Sharma, S.N., Effect of levels and sources of sulphur on yield attributes, yield and quality of Indian mustard (*Brassica juncea*), *Indian Journal of Agronomy*, 51(3), 217-220, **2006**.

Poisson, E., Trouverie, J., Brunel-Muguet, S., Akmouche, Y., Pontet, C., Pinochet, X. and Avice, J.C., Seed yield components and seed quality of oilseed rape are impacted by sulfur fertilization and its interactions with nitrogen fertilization, *Frontiers in Plant Science*, 10, 458, **2019**.

Pommerrenig, B., Diehn, T.A. and Bienert, G.P., Metalloido-porins: Essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport, *Plant Science*, 238, 212-227, **2015**.

Princi, M.P., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F. and Abenavoli, M.R., Boron toxicity and tolerance in plants: Recent advances and future perspectives, *Plant Metal Interaction*, 115-147, **2016**.

Princi, M.P., Lupini, A., Araniti, F., Sunseri, F. and Abenavoli, M.R., Short-term effects of boron excess on root morphological and functional traits in tomato. In XVII International Plant Nutrition Colloquium-Boron Satellite Meeting—Proceedings Book, 17–18 August, *Istanbul*, 1150-1151, **2013**.

Prioretti, L., Gontero, B., Hell, R. and Giordano, M., Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms, *Frontiers in Plant Science*, 5, 597, **2014**.

Ralston, N.V. and Hunt, C.D., Diadenosine phosphates and S-adenosylmethionine: novel boron binding biomolecules detected by capillary electrophoresis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(1-2), 20-30, **2001**.

Rashid, M.H.A., Effect of sulphur and GA 3 on the growth and yield of onion, *Progressive Agriculture*, 21(1-2), 57-63, **2010**.

Rausch, T. and Wachter, A., Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations, *Trends in Plant Science*, 10(10), 503-509, **2005**.

- Raven, J.A., Short- and long-distance transport of boric acid in plants, *New Phytologist*, 84(2), 231-249, **1980**.
- Reid, R. and Fitzpatrick, K., Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat, *Plant Physiology*, 151(1), 413-420, **2009a**.
- Reid, R. and Fitzpatrick, K.L., Redistribution of boron in leaves reduces boron toxicity, *Plant Signaling and Behavior*, 4(11), 1091-1093, **2009b**.
- Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R. and Graham, R.D., A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants, *Plant, Cell and Environment*, 27(11), 1405-1414, **2004**.
- Rennenberg, H., Schneider, S. and Weber, P., Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field, *Journal of Experimental Botany*, 47(10), 1491-1498, **1996**.
- Roessner, U., Patterson, J.H., Forbes, M.G., Fincher, G.B., Langridge, P. and Bacic, A., An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics, *Plant Physiology*, 142(3), 1087-1101, **2006**.
- Routray, P., Li, T., Yamasaki, A., Yoshinari, A., Takano, J., Choi, W.G. and Roberts, D.M., Nodulin intrinsic protein 7; 1 is a tapetal boric acid channel involved in pollen cell wall formation, *Plant Physiology*, 178(3), 1269-1283, **2018**.
- Sah, D., Sewak, R. and Singh, A.K., Growth, yield and profitability of indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss] with different weed control measures and sulphur levels, *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, 33(1), 15-20, **2013**.
- Saito, K., Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road, *Plant Physiology*, 136(1), 2443-2450, **2004**.
- Sakal, R., Sinha, R.B., Singh, A.P. And Bhogal, N.S., Effect of boron and FYM alone and in combination on boron nutrition of crops in maize-lentil cropping systems, *Fertilizer News*, 36, 43-49, 1999.
- Samanta, S., Singh, A. and Roychoudhury, A., Involvement of sulfur in the regulation of abiotic stress tolerance in plants. Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: Biochemical and Molecular Perspectives, A. Roychoudhury, D.K. Tripathi (Eds), Wiley-Blackwell, West Sussex, 437-466, **2020**.
- Scheerer, U., Haensch, R., Mendel, R.R., Kopriva, S., Rennenberg, H. and Herschbach, C., Sulphur flux through the sulphate assimilation pathway is differently controlled by adenosine 5'-phosphosulphate reductase under stress and in transgenic poplar plants overexpressing γ -ECS, SO, or APR, *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 609-622, **2010**.
- Scherer, H.W., Sulphur in crop production, *European Journal of Agronomy*, 14(2), 81-111, **2001**.

Scott, P., Photosynthesis: The Ultimate in Autotrophy, Physiology and Behaviour of Plants, 17-40, **2011**.

Sehar, Z., Jahan, B., Masood, A., Anjum, N.A. and Khan, N.A., Hydrogen peroxide potentiates defense system in presence of sulfur to protect chloroplast damage and photosynthesis of wheat under drought stress, *Physiologia Plantarum*, 172(2), 922-934, **2021**.

Serafin-Andrzejewska, M., Kozak, M. and Kotecki, A., Effect of different sulfur fertilizer doses on the glucosinolate content and profile of white mustard seeds, *Journal of Elementology*, 25(4), 1413-1422, **2020**.

Shah, A., Wu, X., Ullah, A., Fahad, S., Muhammad, R., Yan, L. and Jiang, C., Deficiency and toxicity of boron: Alterations in growth, oxidative damage and uptake by citrange orange plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 575-582, **2017**.

Shah, S.H., Islam, S. and Mohammad, F., Sulphur as a dynamic mineral element for plants: a review, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, (baskıda), **2022**.

Sharma, D.K., Fernández, J.O., Rosenqvist, E., Ottosen, C.O. and Andersen, S.B., Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat, *Journal of Plant Physiology*, 171(8), 576-586, **2014**.

Sharma, P.N. and Ramchandra, T., Water relations and photosynthesis in mustard plants subjected to boron deficiency, *Indian Journal of Plant Physiology*, 33(2), 150-154, **1990**.

Shelp, B.J., The influence of boron nutrition on nitrogen partitioning in broccoli plants, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21(1-2), 49-60, **1990**.

Sheng, H., Zeng, J., Liu, Y., Wang, X., Wang, Y., Kang, H. and Zhou, Y., Sulfur mediated alleviation of Mn toxicity in polish wheat relates to regulating Mn allocation and improving antioxidant system, *Frontiers in Plant Science*, 1382, **2016**.

Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Davies, J. P. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1; 2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *The Plant Journal*, 29(4), 475-486, **2002**.

Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J.L., Parmar, S., Zhao, F.J., McGrath, S.P. and Hawkesford, M.J., Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat, *Plant Physiology*, 153(1), 327-336, **2010**.

- Shital B., Khandagale, G.B. and Diksha, T., Role of sulphur and boron on the growth, yield and protein content of soybean (*Glycine max* L.), Trends in Biosciences, 7(22), 3565-3569, **2014**.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Sakran, A.M., Ali, H.M., Basalah, M.O., Faisal, M. and Al-Amri, A.A., Calcium-induced amelioration of boron toxicity in radish, Journal of Plant Growth Regulation, 32(1), 61-71, **2013**.
- Simón, I., Díaz-López, L., Gimeno, V., Nieves, M., Pereira, W.E., Martínez, V. and García-Sánchez, F., Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 176(2), 165-174, **2013**.
- Singh, M., Kushwaha, B.K., Singh, S., Kumar, V., Singh, V. P. and Prasad, S.M., Sulphur alters chromium (VI) toxicity in *Solanum melongena* seedlings: role of sulphur assimilation and sulphur-containing antioxidants, Plant Physiology and Biochemistry, 112, 183-192, **2017**.
- Singh, N.B. and Middendorf, B., Calcium sulphate hemihydrate hydration leading to gypsum crystallization, Progress in crystal growth and characterization of materials, 53(1), 57-77, **2007**.
- Skórzyńska-Polit, E., Drążkiewicz, M. and Krupa, Z., Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper, Acta Physiologiae Plantarum, 32(1), 169-175, **2010**.
- Skotnica, J., Matoušková, M., Nauš, J., Lazár, D. and Dvořák, L., Thermoluminescence and fluorescence study of changes in Photosystem II photochemistry in desiccating barley leaves, Photosynthesis Research, 65(1), 29-40, **2000**.
- Smaczniak, C., Immink, R.G., Angenent, G.C. and Kaufmann, K., Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies, Development, 139(17), 3081-3098, **2012**.
- Solanki, R.L., Mahendra, S., Sharma, S.K., Sharma, F.L. and Jain, H.K., Effect of levels of phosphorus, sulphur and phosphate solubilising bacteria on yield and micronutrient cation uptake of mustard [*Brassica juncea* (L.)] on a Haplustept, Indian Journal of Fertilisers, 12(2), 36-41, **2016**.
- Somerville, C. and Koornneef, M., A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant, Nature Reviews Genetics, 3(11), 883-889, **2002**.
- Speiser, A., Silbermann, M., Dong, Y., Haberland, S., Uslu, V. V., Wang, S. and Hell, R., Sulfur partitioning between glutathione and protein synthesis determines plant growth, Plant Physiology, 177(3), 927-937, **2018**.
- Stetsenko, L.A., Pashkovsky, P.P., Voloshin, R.A., Kreslavski, V.D., Kuznetsov, V. and Allakhverdiev, S.I., Role of anthocyanin and carotenoids in the adaptation of the photosynthetic apparatus of purple-and green-leaved cultivars

of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to high-intensity light, *Photosynthetica*, 58(4), 890-901, **2020**.

Strasser, B.J. and Strasser, R.J., Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test, P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. V, Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress. Montpellier, France, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1995**.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A., Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. Chlorophyll a Fluorescence. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19, G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds), 321-362, Springer, Dordrecht, **2004**.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S. and Goltsev, V., Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 1313-1326, **2010**.

Sugiyama, R. and Hirai, M.Y., Atypical myrosinase as a mediator of glucosinolate functions in plants, *Frontiers in Plant Science*, 1008, **2019**.

Sun, D., Hussain, H.I., Yi, Z., Rookes, J.E., Kong, L. and Cahill, D.M., Mesoporous silica nanoparticles enhance seedling growth and photosynthesis in wheat and lupin, *Chemosphere*, 152, 81-91, **2016**.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. and Murphy, A., *Plant physiology and Development* (Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated, **2015**.

Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K. and Hell, R., Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes, *Annual Review of Plant Biology*, 62, 157-184, **2011**.

Takahashi, H., Sulfate transport systems in plants: functional diversity and molecular mechanisms underlying regulatory coordination, *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4075-4087, **2019**.

Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F.W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M.J. and Saito, K., The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 23(2), 171-182, **2000**.

Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wirén, N. and Fujiwara, T., Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12276-12281, **2005**.

- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T., Arabidopsis boron transporter for xylem loading, *Nature*, 420(6913), 337-340, **2002**.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S. and Fujiwara, T., Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 5220-5225, **2010**.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., Von Wirén, N. and Fujiwara, T., The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5; 1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation, *The Plant Cell*, 18(6), 1498-1509, **2006**.
- Tanaka, M. and Fujiwara, T., Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants, *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(4), 671-677, **2008**.
- Tanaka, M., Wallace, I. S., Takano, J., Roberts, D.M. and Fujiwara, T., NIP6; 1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 20(10), 2860-2875, **2008**.
- Tariq, M. and Mott, C.J.B., The significance of boron in plant nutrition and environment-a review, *Journal of Agronomy*, 6(1), 647-650, **2007**.
- Terzi, H. and Yıldız, M., Proteomic analysis reveals the role of exogenous cysteine in alleviating chromium stress in maize seedlings, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111784, **2021**.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N. and Fujiwara, T., An Arabidopsis thaliana high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18807-18812, **2007**.
- Tóth, S.Z., Schansker, G., Kissimon, J., Kovács, L. and Strasser, R.J., Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Plant Physiology*, 162(2), 181-194, **2005**.
- Traka, M.H., Health benefits of glucosinolates. *Advances in Botanical Research*, 80, 247-279, **2016**.
- Tsimilli-Michael, M. and Strasser, R.J., Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP. *Photosynthesis. Energy from the Sun*, J.F. Allen, E. Gantt, J.H. Golbeck, B. Osmond, (Eds) Springer, Dordrecht, 697-701, **2008**.
- Umar, M., Uddin, Z. and Siddiqui, Z.S., Responses of photosynthetic apparatus in sunflower cultivars to combined drought and salt stress, *Photosynthetica*, 57(2), 627-639, **2019**.

Voxeur, A. and Fry, S.C., Glycosylinositol phosphorylceramides from *Rosa* cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II, *The Plant Journal*, 79(1), 139-149, **2014**.

Wakuta, S., Mineta, K., Amano, T., Toyoda, A., Fujiwara, T., Naito, S. and Takano, J., Evolutionary divergence of plant borate exporters and critical amino acid residues for the polar localization and boron-dependent vacuolar sorting of AtBOR1, *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 852-862, **2015**.

Wang, C.L. and Oliver, D.J., Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of agsh2 mutant in fission yeast, *Plant Molecular Biology*, 31(6), 1093-1104, **1996**.

Wang, N., Yang, C., Pan, Z., Liu, Y. and Peng, S.A., Boron deficiency in woody plants: various responses and tolerance mechanisms, *Frontiers In Plant Science*, 6, 916, **2015**.

Wang, R., Chen, S., Deng, L., Fritz, E., Hüttermann, A. and Polle, A., Leaf photosynthesis, fluorescence response to salinity and the relevance to chloroplast salt compartmentation and anti-oxidative stress in two poplars. *Trees*, 21(5), 581-591, **2007**.

Warrington, K., The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants, *Annals of Botany*, 37(148), 629-672, **1923**.

Wawrzynska, A., Moniuszko, G. and Sirko, A., Links between ethylene and sulfur nutrition—a regulatory interplay or just metabolite association? *Frontiers in Plant Science*, 6, 1053, **2015**.

Wimmer, M.A. and Eichert, T., Mechanisms for boron deficiency-mediated changes in plant water relations, *Plant science*, 203, 25-32, **2013**.

Wimmer, M.A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühlhng, K.H. and Goldbach, H.E., Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography, *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1292-1304, **2009**.

Wongkaew, A., Asayama, K., Kitaiwa, T., Nakamura, S.I., Kojima, K., Stacey, G. and Ohkama-Ohtsu, N., AtOPT6 protein functions in long-distance transport of glutathione in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 59(7), 1443-1451, **2018**.

Yadav, P., Kaur, R., Kanwar, M.K., Sharma, A., Verma, V., Sirhindi, G. and Bhardwaj, R., Castasterone confers copper stress tolerance by regulating antioxidant enzyme responses, antioxidants, and amino acid balance in *B. juncea* seedlings, *Ecotoxicology and Environmental safety*, 147, 725-734, **2018**.

Yao, X. and Liu, Q., Changes in photosynthesis and antioxidant defenses of *Picea asperata* seedlings to enhanced ultraviolet-B and to nitrogen supply, *Physiologia Plantarum*, 129(2), 364-374, **2007**.

Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. and Takahashi, H., Phloem-localizing sulfate transporter, *Sultr1; 3*, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 131(4), 1511-1517, **2003**.

Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T. and Saito, K. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots, *The Plant Journal*, 29(4), 465-473, **2002**.

Yoshinari, A. and Takano, J., Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1951, **2017**.

Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. and Sarin, N. B., Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(8), 1428-1438, **2010**.

Zhang, H., Hao, X., Zhang, J., Wang, L., Wang, Y., Li, N. and Zeng, J., Genome-wide identification of *SULTR* genes in tea plant and analysis of their expression in response to sulfur and selenium. *Protoplasma*, 259(1), 127-140, **2022**.

Zhang, L., Kawaguchi, R., Morikawa-Ichinose, T., Allahham, A., Kim, S. J. and Maruyama-Nakashita, A., Sulfur deficiency-induced glucosinolate catabolism attributed to two β -glucosidases, BGLU28 and BGLU30, is required for plant growth maintenance under sulfur deficiency, *Plant and Cell Physiology*, 61(4), 803-813, **2020**.

Zhang, X., Kang, J., Pang, H., Niu, L. and Lv, J., Sulfur mediated improved thiol metabolism, antioxidant enzymes system and reduced chromium accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) shoots, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(35), 35492-35500, **2018**.

Zuber, H., Davidian, J.C., Aubert, G., Aimé, D., Belghazi, M., Lugan, R. and Gallardo, K., The seed composition of *Arabidopsis* mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds, *Plant Physiology*, 154(2), 913-926, **2010**.