

***Arabidopsis thaliana*'DA TUZ ÖN UYGULAMASI İLE
BOR TOLERANS KAZANIMINDA ANTOSİYANİNİN
ÇOKLU FONKSİYONEL ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF MULTIPLE FUNCTIONAL ROLES
OF ANTHOCYANIN IN BORON TOLERANCE
ACQUISITION BY SALT PRE-TREATMENT OF
*Arabidopsis thaliana***

EFE DALLI

**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 TUZ ÖN UYGULAMASI İLE BOR TOLERANS KAZANIMINDA ANTOSİYANİNİN ÇOKLU FONKSİYONEL ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Efe DALLI

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

Ocak 2021, 101 sayfa

Bu tez kapsamında model bitki *Arabidopsis thaliana*'da tuz ön uygulaması ile bor tolerans kazanımının 1) bazı fizyolojik, fotokimyasal ve antioksidan enzim aktiviteleri ve 2) çoklu fonksiyonlara sahip antosiyaninin sentez yolağında yer alan bazı genlerin ifade değişimleri araştırılarak, aydınlatılması amaçlanmıştır.

Arabidopsis tohumları MS besiyeri ortamı içeren petri kapları içerisinde 3 gün +4°C'de karanlık koşullarda stratifikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra çimlenen bitkiler kontrollü iklim kabininde (22± 1 °C sıcaklık, 16/8 fotoperiyot, 200 µmol.m⁻²s⁻¹ ışık şiddeti ve %50-60 nem koşullarında) 12 gün boyunca yetiştirilmiştir. Ardından ön uygulama grupları 3 gün boyunca NaCl tipi tuz içeren besiyerlerine aktarılmış, 3 günün sonunda ön uygulamasız gruplar ile beraber farklı bor konsantrasyonları içeren (3 ve 5 mM H₃BO₃) petri kaplarına transfer edilerek 7 gün süre ile bor toksisitesine maruz bırakılmışlardır.

Arabidopsis bitkisinde bor birikimine bağlı olarak, sürgün biyokütlesi ve yaprak yüzey alanı azalmıştır. Bunun yanı sıra, bor toksitesi, *Arabidopsis* bitkilerinin sürgününde bor birikimi ile birlikte Cl⁻ alımının artmasına, K⁺ alımının ise

azalmasına neden olmuştur. Yapraklara taşınan borun toksik seviyeleri, fotosentetik aparatları ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz etkilemiştir. Bor toksisitesi, tilakoid membranlardaki fluoreans geçişlerinde (Kaustky eğrisi), spesifik (ABS/RC, TR_o/RC, ET_o/RC, D_l_o/RC, RE/RC) ve fenomenolojik (ABS/CS, TR_o/CS_o, ET_o/CS_o, D_l_o/CS_o) enerji akışlarında, kuantum veriminde (ϕ_{EO}), PSII'nin donör (V_K/V_J) ve PSI'in akseptor (ΔV_{IP}) kısımlarının etkinliğinde değişimlere yol açmıştır. Bu değişimler fotosentetik performans (PI_{ABS} / PI_{TOP}) bileşenlerinde de önemli düzeyde azalmalara sebep olmuştur. Bor toksisitesi altındaki bitkilerin fotokimyasal etkinliğindeki azalışın, aktif reaksiyon merkezindeki azalış ve enerjinin ısı şeklinde kaybındaki artış ile ilişkili olduğunu ortaya konulmuştur. Ayrıca B toksisitesinin her iki fotosistemi de olumsuz etkilediği ve PSI 'in PSII'ye göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Model bitkide bor toksisitesinin neden olduğu bu olumsuz etkilenenin membran bütünlüğü ile anten ve aktif reaksiyon merkezlerindeki pigment miktarlarını etkilese de bu etkinin, fotosistemlerin işlevselliklerini durduracak düzeyde olmadığı ve tuz ön uygulaması ile hafifletilebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular MDA sonuçları ve biyokütlerdeki değişim ile de uyumludur.

Arabidopsis bitkisi, tuz ön uygulaması ile antioksidan enzim aktivitelerinde ve fenolik bileşikler (antosiyenin ve flavonoid) içeriğindeki artışlar ile koruyucu savunma sistemlerini düzenleyerek bor toksisitesine karşı tolerans kazanmıştır. Toksik bor seviyelerinde antioksidan enzimlerden özellikle POD aktivitesinin belirgin ve tutarlı bir şekilde artışı, oksidatif hasar sonucu oluşan H₂O₂ detoksifikasyonunda etkin rol aldığını göstermektedir. Bunun yanısıra askorbat-glutasyon yolunda yer alan APX ve GR ile GST aktivitelerindeki artışlar, hasarlara karşı bitkiyi korumada rol almışlardır. Tüm bu enzimlerin aktiviteleri tuz ön uygulamalı gruplarda daha yüksek çıkmıştır.

Antosiyenin savunmadaki çoklu fonksiyonları, antosiyenin sentezinde görev alan bazı genlerin ve transkripsiyon faktörlerindeki ifade değişimleri incelenmiştir. Transkripsiyon faktörlerinden olan *MYB75*, *MYB114* ve *MYBD* ifadelerinde toksisite altında artış görülmüştür. Sentez yolağında görev alan *PAL2*, *4CL3*, *C4H* genlerinin ifadesi artmış olup, *ANS* geninde herhangi bir fark görülmemiştir. *GSH1* ve *GST26* genlerindeki ifade artışı, antosiyenin-GSH ve/veya GST-

antosiyenin kompleksleri oluşturarak ve bor elementini bağlayarak, oksidatif hasara karşı korumada rol almış olabileceğini gsterir.

Tuz ön uygulamasının bitkilerin savunma sistemini yıkıcı toksisiteyle karşılaşmadan önce uyarıyor ve yüksek konsantrasyonda bor ile karşılaştığında bu duruma tolerans kazanımı sağladığı ortaya konulmuştur. Bunun yanında antosiyenin sentez yolağında yer alan ve antosiyeninle ilişkili genlerdeki artan ifade miktarları bu sistemin savunmada önemli bir rol aldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, Antioksidant enzimler, Antosiyenin, Bor toksisitesi, Fotosentetik aktivite, Gen ifadesi, Tolerans kazanımı, Tuz ön uygulama

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MULTIPLE FUNCTIONAL ROLES OF ANTHOCYANIN IN BORON TOLERANCE ACQUISITION BY SALT PRE-TREATMENT OF *Arabidopsis thaliana*

Efe DALLI

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Yasemin EKMEKÇI

January 2021, 101 pages

In the scope of this thesis, it is aimed to elucidate the acquisition of boron tolerance by salt pretreatment in the model plant *Arabidopsis thaliana* by investigating 1) some physiological, photochemical and antioxidant enzyme activities and 2) the changes in some genes expression involved in the synthesis pathway of anthocyanin which has multiple functions.

After *Arabidopsis* seeds were subjected to stratification in petri dishes containing MS medium for 3 days at +4°C in dark conditions, the germinated plants were grown in a controlled growth chamber (22± 1°C temperature, 16/8 photoperiod, $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity and 50-60% humidity) for 12 days. Then, the pre-treatment groups were transferred to media containing NaCl-type salt for 3 days, and at the end of 3 days, they were transferred to petri dishes containing different boron concentrations (3 and 5 mM H_3BO_3) together with the groups without pre-treatment and exposed to boron toxicity for 7 days.

Due to boron accumulation in Arabidopsis plant, shoot biomass and leaf area decreased. In addition to this, boron toxicity caused an increase in Cl^- uptake and a decrease in K^+ uptake with boron accumulation in shoots of Arabidopsis plants. Toxic levels of boron transported to leaves adversely affected photosynthetic apparatus and photosynthetic activity. Boron toxicity led to changes in fluorescence transitions (Kautsky curve), specific (ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC , Dl_0/RC , RE/RC) and phenomenological (ABS/CS , TR_0/CS_0 , ET_0/CS_0 , Dl_0/CS_0) energy flows in thylakoid membranes, quantum yield (ϕ_{EO}), the efficiencies of the donor side (V_K/V_J) of PSII and the acceptor (ΔV_{IP}) side of PSI. These changes caused significant reductions in photosynthetic performance ($\text{PI}_{\text{ABS}} / \text{PI}_{\text{TOP}}$) and components. It has been revealed that the decrease in the photochemical efficiency of plants under boron toxicity is associated with the decrease in the active reaction center and the increase in the loss of energy in the form of heat. In addition, it was determined that B toxicity affects both photosystems negatively and PSI is affected more than PSII. Although this negative effect caused by boron toxicity in the model plant affected the membrane integrity and the amounts of pigments in the antenna and active reaction centers, it has been determined that this effect was not at a level to cease the functionality of the photosystems and could be alleviated with salt pre-treatment. These findings are also consistent with the MDA results and the change in biomass.

Arabidopsis plant gained tolerance against boron toxicity by regulating its protective defense systems with the increases in antioxidant enzymes activities and the content of phenolic compounds (anthocyanin and flavonoid) with salt pretreatment. The significant and coherent increase in the activity of antioxidant enzymes, especially POD, at toxic boron levels has showed that it plays an active role in the detoxification of H_2O_2 resulting from oxidative damage. Besides, increases in the activities of APX, GR and GST, which are involved in the ascorbate-glutathione pathway, have been involved in protecting the plant against damages. The activities of all these enzymes were higher in salt pre-treated groups.

Multiple functions of anthocyanin in defense, the changes in expression of some genes and transcription factors involved in anthocyanin synthesis were

investigated. Expressions of *MYB75*, *MYB114* and *MYBD*, which are transcription factors, increased under toxicity. Expression of *PAL2*, *4CL3*, *C4H* genes involved in the synthesis pathway increased, but no difference was observed in the *ANS* gene. The increase of expression of *GSH1* and *GST26* genes might have played a role in protection against oxidative damage by forming anthocyanin-GSH and/or GST-anthocyanin complexes and binding the boron element.

It has been exhibited that salt pre-treatment has been inducing the defense system of plants before they encounter destructive toxicity and, it provides tolerance to this situation when it encounters high concentrations of boron. In addition, the increased expression amounts in anthocyanin-related genes which are involved in the anthocyanin synthesis pathway show that this system plays an important role in defense.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*, Antioxidant enzymes, Anthocyanin, Boron toxicity, Photosynthetic activity, Gene expression, Tolerance acquisition, salt pretreatment

**Tez çalışmalarım sırasında kaybettiğim
köpeğim Asya ve kedim Osman'a**

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında son derece sabırlı ve hoşgörölü bir şekilde bütün bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ'ye;

Tezimin çeşitli aşamalarında özellikle de gen ifade analizleri ve yorumlanmasında her türlü soruma cevap veren ve yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Ceyhun KAYIHAN'a;

Değerli önerileri ve manevi destekleri ile birlikte sağladıkları olanaklardan dolayı sayın Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK'e;

İyon analizlerinin yapılmasında sağladıkları olanak ve yardımlarından dolayı Uzman Dr. Yasemin ÖZTÜRK'e;

Takıldığım her sorunda sabırla yardımını aldığım Dr. Arş. Gör. Şeküre ÇULHA ERDAL'a;

Tezimde kullandığım Arabidopsis tohumlarını temininde yardımcı olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY'a;

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, sürekli destekleyen, kendi işleri gibi özenerek çalışan laboratuvar arkadaşlarım Seda YİRMİBEŞ'e, Omar NASHAT'a, Cihan ÜNAL DEĞİRMENCİ'ye ve Kamile Hazal TATAR'a;

Bugün olduğum yere gelmemi sağlayan ve rol modelim olan ablam Ece ŞAHİN'e, her zaman sevgilerini ve desteklerini hissettiğim anneme ve babama;

Tez boyunca yardımlarını esirgemeyen bütün özel çalışma öğrencilerimize;

Bu tez, FBA-2020-18859 nolu projenin bir kısmını oluşturması nedeni ile sağladığı destekten dolayı Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimine çok teşekkür ederim.

Efe DALLI

Ocak 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisi.....	5
2.2. Bitki Büyüme ve Gelişmesi için Mutlak Gerekli Mikrobesein Elementi, Bor.....	7
2.3. Bor Alımı ve Taşınımı.....	8
2.4. Bor Elementinin Bitkideki Rolü.....	12
2.5. Bor Toksisitesinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi.....	15
2.5.1. Bor Toksisitesinin Kök Gelişimi Üzerine Etkisi.....	16
2.5.2. Bor Toksisitesinin Fotosentez Üzerine Etkisi.....	16
2.5.3. Bor Toksisitesinin Savunma Sistemi Üzerine Etkisi.....	18
2.5.4. Bor Toksisitesinin Azot Metabolizması Üzerine Etkisi.....	18
2.5.5. Bor Toksisitesinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkisi.....	19
2.6. Bor Toleransı.....	19
2.6.1. Bor Toleransında Fenolikler.....	19
2.6.2. Bor Toleransında Antosiyaninin Rolü.....	20
2.6.3. Bor Toleransında Bor Taşıyıcılarının ve Pompalarının Rolü.....	23
2.6.4. Bor Toleransında Antioksidan Savunma Sistemi.....	24
2.6.5. Bor ve Tuz İlişkisi.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Bitki materyali.....	26
3.1.1. Bitki Yetiştirme Yöntemi.....	26

3.2. Ölçüm ve Analizler.....	29
3.2.1. Morfolojik Ölçümler.....	29
3.2.1.1. Yaprak Yüzey Alanı Ölçümü.....	29
3.2.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle) Ölçümleri.....	29
3.2.2. Fotosentetik Aktivite Ölçümleri.....	29
3.2.3. Biyokimyasal Ölçümler.....	33
3.2.3.1. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.2.3.2. Antosiyanin ve Flavonoid Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.2.3.3. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi.....	34
3.2.3.4. Bor, Sodyum ve Potasyum Miktar Tayini.....	34
3.2.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.4.1. Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	35
3.2.4.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	35
3.2.4.3. Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Belirlenmesi...	35
3.2.4.4. Toplam Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
3.2.4.5. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri.....	37
3.2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.	37
3.2.5.2. RNA'lardan Tamamlayıcı Tek Zincirli DNA (cDNA) Sentezi...	38
3.2.5.3. Primer Tasarımı.....	38
3.2.5.4. Gerçek Zamanlı (Real Time) Ters Transkriptaz (RT) PCR.....	39
3.2.5.5. Normalize Edilmiş Gen Miktarı Hesaplanması.....	39
3.3. Veri Analizi.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Model Organizma <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisinde Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransının Kazanımında Morfolojik Değişimler	42
4.1.1. Bitki Gelişimi ve Yaprak Yüzey Alanındaki Değişimler.....	42
4.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle) Değişimleri.....	43
4.2. Model Organizma <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisinde Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransının Kazanımında Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler..	45
4.2.1. Bor Birikimi ve Bazı İyon İçeriklerindeki Değişimler.....	45
4.2.2. Membran Bütünlüğündeki Değişimler.....	47

4.2.3. Fotokimyasal Aktivitedeki Değişimler.....	47
4.2.4. Fotosentetik Pigment İçeriğindeki Değişimler.....	53
4.2.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarındaki Değişimler.....	55
4.2.6. Tolerans Kazanımında Savunma Sistemlerinin Rolü.....	55
4.2.6.1 Antosiyanin ve Flavonoid Pigment Miktarlarındaki Değişimler.....	55
4.2.7. Metaloid Detoksifikasyonunda Rol Alan Bazı Enzim Aktivitelerindeki değişimler.....	57
4.2.7.1. Glutasyon Redüktaz (GR) ve Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi.....	57
4.2.7.2. Peroksidaz (POD) Aktivitesi.....	58
4.2.7.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi.....	58
4.2.8. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'da, Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransında Antosiyanin Biyosentez Yolağında Yer Alan Bazı Gen ve/veya Genlerdeki Değişimler.....	59
4.2. 8.1 RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	59
4.2. 8.2 Genlerin Oransal İfadesi.....	59
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın hayat döngüsündeki farklı aşamaları (tohumdan olgunluğa) (A), Çiçek (B), Polen tanesi (taramalı elektron mikroskobu görüntüsü) (C), Olgunlaşmış silikula meyve (D).....	6
Şekil 2.2.	Bitki hücrelerine borik asit/fenilboronik asit (PBA) alımı. (A) Difüzyon veya NIP5;1 kanal proteini yoluyla borik asit ve PBA'nın pasif ve aktif alım mekanizmaları. Sitozolik pH'da borik asit ve PBA, hücre duvarındaki ramnogalakturonan-II (RG-II) monomerleri ile reaksiyona girecek borat ve fenilboronat anyonlarını oluştururlar. Bir bitki hücresinden borat ve fenilboronatın atımı, difüzyon veya BOR1 taşıyıcısı yoluyla gerçekleşir (B) İki RG-II monomerini çapraz bağlayan borat ve sadece bir RG-II monomerine çapraz bağlanan fenilboronata ait hücre duvarı pektin matrisinin yakından görünümü. (C) Borat anyonunun ve fenilboronat anyonunun RG-II monomerleri ile reaksiyonu	9
Şekil 2.3.	B'un köklerle topraktan alınması, gövdeye iletilmesi ve taşınması...	10
Şekil 2.4.	Hücre duvarında borun bağlanma yerleri: (A) bitki hücre duvarında bor-ramnogalakturonan II kompleksinin şematize hali, (B) iki RG-II molekülü, her bir RG-II monomerinin A yan zincirindeki apiosil reziduları (açık daire) arasında oluşturulan bir borat ester ile kovalent olarak bağlanması.....	13
Şekil 2.5.	Bor toksisitesinin bitkilerdeki semptomlarının gösterimi. (a) B-mobil bitkilerdeki semptomlar, (b) B-inmobil bitkilerdeki semptomlar	16
Şekil 2.6.	Antosiyanin sentez yolağı (yeşil alan: fenilpropanoid yolağının başlangıcı, pembe alan: erken evre, mavi alan: geç evre).....	21
Şekil 2.7.	B toksisitesi altındaki hücrede antosiyaninler oksidasyona karşı B-antosiyanin kompleksleri oluşturarak, hücre içerisindeki B fazlalığının zararlı etkilerini hafifletmesinin şekilsel gösterimi	22

Şekil 3.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin 22 günlük deney sonundaki genel görünüşleri.....	27
Şekil 3.2.	Deney planı.....	28
Şekil 3.3.	a) HandyPEA cihazının genel görünümü, b) Biolyzer HP3 programı ile analiz görüntüsü ve c) Bitkiler tarafından sergilenen tipik polifazik klorofil a fluoeresans eğrisi	30
Şekil 3.4.	Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'larının agaroz jelelektroforezi görüntüleri	37
Şekil 4.1.	22 günlük deneme sonunda tuz ön uygulamalı ve/veya ön uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin genel görüntüsü	42
Şekil 4.2.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde imageJ@ programı ile hesaplanan yaprak yüzey alanlarındaki değişim	43
Şekil 4.3.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin yaş ağırlığı üzerine etkisi	43
Şekil 4.4.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin kuru ağırlığı üzerine etkisi	44
Şekil 4.5.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin yaş ve kuru ağırlık tolerans indeksi üzerine etkisi...	44
Şekil 4.6.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin (A) bor birikimi.....	45
Şekil 4.7.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin (A) sodyum, (B) klor ve (C) potasyum miktarları üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.8.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin MDA içeriği üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.9.	Yapraklardaki karakteristik polifazik OJIP eğrileri; (B) O-J (C) J-I ve (D) I-P.....	48
Şekil 4.10.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin fotosentetik aparatlardaki spesifik enerji akışları (RC başına).....	49

Şekil 4.11.	Tuz ön uygulamalı veya uygulamasız olarak farklı konsantrasyonlarda bor toksisitesine maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin fotosentetik aparatlarında enerji akış teorisine dayanan ve JIP test ile hesaplanan bazı JIP parametrelerindeki değişim.....	51
Şekil 4.12.	Tuz ön uygulamalı veya uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin fotosentetik performansları ve bileşenleri üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.13.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin yapraklarındaki fenomolojik enerji akışları (birim yaprak alanı başına, CSo). Fenomolojik enerji akış parametrelerini gösteren okların genişlikleri, parametrelerin nispi değerlerini temsil etmektedir. Enerji akışları; her bir yaprak alanı başına absorplanan enerji (ABS/CSo), yakalanan enerji (TR/CSo), elektron taşıma (ET/CSo) ve aşırı uyarılma enerjisinin ısı olarak yayılımını (DI/CSo) içermektedir. Siyah daireler inaktif, açık daireler aktif reaksiyon merkezlerini temsil etmektedir.....	52
Şekil 4.14.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin toplam klorofil (a+b) miktarı üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.15.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde klorofil a/b oranı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.16.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.17.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.18.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin antosiyanin içeriği üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.19.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin flavonoid içeriği üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.20.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin APX aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.21.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin GR aktivitesi vüzerine etkisi.....	57

Şekil 4.22.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin POD aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.23.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinin GST aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.24.	Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	59
Şekil 4.25.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>PAL2</i> geninin ifade oranları.....	60
Şekil 4.26.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>C4H</i> geninin ifade oranları.....	60
Şekil 4.27.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>4CL3</i> geninin ifade oranları.....	61
Şekil 4.28.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>MYB75</i> transkripsiyon faktörünün ifade oranları.....	61
Şekil 4.29.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>MYB114</i> transkripsiyon faktörünün ifade oranları.....	62
Şekil 4.30.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>MYBD</i> transkripsiyon faktörünün ifade oranları.....	63
Şekil 4.31.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>TT8</i> transkripsiyon faktörünün ifade oranları.....	63
Şekil 4.32.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>ANS</i> geninin ifade oranları.....	64
Şekil 4.33.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>GSH1</i> geninin ifade oranları.....	64
Şekil 4.34.	Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesi maruz kalan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde <i>GST26</i> geninin ifade oranları.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin içeriği	26
Çizelge 3.2.	Deneme gruplarına ait rumuzlar ve açıklamaları.....	28
Çizelge 3.3.	OJIP testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamalarının ve formüllerinin özeti.....	31
Çizelge 3.4.	Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'ların konsantrasyonları.....	38
Çizelge 3.5.	Tasarlanan primerlerin sekansları, AGI kodları ve gen adları....	40

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
AÖF	Anlamlı önemli fark
APX	Askorbat peroksidaz
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
CAT	Katalaz

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 (ϕP_0)	PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği (TR ₀ /ABS)
F _V /F ₀	PSII'de O ₂ oluşturan kompleksin etkinliği
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
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
¹ O 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

$RE_0/ET_0 (\delta R_0)$	İndirgenmiş sistemler arası elektron alıcılarının bir elektronu PSI son elektron alıcılarına hareket ettirme etkinliği
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik paket programı (Statistical Package for the Social Sciences)
TA	Taze ağırlık
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TFA	Trifloroasetik asit
UV	Ultraviyole

GİRİŞ

Doğada diğer elementlerle 200'den fazla farklı formda bileşik oluşturan ve periyodik cetvelde 3A grubu elementi olan bor (B); silikon (Si), arsenik (As) ve germanyum (Ge) gibi metal ve ametal arasında yarı-metal (metaloit) özellik göstermektedir (Nable, Banuelos ve Paull, 1997). Doğada yaygın olarak bulunmayan bir element olmasına karşın Türkiye, %73'lük oran ile dünyanın en büyük bor rezervine sahip ülke konumundadır (Anonim, 2020). Bor, bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bir mikrobesein maddesidir (Warrington, 1923). Bunun yanı sıra reaktif olmayan bor elementi, biyolojik sistemler içerisinde bulunan kompleks bazı biyomoleküllerle etkileşime girebilir. Bu biyomoleküllerin en belirgin özelliği de cis formunda hidroksil gruplarına sahip (örn., riboz, apioz, sorbitol, bazı fenolikler ve serin gibi aminoasitler) olmalarıdır (Loomis ve Durst, 1992). Bor elementinin bitkiler üzerine etkisinde, biyomoleküllerle arasındaki etkileşim kritik bir rol oynar. Bu bağlamda, bor elementinin bitkilerde tespit edilen ilk fonksiyonu, hücre duvarında bulunan ramnogalaktronan kompleksinde yer alan apioz şekerleriyle çapraz bağ yaparak, hücre duvarına sağladığı esnekliktir (Ryden ve ark., 2003; O'Neill ve ark., 2004). Bu yapısal rolü ile bor, genç dokuların gelişimi için oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra, bor elementinin bitki hücresinde şeker taşınımı, karbonhidrat, ribonükleotid (RNA) ve fenol metabolizmaları, zar bütünlüğü ve fonksiyonu ile bazı enzim regülasyonlarında doğrudan veya dolaylı rolleri bulunmaktadır (Reid ve ark., 2004). Doğada bor eksikliği kadar yaygın karşılaşılmamasına rağmen, topraktaki bor fazlalığı (toksisitesi) da bitki büyümesini olumsuz yönde etkileyen bir faktör olarak gözlemlenebilmektedir. Dünya toprakları ya doğal süreçlerle ya da aşırı gübreleme ve fazla miktarda bor içeren su ile sulama sonucu bor toksisitesiyle karşı karşıya kalmaktadır (Gupta, Macleod ve Sterling, 1976; Severson ve Gouch, 1983). Bor toksisitesi, borun topraktaki konsantrasyonunun 12mg/kg üstüne çıktığında görülmeye başlar ve genellikle yıllık yağış miktarının 550 mm'den az olan alanlarda görülmektedir (Hall, 2010). Yüksek bor içeren bu topraklarda yetişen bitkilerde, bor alımı ve birikimine bağlı olarak, toksik bor düzeyleri hücrelerde yapısal ve metabolik bozulmalara [hücre duvarı yapısı, riboz içeren biyomoleküllere (ATP, NADH, NADPH) bağlanma ve hücre bölünmesi ile hücre gelişimi] sebep olmaktadır (Reid ve ark., 2004). Toksik bor düzeylerine maruz

kalan bitkilerde fotosentetik etkinliği devam ettirebilme yeteneği, bitkilerin bor toleransında önemli bir kazanımdır (Öz ve ark., 2014). Bitkilerin bor toksisitesine verdikleri cevaplar veya tolerans durumları bitkiden bitkiye, türden türe hatta aynı türün çeşitlerinde bile farklılık gösterebilmektedir (Nable, Banuelos ve Paull, 1997).

Çeşitli bitkilerle yapılan bir grup çalışmada; bitkinin kritik seviyenin üzerindeki bor elementini hücre içine alımını sınırlandırmasıyla bor tolerans mekanizmasının gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Nable, 1988; Paull, Cartwright ve Rathjen, 1988). Bunun yanı sıra, yapılan diğer bazı çalışmalarda ise, bor toleranslı genotiplerde bor alımını sınırlamadan ziyade, bor atım mekanizmasının daha etkin olduğu öngörülmektedir (Paull ve ark., 1992). Bitkilerde bor taşınımından sorumlu özgün bor taşıyıcıları bulunmuştur. Bunlardan bazıları *Arabidopsis thaliana*'da BOR1 (Takano ve ark., 2002) ve BOR4 (Miwa ve ark., 2007), arpa bitkisinde Bot1 (Reid, 2007; Sutton ve ark., 2007), buğday bitkisinde TaBor2'dir (Reid, 2007). Tespit edilen ilk bor taşıyıcısı olan BOR1, bor elementinin ksilem parankima hücrelerinden ksileme taşınmasını sağlamasının yanı sıra toksik bor düzeylerinde bozunmaktadır (Takano ve ark., 2005; Miwa, Takano ve Fujiwara, 2006). İkinci tespit edilen BOR4 taşıyıcısı ise, yüksek bor koşulları altında bozunmamaktadır (Miwa ve ark., 2007). Ayrıca TaBor2, Bot1 ve aquaporinlerin (Major Intrinsic Proteins, MIPs) bitkilerde bor toksisitesine karşı toleransta da görev aldığı gösterilmiştir (Reid, 2007; Pommerrenig, Diehn ve Bienert, 2015). Transgenik yaklaşım metotları kullanılmadan, doğal koşullarda bor akümülatör özelliği olmayan bitkiler, bazı uygulamalar ile uyumlandırılarak bor toksisitesine karşı tolerans kazanımı sağlanabilmektedir. Silikon (Çelikkol Akçay ve Erkan, 2016), mannitol (Coşkun ve ark., 2014), nitrik oksit (Esim ve Atıcı, 2013), selenyum (Çatav, Köşkeröğlu ve Tuna, 2022), duman ve duman kökenli bileşikler (Çatav ve Küçükakyüz, 2021), kalsiyum (Siddiqui ve ark., 2013), tuz (Grieve ve ark., 2010) ve arbuskular mikoriza (Liu ve ark., 2018) gibi uygulamaların, toksik bor koşulları ile birlikte verildiğinde, bitkide bor toksisite zararlarını azalttığı ileri sürülmektedir. Bitkilerde köklerden toprak üstü kısımlara daha az bor taşınımı bor toleransı için önerilen en güncel yaklaşımdır (Reid, 2014). Literatürde, tuz ve bor ilişkisini konu alan araştırma makalelerinde bitkilerin bor ve tuzun birlikte interaktif etkisine verdiği cevaplar irdelenmiştir. Tuz ve bor interaksiyonunda bugüne kadar

önerilen mekanizmalar, tuz varlığında bor ile gerçekleşen yarış (Goldberg, Suarez ve Shouse, 2008), aquaporin fonksiyonunun bozulması (Bastías, Fernández-García ve Carvajal, 2004), transpirasyon hızının düşmesi (Karimi, Tavallali ve Wirthensohn, 2018) ve stomaların kapatılması (Güneş ve ark., 2006; Karimi Tavallali ve Wirthensohn, 2018), nedeniyle bitkideki bor toksisite zararının azaltılmasıdır. Buna karşılık, ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) (Ekmekçi ve ark., 2020) ve aspir (*Carthamus tinctorius* L.) (Turan, Taban ve Taban, 2009; Arslan ve ark., 2016) bitkilerinde ön tuz uygulaması ile bor toksisitesinin olumsuz etkisinin azaltılarak bor toleransının kazandırıldığı literatüre bildirilmiştir. Çalışma sonuçları, orta stres seviyesinde ön tuz uygulamasının, bitkilerde bor birikiminin azalmasına sebep olduğunu ortaya koymuştur. Aspir bitkisinde yapılan potasyum/sodyum (K^+/Na^+) oran analizi böyle bir yarışın olmadığını, artan toksik bor konsantrasyonlarında oranın değişmemesi ile net bir şekilde gösterilmiştir. Bu bağlamda, tuz ile bor arasında alım ve atımla ilişkili bir yarış söz konusu değildir. Ayrıca, ön tuz uygulaması yapılan ve ardından bor toksisitesine maruz kalan aspir bitkilerinde membran bütünlüğünün ve fotosentetik aktivitenin korunduğu belirlenmiştir. Bu durum, tuz uygulanmasının aquaporin fonksiyonunda bozulma, transpirasyon hızında düşme ve stomatal sınırlamalar gibi sonuçlara yol açmadan bu tasarımdaki uygulamanın bor tolerans kazanımında etkin olduğu fikrimizi güçlendirmektedir. Elde edilen diğer bir dikkat çekici sonuç da, antosiyanin birikiminin ön tuz stresi uygulanan ve sonrasında toksik bor düzeylerine maruz kalan bitkilerde arttığının saptanmasıdır. Flavonoidlerin en göze çarpan sınıflarından biri olan antosiyanin, bitkilerde fotosistemlerdeki klorofilleri aşırı eksitasyonlara koruma ve ROT sinyali algılanması ile birlikte ROT uzaklaştırmada da çeşitli rollere sahiptir. Ayrıca, antosiyanin metal-şelatör olarak da çeşitli metallerin detoksifikasyonunda ve bor taşınmasında kritik bir rol oynadığı tespit edilmiş (Landi ve ark., 2014; Landi, Tattini ve Gould, 2015; Kayıhan, Kayıhan ve Çiftçi, 2016) ve mor bitkilerin doğal olarak bor tolerans karakteri gösterebileceği ileri sürülmüştür (Landi ve ark., 2014; Landi, 2015; Landi Tattini ve Gould, 2015). Bu sonuçlar, ön tuz uygulamasının bitkide sebep olduğu değişimlerin antosiyanin aracılı metabolik yollar ile bor toleransına önemli bir katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bağlamda; tuz ön uygulaması ile bor toleransı kazanımının fizyolojik ve biyokimyasal analizlerle ortaya konulması ve bor tolerans kazanımının çoklu fonksiyonlara sahip antosiyaninin sentez yolağında yer alan bazı genlerin ifade değişimlerinin model bitki *Arabidopsis thaliana*'da aydınlatılması tezin temel amacını oluşturmaktadır.

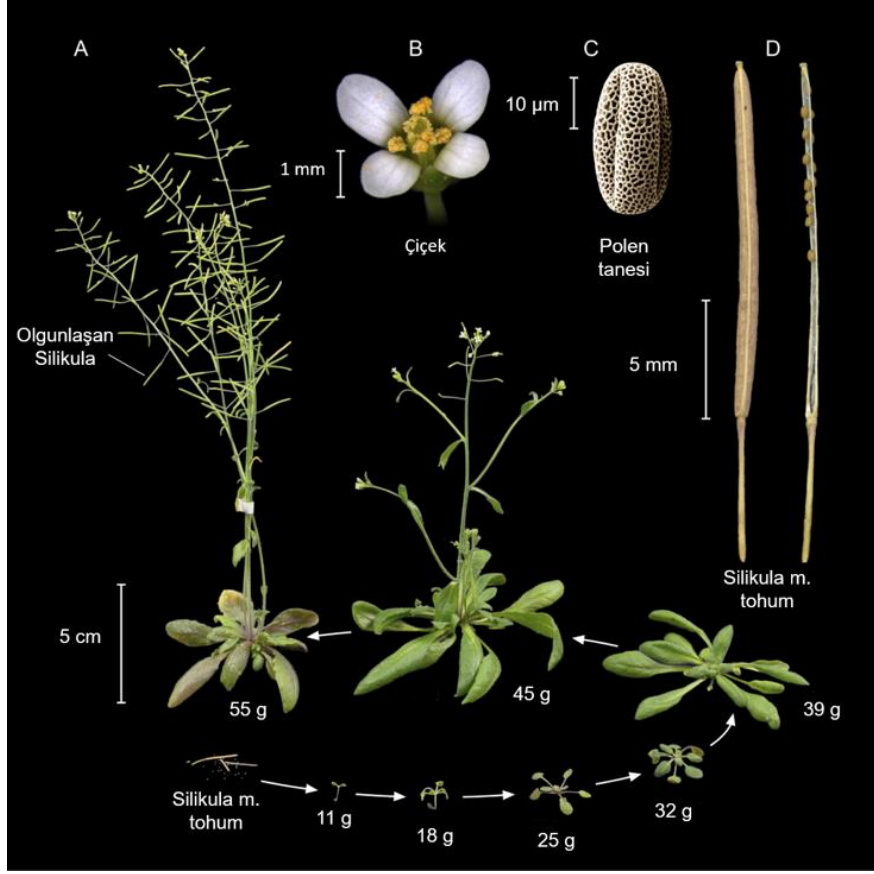
2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Arabidopsis thaliana* Bitkisi

Angiospermlerden Brassicaceae familyasında yer alan *Arabidopsis thaliana* (fare kulağı tersi) doğal olarak yeryüzünün ılıman kuşaklarında yayılış gösteren, tek yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 2.1). Hardal, kanola, lahana, brokoli ve karnabaharı içeren bu filogenetik grubun diğer üyelerinden farklı olarak *Arabidopsis*, tarımsal açıdan önemli bir tür değildir (Szymanski, Kierszniowska ve Schulze, 2013). İlk olarak 1577'de Almanya'daki Harz Dağları'nda hekim Johannes Thal tarafından tanımlanmış ve *Pilosella siliquosa* ismini almıştır, ardından Linnaeus tarafından 1753'te yayınlanan *Species Plantarum* II'de yer almıştır ve günümüzdeki adını olan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ismi ise 1982 yılında Gustav Heynhold tarafından verilmiştir (Krämer, 2015).

A. thaliana, kum ve çakıl taşlarının olduğu akışkan zemin üzerinde büyümektedir, ancak yol kenarlarında ya da örselenmiş toprak üzerinde de bulunduğu için yabani bir ot olarak kabul edilir. Yaşam döngüsü yaklaşık 6 hafta olan *Arabidopsis* bitkisi, vejetatif olarak 2 ile 10 cm çapa sahip rozet bitkiler gelişir ve gövdesi 15 ile 20 cm'ye kadar uzayabilir. Bitkinin çiçeğinde 4 adet sepal, 4 adet petal (beyaz), 6 stamen ve tek bir ovaryum bulunmaktadır. Bitkinin silikva yapısındaki meyvesinin içerisinde yüzlerce tohum bulunur ve bitki kendi kendini dölleyebilir (Meinke ve ark., 1998).

A.thaliana deneysel olarak ilk defa 1907 yılında Freidrich Laibach tarafından sitolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Ardından 1940'larda George P. Rédei tarafından x-ışını çalışmalarıyla ilk mutant *Arabidopsis thaliana* elde edilmiştir (Somerville ve Koornneef, 2002). Fakat 1980'lere gelene kadar *A. thaliana* genetik çalışmalarda çok fazla tercih edilmemiştir. Bu tarihlerden sonra yeni mutantların elde edilmesi ve kullanılmasının yanı sıra (Meinke ve Sussex, 1979; Somerville ve Ogren, 1980; Estelle ve Somerville, 1986), *Arabidopsis*'in ilk kapsamlı genetik haritasının yayınlanması (Koornneef ve ark., 1983), sahip olduğu küçük genomun keşfedilmesi (Leutwiler, Hough-Evans ve Meyerowitz 1984) ve ilk *Arabidopsis* geninin klonlanması (Chang ve Meyerowitz, 1986) ile *Agrobacterium*'dan *Arabidopsis*'e ilk defa gen aktarılması (Lloyd ve ark., 1986)



Şekil 2.1. *Arabidopsis thaliana*'nın hayat döngüsündeki farklı aşamaları *Arabidopsis thaliana*'nın model (tohumdan olgunluğa) (A), Çiçek (B), Polen tanesi (taramalı elektron mikroskobu görüntüsü) (C), Olgunlaşmış silikula meyve (D) (Krämer, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

organizma olarak kullanılmaya başlanılmasına neden olmuştur. Bu bitkinin sahip olduğu 125 megabaz çifti içeren 5 kromozomlu küçük genomu, kısa hayat döngüsü, saksılardan petri kaplarına ve test tüplerine kadar farklı koşullarda yetiştirilebilmesi, kendi kendini dölleyebilmesi (self-fertilization) ile çok sayıda ve verimli tohum üretebilmesi gibi özellikleri *Arabidopsis thaliana*'yı bitki gelişimini, fizyolojisini, metabolizmasını, hücre biyolojisini, genetik, epigenetik ve sistem biyolojisini de içeren bitki biyolojisi alanında kullanmak için mükemmel bir model organizma yapmaktadır (Feldmann ve Goff, 2014; Kayıhan, 2018).

2000 yılında tüm genomu dizilenen ilk çiçekli bitki olarak *Arabidopsis thaliana*'nın (Koorneef ve Meinke, 2010) günümüzde kapsamlı cDNA koleksiyonları ile *Arabidopsis thaliana*'ya ait maya ve bakteriyel yapay kromozomları (YAC'ler ve BAC'ler) içeren genomik kütüphaneler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi

Arabidopsis thaliana ile ilgili tüm genomik bilgilere erişime izin veren “<http://www.arabidopsis.org/>” adresli Arabidopsis Bilgi Kaynağı'dır (TAIR- The Arabidopsis Information Resource). TAIR, *Arabidopsis thaliana*'nın tohum ve DNA kaynaklarının toplandığı, çoğaltıldığı, korunduğu ve dağıtıldığı Arabidopsis Biyolojik Kaynak Merkezi'ne (ABRC-The Arabidopsis Biological Resource Center) bağlıdır.

2.2. Bitki Büyüme ve Gelişmesi için Mutlak Gerekli Mikrobesein Elementi, Bor
Periyodik cetvelde 3A grubu elementi olarak yer alan bor (B), metal ve ametal arasında yarı-metal (metaloit) özellik göstermektedir (Nable, Banuelos ve Paull, 1997; Tariq ve Mott, 2007) . Yeryüzünde serbest halde bulunmayan B elementi doğada genel olarak borik asit ($B(OH)_3$), borat (H_3BO_3) veya borosilikat mineral şeklinde bulunur. B, toprakta esas olarak çeşitli miktarlarda demir (Fe), alüminyum (Al), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), lityum (Li) ve sodyum (Na) içeren borosilikat mineralleri halinde yer alır ve bu bileşiklerden borat formuna dönüşümü oldukça yavaştır. Bitkiler tarafından B'un sadece borik asit ve borat formunda alınması ve genel olarak toprakta B içeriğinin düşük olması, ekim yapılan alanlarda yetiştirilen bitkilerin gelişimi için ihtiyaç duyduğu miktarda B'u sağlayamamasına neden olmaktadır (García-Sánchez ve ark., 2020). Yağışların yüksek olduğu, organik madde miktarının düşük olduğu ve pH'nın yüksek olduğu topraklarda yetiştirilen bitkiler B eksikliği çekebilmektedir (Güneş ve ark., 2006). Bunun yanı sıra, kurak ve yarı kurak bölgelerin topraklarında yüksek B içeriğine sahip yeraltı suyunun evaporasyonu sonucu B'un toprakta birikimi ile doğal olarak bor toksik düzeylere ulaşabilir. Ayrıca topraktaki B'un toksik düzeylere ulaşmasının diğer nedenleri de madencilik ve işleme, bor ile kirlenmiş suların sulama amaçlı kullanılması, yanlış drenaj uygulamaları, yanlış gübreleme stratejileri gibi antropojenik faaliyetlerdir (Eraydın, 2000; Hua ve ark., 2021).

Dünya geneline bakıldığında, düşük yağış ve çok az sızıntının olduğu alkali ve tuzlu toprakların bulunduğu B açısından zengin yataklar Kaliforniya, Avustralya, Çin, Rusya ve Arjantin'de bulunmaktadır (Archana ve Verma, 2017; Princi ve ark., 2016). Bu ülkeler arasında Türkiye, %73'lük oran ile dünyanın en büyük bor rezervine sahip ülke konumundadır (Princi ve ark., 2016).

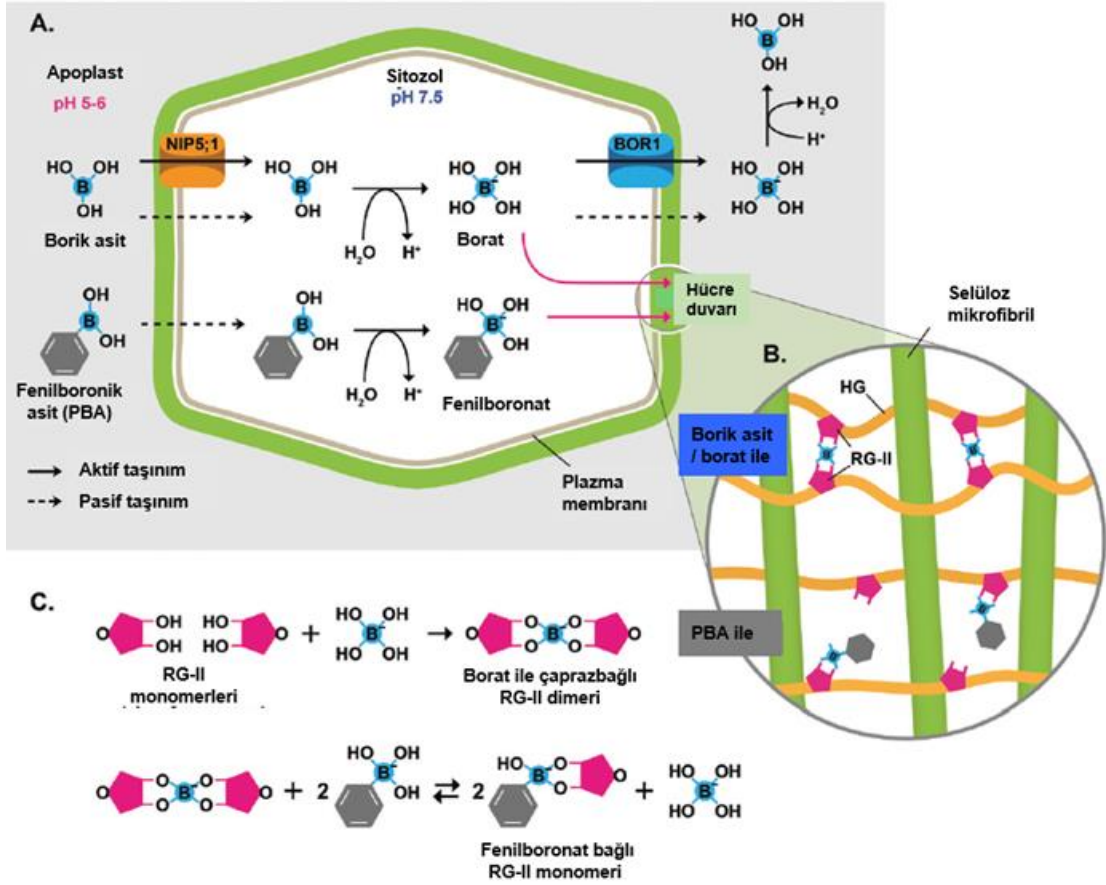
Bor elementi, bitki büyüme ve gelişmesi için mutlak gerekli olan bir mikrobesein maddesidir. Bu sebeple bitkiler bor elementine oldukça düşük miktarda ihtiyaç

duymaktadırlar. Diğer mikrobelerin olduğu gibi B için de noksanlık ve toksisite sınırı çok dardır (Landi ve ark., 2012). B, bitkilerde pek çok yapısal, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda görev alır. Bitki bünyesine yüksek miktarda alındığında; hücre duvarlarında anormallikler, hücre zarlarının bütünlüğünde bozulmalar, fotosentez aktivitesinde azalmalar, reaktif oksijen türlerinin sentezinde artış gibi metabolizmada bozulmalar ile yapraklarda klorozis ve/veya nekroz oluşumu meydana gelir (Marschner, 1995; Choudhary ve ark., 2021).

2.3. Bor Alımı ve Taşınımı

B toprakta (pH 5.5-7.5 arası), temel olarak ayrışmamış H_3BO_3 (borik asit) halinde bulunmakta olup genellikle kökler tarafından bu formda alınır (Hua ve ark., 2021). 1990'ların sonuna kadar, borik asidin yüksüz bir molekül olması ve hücre membranının çift lipid katmanının yüksek geçirgenliği nedeni ile B'un pasif difüzyonu için özel bir mekanizma olarak iş gördüğü düşünülüyordu (Raven, 1980; Camacho-Cristóbal, Rexach ve González-Fontes 2008). Ancak, protein temelli taşıma kanallarının keşfedilmesi ve *Arabidopsis thaliana*'da B taşıyıcılarının tanımlanmasıyla bu mekanizmanın farklı olduğunu ortaya koymuştur (Dordas, Chrispeels ve Brown, 2000; Takano ve ark., 2002).

Bitki hücrelerinde fizyolojik koşulları altında B, çoğunlukla (~%96) borik asit $B(OH)_3$ ve ayrıca az miktarda da borat anyonu $B(OH)_4^-$ olarak bulunur (Landi ve ark., 2019) (Şekil 2.2). Bununla birlikte, toplam B'un %98'i veya daha düşük pH değerlerinde olmak üzere serbest formda $B(OH)_3$ (örneğin apoplastta 5.5 gibi) daha yüksek (yaklaşık %99.95) oranda bulunur. Borik asit, sitoplazmik pH'da (yaklaşık 7.0-7.5) zayıf bir asittir ve fizyolojik koşullar altında, $B(OH)_3$, diğer iyonların aksine, membranların lipid tabakasından serbestçe geçebilir (Şekil 2.2). Hem borik asit hem de borat, çok çeşitli şekerler ve cis-hidroksil grupları içeren diğer bazı bileşiklerle de kolaylıkla kompleksler oluşturmaktadır; örn; Fenilboronik asit-PBA (Şekil 2.2) (Princi ve ark., 2016).

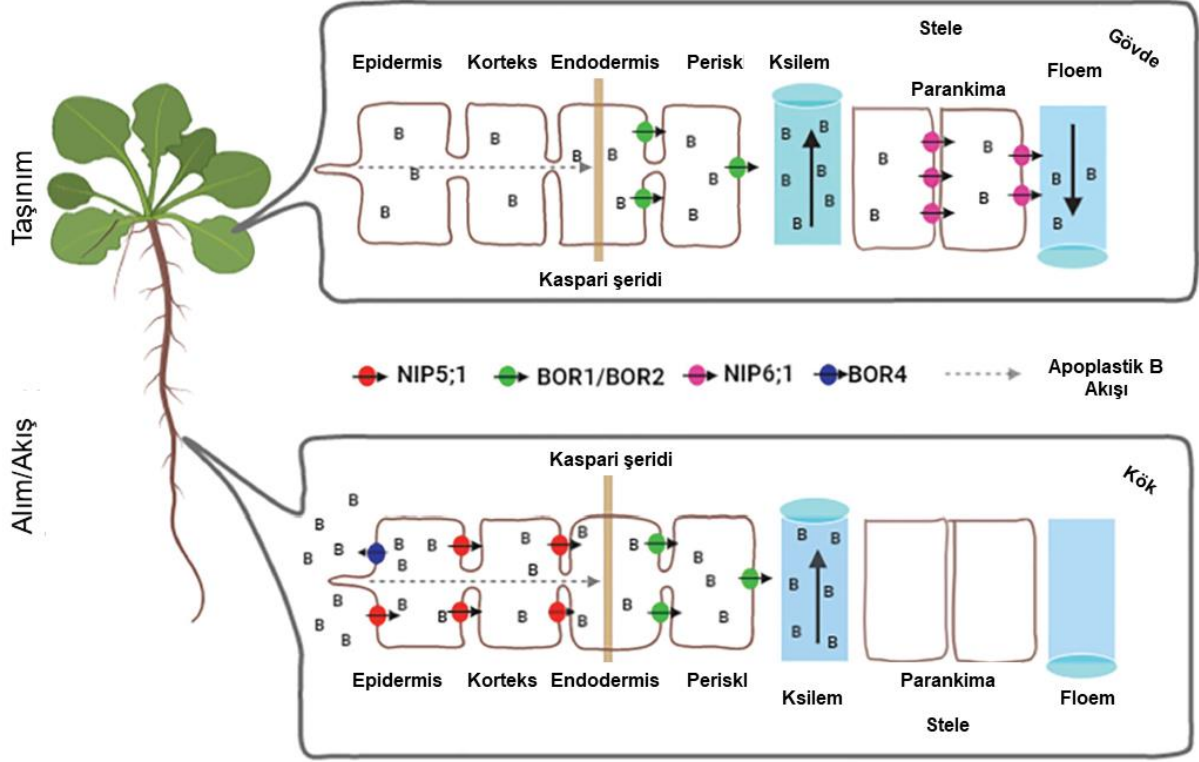


Şekil 2.2. Bitki hücrelerine borik asit/fenilboronik asit (PBA) alımı. (A) Difüzyon veya NIP5;1 kanal proteini yoluyla borik asit ve PBA'nın pasif ve aktif alım mekanizmaları. Sitozolik pH'da borik asit ve PBA, hücre duvarındaki ramnogalakturonan-II (RG-II) monomerleri ile reaksiyona girecek borat ve fenilboronat anyonlarını oluştururlar. Bir bitki hücresinden borat ve fenilboronatın atımı, difüzyon veya BOR1 taşıyıcısı yoluyla gerçekleşir. (B) İki RG-II monomerini çapraz bağlayan borat ve sadece bir RG-II monomerine çapraz bağlanan fenilboronata ait hücre duvarı pektin matrisinin yakından görünümü. (C) Borat anyonunun ve fenilboronat anyonunun RG-II monomerleri ile reaksiyonu (Matthes, Robil ve McSteen, 2020'den değiştirilerek alınmıştır).

B alımı, B'un ortamdaki kullanılabilirliğine bağlı olarak farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bunlar;

- 1- Çift tabakalı lipid zardan pasif difüzyon ile,
- 2- MIP (Major Intrinsic Protein) kanalları (alt aile nodulin 26-benzeri intrinsik proteinler-NIPs) ile kolaylaştırılmış difüzyon aracılığıyla,

3- BOR proteinleri gibi yüksek afiniteli B taşıyıcıları ile (özellikle ortamda bor seviyesi azaldığında) aracılığı ile şeklinde sıralanabilir (Şekil 2.3) (Tanaka ve Fujiwara, 2008; Brdar-Jokanović, 2020).



Şekil 2.3. B'un kökler ile topraktan alınması, gövdeye iletilmesi ve taşınması (Pereira ve ark., 2021'den değiştirilerek alınmıştır).

Beş alt-sınıf/aile içeren Major Intrinsic Protein (MIP) ailesi hücre zarının küçük moleküllere olan geçirgenliğini artırıcı görev yapmaktadır. Bunlar: Plazma Membran Integral Protein'ler (PIP'ler), Tonoplast Integral Protein'ler (TIP'ler), Nodulin benzeri protein (NIP'ler), Small Basic Integral Proteinler (SIP'ler) ve X Integral protein'lerdir (XIP'ler) (Wallace, Choi ve Roberts, 2006; Maurel ve ark., 2015). Bunlardan B taşınımında rol alan NIP'ler kanal por yapılarına göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır. NIP I proteinlerinin fizyolojik rolleri henüz kapsamlı şekilde aydınlatılmamış olsa da NIP II ve NIP III'ler borik asit ve salisilik asit için özelleşmiş kanallar olarak karakterize edilmektedir. *Arabidopsis thaliana*'daki NIP II proteinleri; AtNIP5;1, AtNIP6;1 ve AtNIP7;1'dir. AtNIP5;1 borik asidin kök epidermisinden yeterli seviyede alınması için gereklidir (Takano ve ark., 2006). AtNIP6;1 ise floem'den gelişmekte olan genç yaprak dokularına B'un alımında

görev yapmaktadır (Tanaka ve ark., 2008). Son olarak, AtNIP7;1 de çiçek gelişimi sırasında, gelişim için gerekli B'un antere alınmasını sağlayan borik asit kanalları olarak görev yapmaktadır (Routray ve ark., 2018).

Son zamanlarda, bir diğer MIP ailesi olarak XIP alt ailesinin de borik asit taşınmasını kolaylaştırabileceği önerilmiştir. MIP ailesi içerisinde bulunan PIP, TIP, SIP ve NIP'ler genellikle bütün karasal bitkilerde bulunurken, XIP'ler monokotiledonlarda ve *A. thaliana* dahil bazı dikotiledonlarda bulunmaktadır. *Nicotiana tabacum*'da XIP1;1'in hücre membranında yer aldığı ve bor yoksunluğunda ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Bienert ve ark., 2019).

BOR taşıyıcıları, hücre membranında yer alan akış tipi borat taşıyıcılarıdır. Yapılan filogenetik analizlere göre, BOR ailesi angiospermlerde farklı fizyolojik fonksiyonlarına göre filogenetik olarak iki gruba ayrılmaktadır. *A. thaliana*'da birinci grup AtBOR1, AtBOR2 ve AtBOR3'ü kapsarken; ikinci grupta AtBOR4, AtBOR5, AtBOR6 ve AtBOR7 taşıyıcıları yer almaktadır. AtBOR1 ve AtBOR2 düşük B koşullarında görev yaparken, ikinci gruptaki AtBOR4 ise bitkiyi toksik bor koşullarından korumaktadır (Wakuta ve ark. 2015). AtBOR1, B eksikliği koşullarında kökten ksileme B'un taşınması için gereklidir (Takano ve ark. 2002; 2010). AtBOR2 ise B'un kök hücreleri duvarında dağılımını sınırlı B koşullarında ayarlamaktadır (Miwa ve ark. 2013). Diğer yandan AtBOR4, AtBOR1'e homolog bir proteindir ve toksik B seviyelerinde kök hücrelerindeki B'un dışarıya atılmasını sağlar (Miwa, Aibara ve Fujiwara, 2014; Onuh ve Miwa, 2021).

Bununla birlikte, aktif B alımı/taşınımının noksanlık durumunda gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Stangoulis ve ark., 2001). Ortamda yeterli düzeyde B bulunuyorsa, pasif ve/veya kolaylaştırılmış difüzyon ile alımı hipotezi yaygın olarak kabul edilir ve bu durum H₃BO₃'ün yüksek geçirgenliğine bağlanır (Dordas ve Brown, 2005; Tanaka ve Fujiwara, 2008).

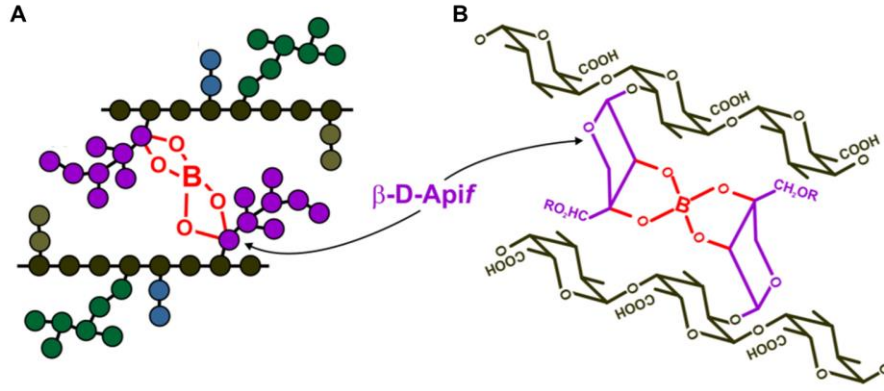
B kökler tarafından alındıktan sonra, temel olarak transpirasyon tarafından ksilem hücreleri aracılığıyla olgun yapraklara taşınır. Bunun sebebi olgun yaprakların en yüksek transpirasyon oranına sahip olmalarıdır. Bununla birlikte, bazı bitki cinslerinde (*Malus*, *Allium*, *Brassica* gibi birçok zirai bitki türü de dahil olmak üzere) B'un bitki içerisinde eşit dağıldığı veya genç yapraklarda olgun yapraklara

göre daha yüksek konsantrasyonlarda olabildiği tespit edilmiştir (Brown ve Hu, 1996; Camacho-Cristóbal, Rexach ve González-Fontes, 2008). Bu sonuçlar, bazı türlerde B'un floem ile de taşınabildiğini göstermektedir. Floem ile taşınım transpirasyondan bağımsız olduğu için genç yapraklara, meyvelere ve aktif gelişim gösteren dokulara, ihtiyaç duydukları besinlerin büyük bir kısmını sağlar (Brown ve Shelp, 1997). *Pyrus*, *Malus*, *Allium*, *Brassica* gibi genusların üyesi olan türler, fotosentez ürünlerinin floem ile taşınımı için sakkaroz yerine yüksek miktarda şeker alkolleri (mannitol-sorbitol) üretirler (Brown, Bellaloui ve Dandekar, 1999). Sahip oldukları *cis*-hidroksil gruplarıyla mannitol ve sorbitol, borik asit kaynaklı diol-B kompleksleriyle kolayca bağlanabilir (Reid ve ark., 2004). Bu bağın, bor elementinin mannitol ve sorbitol ile ligand olarak stabil bir polioliol-B kompleksi oluşturup, floem ile taşınmasına olanak sağladığı düşünülmektedir.

2.4. Bor Elementinin Bitkilerdeki Rolü

Bitkilerdeki bor (B) içeriğinin %90'ı hücre duvarında pektik polisakaritlerden ramnogalakturonan-II (RGII)'ye bağlı halde yer almaktadır (Şekil 2.4). B, molekülleri arasında diester köprüler oluşturarak çapraz bağlar yapabilir. Bu özellikleri sayesinde B, hidrokarbon bir omurga ve dört yan zincirden oluşan RGII ile çapraz bağ yaparak hücre duvarına yapısal ve stabil bir bütünlük kazandırır (Blevins ve Lukaszewski, 1998; O'Neill ve ark., 2001; Bar-Peled, Urbanowicz ve O'Neill, 2012).

Son zamanlarda mutant mısır bitkileriyle (*Zea mays*) yapılan bir çalışmada, bor taşıyıcısı olan NIP5;1 adlı proteini kodlamakla görevli *ts1* geni susturularak bitkiler bor noksanlığına maruz bırakılmıştır. B alımının sınırlandırılmasını takiben mutant bitkilerin hücre duvarlarında RGII monomerlerinde artış, RGII dimerlerinde ise düşüş görülmüş ve bu da çeperde yapısal bozukluklara neden olmuştur (Durbak ve ark., 2014). Ayrıca, RGII ve B taşıyıcılarının sentezinden, borat çapraz bağlanmasının konumu ve mekanizmalarından sorumlu anahtar enzimlerin tanımlanmasıyla B ve hücre duvarı ilişkisi aydınlatılmıştır (Funakawa ve Miwa, 2015). Bunun yanı sıra B, hücre membranından içeriye iyon



Şekil 2.4. Hücre duvarında borun bağlanma yerleri: (A) bitki hücre duvarında bor-ramnogalakturonan II kompleksinin şematize hali, (B) iki RG-II molekülü, her bir RG-II monomerinin A yan zincirindeki apiosil reziduları (açık daire) arasında oluşturulan bir borat ester ile kovalent olarak bağlanması (Bar-Peled, Urbanowicz ve O'Neill, 2012)

alınmasında görevli olan ATPaz enziminin aktivitesini de doğrudan ya da dolaylı olarak (membranların işlevsel bütünlüğünü koruyarak) etkilediği ve köklerdeki mineral besin alımını arttırdığı bildirilmiştir (Çakmak ve Römheld, 1997; Blevins ve Lukaszewski, 1998). Bazı araştırmalara göre, B alımı sınırlandırılmış bitkilerin yapraklarında, kontrol bitkilerine oranla daha az potasyum bulunduğu ve bu durumun borun potasyum alımında rol oynayan pompaların aktivitesini etkilemesiyle ilgili olabileceği belirtilmiştir (Çakmak ve Römheld, 1997; Davis ve ark., 2003). Ayrıca, hücre membranlarının yapısal bütünlüğünde de B'un önemli rolleri olduğu; B noksanlığı yaşayan bitkilerin hücre membranlarının stabilitesinin bozunduğu ve iyon sızıntısında artış olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, B noksanlığı çeken bitkilerin patojen kaynaklı hastalıklara karşı daha hassas olmasının nedeninin; B noksanlığına bağlı olarak kök ve yaprakların hücre çeper ve membranlarındaki bozunmalar nedeniyle dışarı doğru şeker ve/veya amino asit gibi organik maddelerin sızıntısının artması olduğu bildirilmiştir (Çakmak, Kurz ve Marschner, 1995; Dordas ve Brown, 2005; Güneş ve ark., 2017).

B'un bitki metabolizmasındaki birincil rolünün cis-diol gruplarıyla moleküllerin stabilizasyonu sağlaması olabileceği düşünülmektedir. B, hücre membranında glikoproteinler ve glikolipidler ile cis-diol kompleks bileşikler oluşturarak yapısını korur. Böylece membran metabolizması ve işlevinde rol oynar (Wang ve ark. 2015; Landi ve ark., 2019). Bunların yanı sıra, iyonların, metabolitlerin ve

hormonların taşınmasında, enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde (uyarma, inhibe etme veya stabilizasyonunu sağlama) şekerlerin zardan taşınması, lignin ile flavonoid sentezi ve oksin sentezi, azotlu bileşikler, nükleik asit ve fenol metabolizmasında görev aldığı bildirilmektedir (Landi ve ark., 2019; Brdar-Jokanović, 2020).

B, fotosentez sonucu sentezlenen bileşiklerin depo edilmek veya kullanılmak üzere floem aracılı taşınımında görev alması nedeniyle, fotosentetik kapasite üzerinde dolaylı yönden etkilidir (Brdar-Jokanović, 2020). B eksikliği koşullarında heksoz şekerlerin ve nişastanın floemden taşınmaması nedeniyle birikiminde artış ve sakkaroz birikiminde azalış nedeniyle geribesleme mekanizmasının devreye girmesi ile CO₂ asimilasyonu ve stomal iletkenlik sınırlandırılır dolayısıyla içsel CO₂ konsantrasyonu artar. Bu koşullarda ROT sentezi artar ve antioksidant enzimleri yeterli düzeyde aktive olmadığında oksidatif stres tetiklenebilir (Han ve ark., 2009; Landi ve ark., 2019).

B, hem kök hem de sürgün gelişimi üzerinde önemli role sahiptir. B taşıyıcılarının (örn, BOR1 ve NIP5;1) sürgün ve kök apikal mersitemlerinde hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında görev aldığı belirlenmiştir (Pereira ve ark., 2021). Ayrıca yapılan çalışmalar ile çimlenme ve ilk gelişim aşamalarında B'un kotiledon gelişimi ve vasküler sistem oluşumu, hipokotil uzaması ve epidermal hücrelerin oluşumunda etkin role sahip olduğu bildirilmiştir (Matthes ve Torres-Ruiz, 2016).

B eksikliğinde sürgün büyümesine kıyasla kök büyümesi daha erken süreçte ve daha şiddetli olarak etkilenmektedir. Bitkiler normal koşullardan, B'un eksik olduğu bir koşula aktarıldığında saatler içerisinde kök büyümesinde durma meydana gelmektedir. Kök büyümesinin durmasıyla bitkinin topraktan su ve suda çözülmüş madde alımı azalmakta, dolayısıyla kuraklık ve besin eksikliği görülmektedir. Bunu takiben de gövde gelişiminde duraksamalar ve anormallikler görülmektedir (Marschner, 2012; Pereira ve ark., 2021). B eksikliğinin kök üzerinde neden olduğu bu olumsuz etkisinin birden fazla etmene bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bunlardan birisi B noksanlığı altında köklerde toksik etkisi yüksek olan serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonlarının

artmasıdır. Bir başka etken de, B'un fotosentez ürünlerinin köke yeterince taşınmamasıdır. Ayrıca, hücre duvarı sentezinde rol oynayan büyüme hormonu indolasetik asit (IAA-Oksin) miktarında artırıcı etkisi olan B eksikliği ile birlikte yeterli düzeyde IAA sentezi gerçekleşmemektedir (Oiwa ve ark., 2013; Camacho-Cristóbal ve ark., 2015).

B elementi vejetatif büyüme (yeşil organ büyümesi) kadar generatif büyümede de (polen kalitesi, polen tüpü büyümesi) önemli role sahiptir. B'un generatif gelişimdeki baskın etkileri; polen canlılığı, çimlenme ve polen tüpü gelişimi üzerinedir. Bu nedenle, B yokluğunda polen tüpleri sağlıklı şekilde gelişemez ve işlev gösteremez. Sonuç olarak da bitkide döllenme azalır veya tamamen durur (Wang ve ark., 2003; Lordkaew ve ark., 2013). Bunlara ek olarak B'un çiçeklenme aşaması ile tohum oluşumu ve verim üzerinde de önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Gimeno ve ark., 2012; García-Sánchez ve ark., 2020)

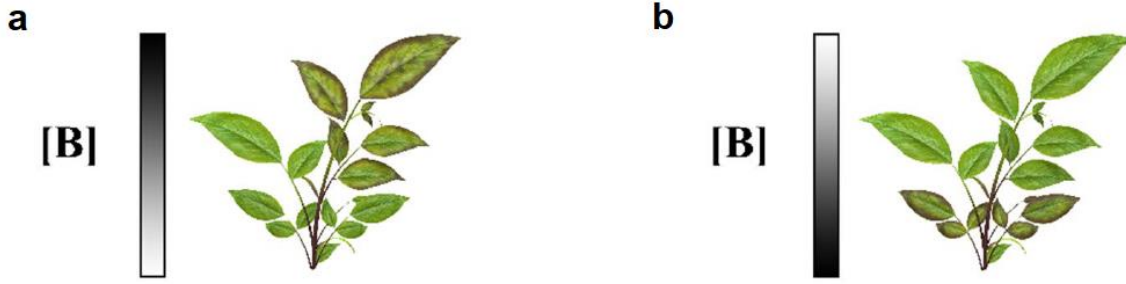
2.5. Bor Toksisitesinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

Bir mikro besin elementi olması nedeniyle B'un bitki gelişimini ve verimini etkileyen eksiklik ile toksiklik düzeyi arasındaki aralık çok dardır ve bitkilerin ihtiyaç duyduğu B miktarı bitkiye göre farklılık göstermektedir (Shah ve ark., 2017). Bitkilerin ihtiyaç duyduğu miktardan daha fazla B içeriğine sahip topraklarda bitkiler B toksisitesi ile karşı karşıya kalır ve B toksisitesinin belirtileri türler arasında değişebilir. B toksisitesinde genel olarak yapraklarda (özellikle olgun yapraklarda) nokta tipi lekeler olarak ortaya çıkar ve diğer toksik iyonların etkisinden neredeyse ayırt edilememektedir. Bu nedenle yaygın yaprak hastalığı ile sıkça karıştırılmaktadır. Bununla birlikte, B toksisitesinin etkisi yaprağın uçlarında ve kenarlarında başlayan sararma, lekelenme ve ardından ortaya çıkan kuruma ile belirginleşir ve bu özellikle diğer iyon toksisitelerinden ayırt edilir (Archana ve Verma, 2017). Bunun yanında, hücre duvarı gelişiminde meydana gelen bozukluklar nedeniyle oluşan yaprak yüzey alanındaki azalma ve yapraklardaki kıvrılmalar da B toksisitesine belirteç olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, farklı türlerdeki B toksisitesinin değerlendirilmesinde yaprak yüzey alanı, şekli ve nekroz oluşumu yaygın olarak kullanılan semptomlardır (Nable, Bañuelos ve Paull, 1997; Reid ve ark., 2004; Reid ve Fitzpatrick, 2009). B-inmobile yani hareketsiz türlerde, bu semptomlar transpirasyon ile taşınan B nedeniyle lateral damarlar arasında ortadan uca doğru oluşmaktadır. B-mobil

türlerde (Örneğin: Malus, Pyrus), B birikimi transpirasyonun hızlı olduğu yapraklar yerine gelişen dokularda bitmektedir (Şekil 2.5). Bu bitkilerde, bor toksisitesinin belirtileri meyve bozuklukları, kambiyal dokuların ölümü ve kök gelişiminde bozulmalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Landi ve ark., 2019).

2.5.1. Bor Toksisitesinin Kök Gelişimi Üzerine Etkisi

B toksisitesinin birincil etkisi, genellikle bitki kuru ağırlığının azalması ve kök dokularında artan bor seviyesi ile birlikte kök büyümesinde görülen inhibisyondur (Turan, Taban ve Taban, 2009). B Toksisitesi, kök meristeminde anormal hücre bölünmesine ve kökün kortikal hücrelerinde süberin birikimine neden olur. Ancak, B fazlalığının asıl etkisi, mitoz sırasında mikrotübül oluşumunu engelleyerek kök



Şekil 2.5. Bor toksisitesinin bitkilerdeki semptomlarının (morfolojik) görünümü. (a) B-mobil bitkilerdeki semptomlar, (b) B-inmobil bitkilerdeki semptomlar (Landi ve ark., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).meristemlerinde sitotoksik etkilere neden olmasıdır (Ghanati, Morita ve Yokota, 2005; Konuk, Liman ve Ciğerci, 2007).

Arabidopsis ile yapılan çalışmalarda, B fazlalığının köklerde absisik asit sinyalinin oluşumunda, yanıtında ve hücre duvarı modifikasyonlarında görevli genlerin ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda da köklerde toksisite veya tolerans seviyesine göre köklerde zayıflama veya dallanma gerçekleşmektedir. Ayrıca, B'un, aquaporinleri kodlayan genleri de susturarak, kök üstünde bir kuraklık stresini de tetiklediği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2007; Aquea ve ark., 2012).

2.5.2. Bor Toksisitesinin Fotosentez Üzerine Etkisi

Fotosentez, B toksisitesine bağlı olarak etkilenen ana metabolik süreçlerden biridir (Shah ve ark., 2017; Papadakis ve ark., 2018). Yüksek B stresi altında, yaprakların kenar kısımlarında sararmalar ve/veya nekrotik alan oluşması

sonucunda, bu yapraklardaki fotosentetik alan, klorofil içeriği ve ardından da fotosentez hızını azalmakta veya durmaktadır (Chen ve ark., 2014). B toksisitesi altında fotosentezde meydana gelen aksakların stomatal ve stomatal olmayan sınırlandırmaya bağlı olması durumu tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar toksik B düzeylerinde su alımını sınırlandırması sonucu ABA artışı ile stomaların kapanmasına bağlı olarak transpirasyonun engellendiğinde bu nedenle fotosentezini stomatal kaynaklı olarak azaldığını bildirmiştir (Macho-Rivero ve ark. 2017, 2018; Papadakis ve ark. 2014; Landi ve ark., 2019). Bunun yanısıra fotosentez mekanizmasında B toksisitesine bağlı olarak ortaya çıkan ve stomatal olmayan sınırlamaların elektron taşıma hızının ve CO₂ kullanım etkinliğinin azalması ve fotosistem II (PSII) etkinliğinin bozulması şeklinde sıralanabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Shah ve ark. 2017; Papadakis ve ark. 2018; Choudhary ve ark., 2021). Birçok türde, B fazlalığında klorofil fluoresansının maksimum kuantum veriminin önemli ölçüde azaldığı ve bu durumun da yaprak dokularında ROS oluşumuna bağlı olarak fotoinhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Landi ve ark., 2013; Ekmekçi ve ark., 2020). Aynı zamanda bu bulgular klorofil içeriğindeki azalmayı da açıklamaktadır. Ayrıca, elektron taşıma hızındaki inhibisyonla beraber, CO₂ asimilasyonunda görevli olan bazı enzimlerin (karboksilaz, oksijenaz vb.) aktivitelerinin azaldığı da bilinmektedir (Han ve ark., 2009).

Son zamanlarda yapılan proteomik yaklaşımlarla, B toksisitesine yanıt olarak Arabidopsis yapraklarındaki protein profillerindeki değişimler. Bu araştırmalarda, fotosentezde hem ışık hem de karbon reaksiyonlarında yer alan; rubisko aktivaz, ATPaz gibi proteinlerin, yapraklardaki görünür semptomların oluşmasından, klorofil içeriğindeki azalmadan ve büyümedeki yavaşlamadan önce etkilendiği tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2014).

B toksisitesi altında fotosentezde meydana gelen bu aksaklıkların nedeni, B elementinin fotosentez sonucu sentezlenen moleküller ile kompleks oluşturması nedeniyle mekanizmayı etkilemesidir. B elementi Calvin-Benson döngüsünün reaksiyonlarında karbondioksit sentezi için gerekli olan ATP ve NADPH'yi bağlanması nedeniyle bu moleküllerin aktivitesini engellediği için enerjinin kullanılabilirliğini sınırlandırır. Bu nedenle fotosentezin hem ışık hem de karbon reaksiyonları sınırlandırılır. Ayrıca karbondioksitlerin sentezi ile taşınımı ve bağlı

aminoasitlerinden ayrılmış karbon iskeletinde yapısal değişimler meydana gelir. Buna bağlı olarak C/N oranında oluşan dengesizlik jasmonik asit ve etilen gibi yaşlanma ile ilgili hormonların artışına bağlı olarak erken yaşlanmayı da teşvik eder (Kayıhan ve ark., 2017; Papadakis ve ark. 2018; Landi ve ark., 2019; Brdar-Jokanović, 2020)

2.5.3.Bor Toksisitesinin Savunma Sistemi Üzerine Etkisi

B toksisitesi gibi abiyotik stres genellikle hidroksil radikalleri (OH⁻), süperoksit radikalleri (O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi sonunda proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin zarar görmesiyle hücrenin ölümüne sebep olabilecek ROT (Reaktif Oksijen Türleri) birikimine neden olan oksidatif stresi tetiklemektedir (Molassiotis ve ark., 2006; Hua ve ark., 2021). Askorbat, glutatyon, prolin ve fenolik bileşikler gibi antioksidanlar (enzimatik olmayan antioksidanlar) ve askorbat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler, serbest radikallere karşı savunma mekanizması olarak çalışırlar. B toksisitesi altındaki farklı bitkilerde bu antioksidanların B toksisitesine karşı verdikleri tepkiler araştırılmıştır. Sonuç olarak farklı bitkilerde farklı seviyelerde arttıkları görülmüştür (Cervilla ve ark., 2007; Rani ve ark., 2008; Giansoldati ve ark., 2012; Landi ve ark., 2013; Acar, Işkil ve Erden, 2018; Hua ve ark., 2021).

2.5.4.Bor Toksisitesinin Azot Metabolizması Üzerine Etkisi

Bitkiler, amino asit, nükleik asit, protein ve bazı ikincil metabolitlerini sentezleyebilmek için yüksek miktarda azota ihtiyaç duyarlar. Tarımsal topraklarda nitrat, azotun baskın türevidir ve bitki büyümesi ve gelişimi için esansiyeldir. Nitrat köklerden alındığında, nitrat redüktaz enzimi ile nitrit (NO₂⁻) formuna indirgenir. Ardından nitrit, nitrit redüktaz tarafından biyosentezlerde kullanılabilir form olan amonyuma (NH₄⁺) dönüştürülür. Yapılan deneylerde toksik düzeydeki B'un, kök ve yaprak dokularındaki nitrat redüktaz enzimlerini etkilendiği saptanmıştır (Mahboobi, Yücel ve Öktem, 2002). Benzer etkiler B toksisitesine maruz kalan domates bitkisinde (*Solanum lycopersicum*) de belirlenmiştir ve toksik B koşullarında domateste nitrat redüktaz aktivitesinin %16 oranında azalırken glutamat sentaz, glutamat sentetaz ve glutamat dehidrogenaz enzimlerinde önemli oranda artış olduğu tespit edilmiştir (Cervilla ve ark., 2009).

Bunların yanı sıra, bor toksistesinin azot alımını da etkilediği ve hassas domates çeşitlerinde, toksik bor miktarının plazma membranında yer alan H-ATPaz aktivitesini azaltarak azotun alımını azaltmaktadır (Princi ve ark., 2013).

2.5.5. Bor Toksisitesinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkisi

Sakkaroz seviyelerindeki değişiklikler, B stresi de dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerine karşı genel bir tepkidir. Çalışmalar, B'un glikozit biyosentezi üzerinde değişen etkileri olduğunu göstermiştir. Toksik B düzeylerinde glukoz miktarının azalması, nişasta sentezinin azalışına neden olmaktadır ve bu bitkilerin gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Princi ve ark., 2013). B toksitesi koşullarında kök ucunda indirgeyici şekerlerin miktarında artış da bulunmuştur (Marschner, 1995; McDonald ve ark., 2003). Choi ve ark. (2007) arpa bitkisi ile yaptıkları çalışmada, B toksitesi altında toleranslı arpa genotiplerinde kök ucundaki invertaz aktivitesinin indüklenmesi ile birlikte indirgeyici şekerler olan glikoz ve fruktoz miktarının arttığı belirlenmiştir. B toksitesi altında karbonhidrat metabolizmasındaki bu cevaplar, kök gelişimini sürdürerek bitki büyümesini destekleyebilmesini sağlamaktadır (Princi ve ark., 2013).

2.6. Bor Toleransı

Bitkilerin toksik B koşullarına karşı tolerans cevapları genel olarak 4 şekilde sıralanabilir;

- 1) Köklerden bor alımını azaltma ile kökte ve yapraklarda B biriktirebilme (Reid, 2007; Papadakis, 2016),
- 2) Polioller ve fenolikler gibi bor şelatlayıcıların biyosentezini artırma (Landi, Tattini ve Gould, 2015; Papadakis ve ark., 2018);
- 3) Borun tetiklediği oksidatif strese karşı antioksidan üretimini artırma (Landi ve ark., 2012) ve
- 4) B'u hücrel metabolizmadan uzak tutabileceği yerlere yöneltebilme/depolama (hücre duvarına ya da vakuole taşıma gibi) (Wakuta ve ark., 2016).

2.6.1. Bor Toleransında Fenolikler

B'un bitki içerisindeki hareketi ve şeker alkoller ile ilişkisi hakkında birçok araştırma yapılmıştır. B'un belirli şeker alkoller (polioller) ile kompleks oluşturmasının, B'un alımını ve taşınmasını etkilediğini düşündürmektedir. Farklı düzeylerde sorbitol üreten 3 tütün (*Nicotiana tabacum*) çeşidi ile yapılan çalışmada, sorbitol üretimi ile B alımındaki artışın korelasyon gösterdiği ve B'un

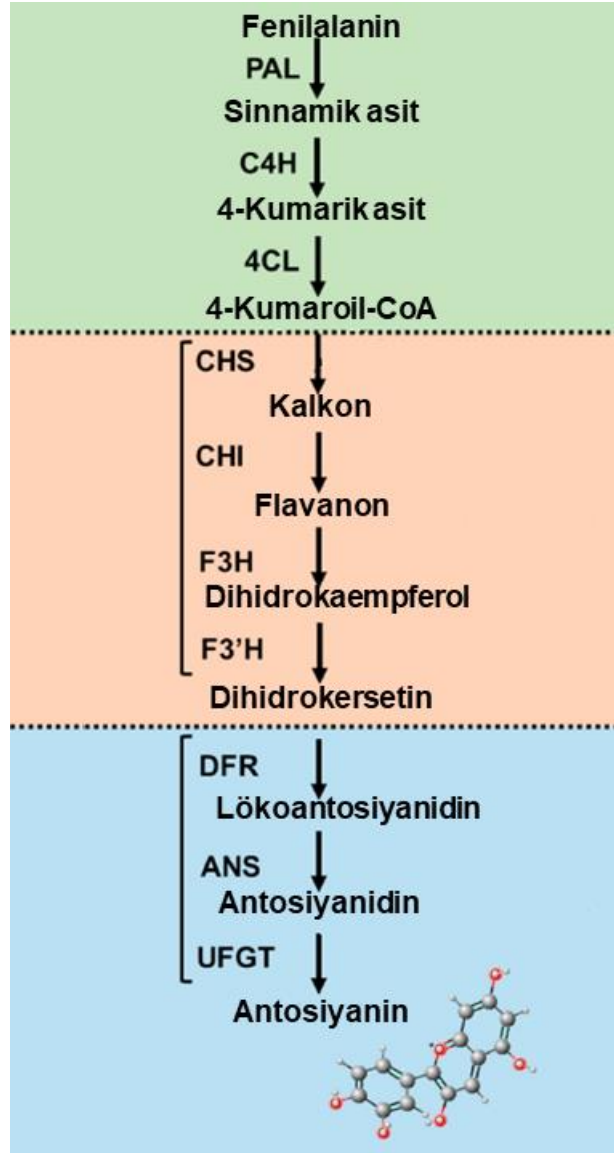
olgun yapraklardan meristematik dokulara taşınabildiği belirtilmiştir (Bellaloui, Brown ve Dandekar, 1999). Ayrıca, elma ağacı (*Malus pumila*) ve kereviz (*Apium graveolens*) gibi sorbitolce zengin bitkilerde de B taşınımında benzer yanıtlar belirlenmiştir (Van Goor ve Van Lune, 1980; Hu ve ark., 1997).

Sorbitol yönünden zengin B-mobil bitkilerde, farklı gelişim evrelerinde yapraklara dışsal B uygulaması yapıldıktan sonra, uygulama yapılan yapraklardan yapılmayan yapraklar ile meyve ve çiçeklere B'un taşındığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar oluşan B-sorbitol komplekslerinin B'u olgun yapraklardan genç organlara taşınabileceğini ve böylelikle bölgesel olarak artan konsantrasyonun azaltılabileceği düşündürmektedir (Brown ve Hu, 1996).

2.6.2. Bor Toleransında Antosiyaninin Rolü

B'un şeker alkollerini ile kompleks oluşturma yeteneğinin yanı sıra, B farklı fenoliklerin cis-hidroksil gruplarına da bağlanabilmektedir. Birçok çalışmada, B fazlalığına verilen yanıtta toplam fenolik bileşiklerin arttığı ve B toksisitesine karşı olası bir detoksifiye mekanizması şeklinde çalıştığı bildirilmiştir. Bu fenoliklerden biri olan antosiyaninin bitkilerde önemli bir antioksidandır ve sadece metaller ile şelatlama yapabildiği düşünülürken; yapılan son çalışmalarda, antosiyaninin şelatlama yeteneğinin sadece metaller için değil, B gibi metaloidlerde de geçerli olduğu gösterilmiştir (Landi Tattini ve Gould, 2015; Pardossi ve ark., 2015; Estévez ve ark., 2021). Ayrıca, şiddetli ışık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, patojen enfeksiyonu ve toksik seviyedeki bor gibi çeşitli streslerin oluşturduğu oksidatif hasarın önlenmesi için antosiyaninin görev yaptığı bilinmektedir. Antosiyanin sentezi reaktif oksijen türleri (ROT) ile uyarılmaktadır. Yapılan deneylerde antosiyanin üretimini denetleyen transkripsiyon faktörlerinin susturulduğu mutantlarda şiddetli ışık, düşük sıcaklık gibi streslere maruz kalan bitkilerde ROT birikiminin arttığı ve buna bağlı olarak da hücresel zararın daha çok olduğu görülmüştür (Xu, Mahmood ve Rothstein, 2017; Xu ve Rothstein, 2018). Antosiyanin sentezi, endoplazmik retikulumda fenilpropanoid yolağının başlangıcı, flavonoid yolağının ilk adımları ve geç antosiyanin yolağı olarak üç fazda gerçekleşir. İlk olarak fenilalanin sırayla; amonyak-liyaz (*PAL*), kalkon sentaz (*C4H*), kumarat-CoA ligaz (*4CL3*) genleri kontrolünde 4-kumaroil-CoA'ya çevirilerek fenilpropanoid yolağının ilk basamakları tamamlanır. Ardından flavonoid yolağı basamakları (erken faz) 4-kumaroil-CoA'nın Dihidroflavanol'lere

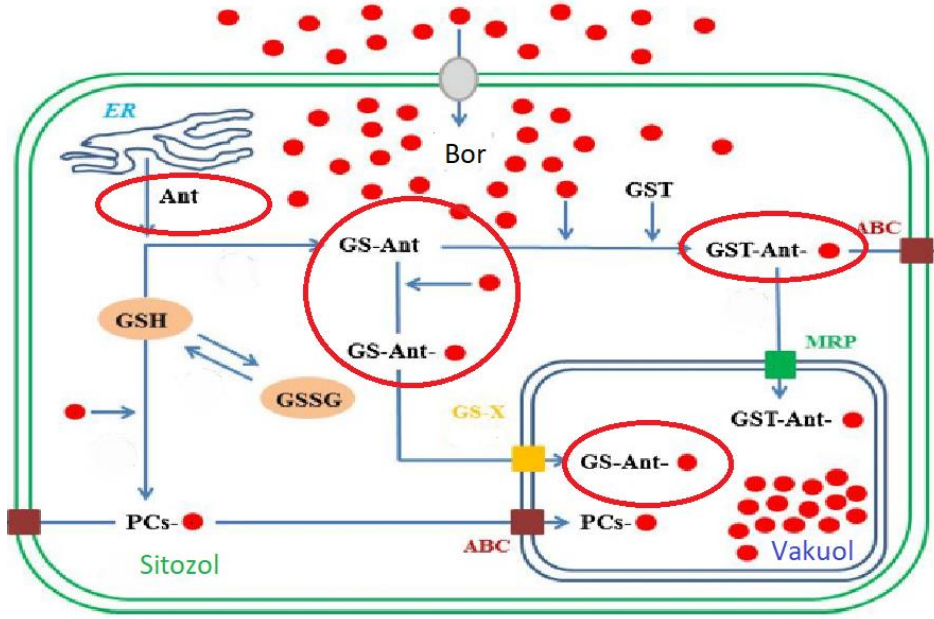
çevrilmesine kadar devam ederek geç antosiyanin evresine geçilir. Bu evrede, dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR), *MYB* transkripsiyon faktörü ailesinden *MYB75*, *MYB114*, *MYBD* ve *TT8* gibi transkripsiyon faktörlerinin kontrolündeki antosiyanidin sentaz (*ANS*) ve flavonoid-3-O-glukosiltransferaz (*UFGT*) kontrolü ile son ürün olan antosiyanin sentezi gerçekleşir (Kayıhan, 2021; Ahammed ve Yang, 2021) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Antosiyanin sentez yolağı (yeşil alan: fenilpropanoid yolağının başlangıcı, pembe alan: erken evre, mavi alan: geç evre) (Ahammed ve Yang, 2021'den değiştirerek alınmıştır).

Yüksek B stresi altındaki yaprakta antosiyaninler fotooksidasyona karşı B-antosiyanin kompleksleri oluşturarak ve bu bileşikleri vakuol içerisine taşıyarak, hücre içerisindeki B fazlalığının zararlı etkilerini hafifletebildikleri görülmüştür

(Şekil 2.7) (Landi ve ark., 2013; Landi Tattini ve Gould, 2015). Fesleğen bitkisi ile yapılan çalışmada antosiyanince zengin mor yapraklı genotipin, yeşil yapraklı olan genotipe göre toksik B koşullarına daha dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Landi Tattini ve Gould, 2015). Bu şelatlama özelliği sayesinde, bitki hücresindeki serbest iyon miktarı fotosentetik olmayan dokularda biriktirilerek toksisitenin zararları hafifletilebilmektedir (Kayıhan, 2021).



Şekil 2.7. B toksisitesi altındaki hücrede antosiyaninler oksidasyona karşı B-antosiyanin kompleksleri oluşturarak, hücre içerisindeki B fazlalığının zararlı etkilerini hafifletilmesine ilişkin model (Landi, Tattini ve Gould, 2015'den değiştirilerek alınmıştır).

Ayrıca, antosiyaninler, flavonoid biyosentez yolağının son ürünü olan suda çözülebilir pigmentlerdir (Zhang ve ark., 2018). Bu pigmentler genel olarak bitki dokularının üst kısmı gibi, fotosentetik aktivitenin yoğun olduğu çevresel kısımlarında yer almaktadırlar (Trojak ve Skowron, 2017). Bitkilerdeki antosiyaninler, şelatlayıcı görevlerinin yanında diğer flavonoidler gibi, fotosentetik aktiviteyi koruyarak elektron taşıma zincirinde ROT oluşumunu azaltan bir optik filtre gibi görev yapar (De Keyser ve ark., 2019). Antosiyaninler fotosentetik pigmentler olmadıkları için fotosentetik aparatları yoğun ışıktan koruyarak, fotosentetik dokuların daha az fotona maruz kalmasını sağlar. Sonuç olarak, stres altında bitkinin daha az ROT üreterek fotosentetik dokuların korunmasını sağlar (Stetsenko ve ark., 2020).

2.6.3. Bor Toleransında Bor Taşıyıcılarının ve Pompalarının Rolü

B toksisitesine karşı hassas olan *C. sinensis* ve *C. gaudis* kökleri üzerinde yapılan proteomik çalışmalarda, B taşınması ve birikiminde yer alan B taşıyıcı proteinlerinin iki türde farklı düzeylerde ifade edilmesi, bu proteinlerin tolerans mekanizmalarında rol aldığını gösterilmiştir (Sang ve ark., 2017). Toksik B koşullarında bu görüşü destekler şekilde, *Arabidopsis*'de BOR4 (Miwa ve ark., 2007), arpa bitkisinde (*Hordeum vulgare*) BOR1 ve BOR2 (Reid, 2007; Sutton ve ark., 2007), buğdayda BOR2 gibi anyon kanalları yüksek B'a karşı toleransta etken olarak kabul edilmiştir (Reid, 2007).

İlk tanımlanan B taşıyıcısı *A. thaliana*'da AtBOR1'dir ve B seviyeleri hücre içinde yeterli miktara ulaştığında bu kanal vasıtası ile hücre içinden ksilemlere borik asit/borat iletilmektedir. Köklerde düşük B koşullarında ya da optimal B koşullarında AtBOR1 ifadesinde herhangi bir değişiklik olmazken, yüksek B altında ifadesi azalmış ve zar üstündeki AtBOR1 proteini degrade olmuştur (Takano ve ark., 2002). Bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda B'un toprak üstü organlara iletimi azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, diğer B taşıyıcısı olan AtBOR4 ise yüksek B konsantrasyonunda ifade edilir ve toksik B koşullarında B'un taşınımını sağlayarak kök epidermisinde B birikimini önlemektedir (Miwa ve ark., 2007).

Aquaporinlerin (Major Intrinsic Proteins, MIPs) sadece kökten suyun ve B'un alınımını ve taşınmasını kolaylaştırmadığı, aynı zamanda B toksisitesine karşı toleransa da dahil olduğu bildirilmiştir. *Arabidopsis* bitkisi ile yapılan çalışmada toksik bor düzeyine maruz kalındığında köklerdeki aquaporinlerin ekspresyonu azalarak dokulara fazla bor girişinin pasif şekilde engellendiği tespit edilmiştir (Macho-Rivero ve ark., 2018).

Plazma Membran İntrinsik Proteinleri (PIPs)'n de B geçirgenliğine aracılık ettikleri ve bor hareketlerini düzenleyerek B toleransında rol oynadıkları düşünülmektedir. Çeltik bitkilerinde (*Oryza sativa*) bulunan *OsPIP1;3* ve *OsPIP2;6* genlerinin *Arabidopsis*'lere aktarılarak aşırı ifade edilmesini sağlayan araştırmacılar, bu transgenik *Arabidopsis*'lerin toksik B düzeylerine karşı tolerans kazandığı bildirmişlerdir (Şekil 2.7) (Mosa ve ark., 2016).

Bu taşıyıcılar ve aquaporinler sadece angiospermlerde izole edilmiş ve tanımlanmış olsa da yapılan filogenetik analizler likofitler ve bryofitlerde de benzer bor taşıyıcılarına sahip olduğu bulunmuştur. Bu da bor taşıyıcılarının ve aquaporinlerinin bor homeostazında önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Wakuta ve ark., 2015).

2.6.4. Bor Toleransında Antioksidan Savunma Sistemi

Sesil canlılar olan bitkiler, etraflarındaki değişen koşullar sonucu oluşan oksidatif strese yanıt verebilmek için hızlı ve iyi regüle edilen antioksidan mekanizmalar geliştirmişlerdir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz(SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz(GR) gibi enzimlerin yanında; askorbat (ASA) ve glutatyon (GSH) (ikincil metabolitler) en bilinen antioksidanlardır (Gill ve Tuteja, 2010).

İyi bir antioksidan mekanizmasına sahip olan bitkilerin genellikle B toksisitesinin sebep olduğu oksidatif hasara karşı daha avantajlı olduğu ve toksik B seviyelerine karşı daha toleranslı oldukları bildirilmiştir. Domates bitkisi ile yapılan çalışmada, yüksek B koşullarında hassas çeşitte ASA içeriği ve APX aktivitesinin toleranslı çeşitten daha az olduğu, toleranslı çeşitte ise GSH ve CAT miktarında artış olduğu bildirilmiştir. Bor toksisitesiyle ilgili yapılan birçok çalışmada, toksik düzeyde bor ile APX, CAT ve SOD aktivitelerinin ve miktarının arttığı da bildirilmiştir (Cervilla ve ark., 2007; Landi ve ark., 2013; Acar, İşkil ve Erden, 2018).

2.6.5. Bor ve Tuz İlişkisi

Bitkiler, düşük yağış ve zayıf drenaj nedeniyle kurak ve yarı kurak ortamlarda yüksek tuzluluğun yanı sıra B stresine de maruz kalabilmektedir. Ayrıca, B ve tuz ile kirlenmiş suların sulamada kullanılması da topraktaki B-Tuz konsantrasyonunun artmasına neden olur (Nable, Bañuelos ve Paull, 1997; Karimi ve Tavallal, 2017).

Bor ve tuz stresinin birlikte uygulandığı çalışmaların bir kısmında, aynı anda tuzluluk ve B stresine maruz kalan bitkilerde, tek olarak bir stres etmenine maruz kalma durumuna göre bitkilerin büyüme ve gelişiminde daha fazla etkilenme/inhibisyon olduğu bildirilmiştir (Alpaslan ve Güneş, 2001; Ben-Gal ve

Shani, 2002; Mohamed ve ark., 2016; Lata ve ark., 2017; García-Sánchez ve ark., 2020). Bununla birlikte, diğer bazı çalışmalarda tuz stresinin B toksisitesini hafiflettiği de tespit edilmiştir (Yermiyahu ve ark., 2008; Wimmer ve Goldbach, 2012; Liu ve ark., 2018). Bu çalışmalardan elde edilen bulgulara göre; B toksisitesi ile birlikte tuz stresine maruz kalan bitkilerde; (1) B ve klor iyonlarının birbirlerinin alımlarını azaltması (Yermiyahu ve ark., 2008); (2) her iki stres etmeninde birlikte spesifik aquaporinlerin, ATPaz'ın ve bazı membran bileşenlerinin aktivitesini etkileyerek yüksek konsantrasyonda B alımı/iletiminin engellenmesi (Hove, Ziemann ve Bhave, 2015; Macho-Rivero ve ark., 2018; Huanca-Mamani ve ark., 2018), (3) bazı B taşıyıcılarının Na⁺ iyonları tarafından düzenlenmesi (Nagarajan ve ark., 2016), (4) tuzluluğun stomal iletkenlik ile transpirasyon akışını etkilemesi nedeniyle B alımını ve translokasyonunu azalması (Pandey ve ark., 2019) nedeniyle tuzluluğun B toksistesinin neden olduğu olumsuz etkilerini azalttığı/hafiflettiği düşünülmektedir.

B toksisitesinin ve tuz stresinin birlikteki etkisinin incelendiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda tuz konsantrasyonun bitkinin tolerans eşiğinden daha düşük olduğunda tuzluluğun B toksisitesini azaltabileceği sonucuna varılmıştır (García-Sánchez ve ark., 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

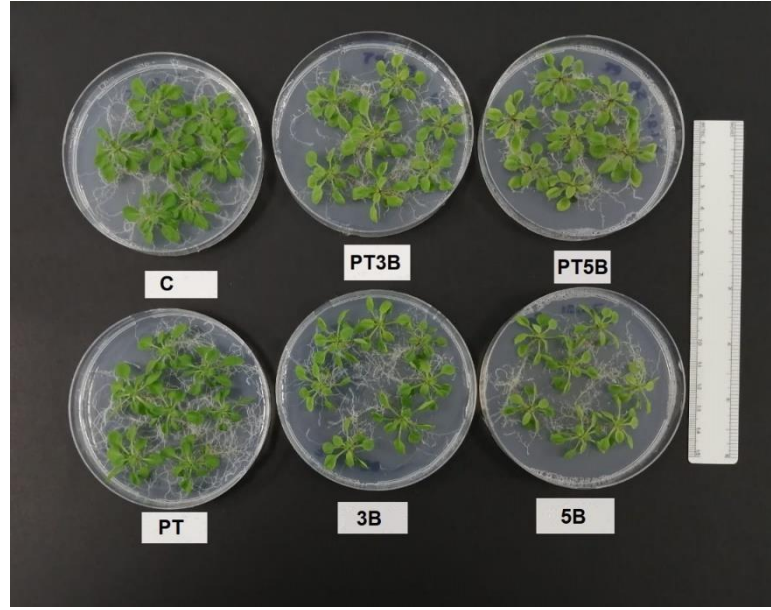
Bu araştırmada materyal olarak kullanılan model organizma *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia 0 (Col-0) ekotipine ait tohumlar, Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)'dan temin edilmiştir.

3.1.1. Bitki Yetiştirme Yöntemi

Çalışmada kullanılan *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia 0 (Col-0) ekotipine ait tohumlar sırasıyla 2 dk %70'lik etanol ve 10 dk %2.5'lik NaOCl (sodyum hipoklorit) ile muamele edilerek yüzey sterilizasyonu (Kayıhan ve ark., 2016) işlemi uygulanmış ve sonrasında in vitro koşullar altında Murashige ve Skoog (MS) besiyeri (Murashige ve Skoog, 1962) besi yeri ortamını içeren petri kaplarına ekilmiştir (Çizelge 3.1.).

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

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

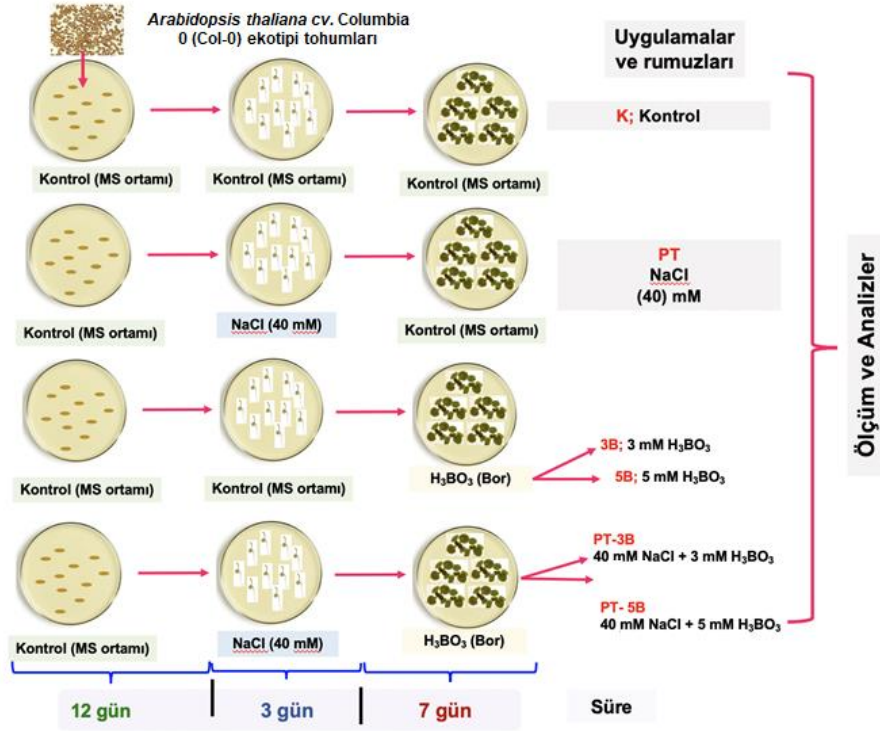


Şekil 3.1. *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin 22 günlük deney sonundaki genel görünüşleri

Tohumlar, 3 gün +4°C’de karanlık koşullara maruz bırakılarak çimlenebilmek için ihtiyaç duydukları stratifikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Stratifikasyon sonrası petriler, 21±1°C sıcaklık, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot, 200 µmol m⁻²s⁻¹ ışık şiddeti ve %50-60 nem koşullarındaki kontrollü iklim kabini içinde rastgele deneme deseninde 12 gün süre ile yetiştirilmiştir (Şekil 3.1. ve 3.2).

Çalışmada kullanılacak uygulama konsantrasyonları ve süreleri ön çalışmalar ile belirlenmiştir. Tuz ön uygulaması için farklı NaCl konsantrasyonları (30, 40, 50, 60 ve 70 mM) ile farklı toksik B konsantrasyonları (2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 mM) ve süreleri *Arabidopsis*’te test edilmiştir. Bitkilerde meydana gelen morfolojik ve fizyolojik değişimlere bağlı olarak en etkin tuz ön uygulama konsantrasyonu ve süresi olarak 3 gün 40 mM NaCl ve 7 gün 3 ve 5 mM B konsantrasyonları tespit edilmiştir.

On iki günlük bitkilerin bir grubu ön uygulama için üç gün NaCl tipi tuz içeren petri kaplarına transfer edilmiştir. Ardından NaCl ön uygulamalı/ön uygulamasız fideler ile kontrol koşullarında yer alan fideler, farklı konsantrasyonlarda bor (3 ve 5 mM H₃BO₃) içeren petri kaplarına aktararak 7 gün süre ile bor toksisitesine maruz bırakılmıştır.



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
C	22 Günlük kontrol grubu bitkileri
PT	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 40 mM tuz ön uygulamasının ardından 7 gün kontrol koşullarına maruz kalan ön uygulama için kontrol bitkileri
3B	12 gün kontrol koşulları + 7 gün 3 mM B konsantrasyonuna maruz kalan toksisite grubu bitkileri
PT-3B	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 40 mM tuz ön uygulamasının ardından 7 gün 3 mM B konsantrasyonuna maruz kalan ön uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri
5B	12 gün kontrol koşulları + 7 gün 5 mM B konsantrasyonuna maruz kalan toksisite grubu bitkileri
PT-5B	12 gün kontrol koşulları + 3 gün 40 mM tuz ön uygulamasının ardından 7 gün 5 mM B konsantrasyonuna maruz kalan ön uygulamalı bor toksisite grubu bitkileri

22 gün sonunda yukarıda belirtilen tüm gruplar hasat edilmiştir ve ölçümler yapılmıştır.

3.2. Ölçüm ve Analizler

3.2.1 Morfolojik Ölçümler

3.2.1.1. Yaprak Yüzey Alanı Ölçümü

Arabidopsis thaliana bitkilerinin uygulamalar sonunda elde edilen fotoğraf görüntülerinden ImageJ@ programı (Maloof ve ark., 2013) kullanılarak yaprak yüzey alanı (cm².bitki⁻¹) hesaplanmıştır.

3.2.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle) Ölçümleri

Arabidopsis thaliana bitkilerinin uygulamalar sonrası yaş ağırlıkları tartılarak (gr. 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 (YATI-%) ve kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI-%) Ahmad ve ark. (2009)'na göre hesaplanmıştır.

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

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

3.2.2. Fotosentetik Aktivite Ölçümleri

Bitkilerin, 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 durumu, fonksiyonu ve yapısı hakkında oldukça detaylı bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır.

Tuz ön uygulamalı ve/veya ön uygulamasız B toksisitesine maruz kalan bitkiler ile bunların kontrol grubundaki bitkilerden örneklenen yapraklar, yaprağa özel yaprak klipslerinin üstten tutturulmasıyla 30 dk karanlığa adapte edilmiştir ve tekrarlı (n=3x10) ölçüm 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

Çizelge 3.3. OJIP testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamalarının ve formüllerinin özeti (Strasser Tsimilli-Michael ve Srivastava, 2004; Tsimilli-Michael ve Strasser, 2008; Strasser ve ark., 2010; Çiçek ve ark., 2012; Guha, Sengupta ve Reddy, 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

3.2.3. Biyokimyasal Ölçümler

3.2.3.1. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi

Arabidopsis thaliana yaprak dokularındaki klorofil (a+b) ve karotenoid (ksantofil+β-karoten) miktarları (mg. ml⁻¹cm⁻²) 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. Elde edilen bu verilere göre, pigment miktarları ve klorofil a/b belirlenmiştir. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır;

$$\text{Klorofil a (kl.a)} = (11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8})$$

$$\text{Klorofil b (kl.b)} = (20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6})$$

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

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

3.2.3.2. 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, 40 %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 (ng ml⁻¹ g YA⁻¹) 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.

3.2.3.3. 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 rneği 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) zeltisi ve 0.5 ml pH'sı 7.6 olan 0.1 M tris/HCl tamponunundan eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, 97°C'lik su banyosunda 45 dk reaksiyona sokulmuştur ve buradan çıkarılan tüpler buz banyosuna konularak reaksiyon durdurulmuştur. Bu işlemden sonra reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 5 dk santrifüjlenip spektrofotometrede (Spektr UV-Vis Double Beam PC) 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki MDA miktarı nmol g T.A⁻¹ olarak belirlenmiştir.

H₂O₂ 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 (Spektr UV-Vis Double Beam PC) 390 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki H₂O₂ miktarı µmol g T.A⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.2.3.4. Bor, Sodyum ve Potasyum Miktar Tayini

Arabidopsis thaliana bitkisinin uygulama sonrası yaprak dokularındaki toksisite semptomları fotoğraflandıktan sonra bor, sodyum ve potasyum iyonlarının miktarını belirlemek için dokular 48 saat süreyle 80°C'lik etüvde kurutulmuştur. Kurutulan doku örneklere 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 [$\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1 v/v)] (Bai ve ark., 2015) ilave edilerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Özütlelerdeki bor (B), sodyum (Na) ve potasyum (K) içeriği, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer) cihazı ile belirlenmiştir. B (mg gKA^{-1}), Na ve K miktarları kuru ağırlık (KA^{-1}) temelinde g KA^{-1} olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.4.1 Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Arabidopsis thaliana kontrol ve uygulama gruplarına ait yaprak örneklerinin protein konsantrasyonları, 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 dk inkübe edilmiştir. Çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olacak şekilde okunmuştur.

3.2.4.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi Wang, Jiao ve Faust (1991)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Kontrol ve stres gruplarına ait bitkilerden alınan taze yapraklar (0.25 g) sıvı azotta havanda ezildikten sonra 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), %2 PVP, 1 mM Na_2EDTA ve 2 mM askorbat içeren 1.5 ml'lik süspansiyon çözeltisine eklenmiştir. Bu karışım $+4^\circ\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra 75 μg protein içeren enzime 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat ve 10 mM H_2O_2 ile son hacim 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. H_2O_2 'nin eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Askorbatın okside olması nedeniyle askorbat konsantrasyonunda azalma görülmektedir. Bu azalma spektrofotometrik olarak 290 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmesiyle değerlendirilmiştir. Toplam APX enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($2.8 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$) kullanılarak başlangıç hızından ($\text{nmol askorbat dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Belirlenmesi

Rao, Hale ve Ormrod (1995)'un metodu ile belirlenen toplam glutasyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2) aktivitesi için uygulama ve kontrol gruplarına ait bitkilerin yaprak dokularından 0.25 g taze yaprak örneği sıvı azot ile ezildikten sonra üzerine 100

mM potasyum fosfat (pH 7.0) ve 1 mM Na₂EDTA içeren 1.5 ml'lik çözelti eklenmiştir. Bu karışım 14000 g +4°C'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant enzim ölçümü için ayrılmıştır. Konsantrasyonu 100 mM olan potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM GSSG, 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim ekstraktı son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. NADPH'nin ortama eklenmesi ile reaksiyon başlamış örnekler 340 nm'de spektrofotometre'de (Shimadzu UV-Vis Double Beam PC) okunmuştur. NADPH'in enzimatik olmayan oksidasyonu için 340 nm dalga boyunda GSSG eklenmeyerek kaydedilen azalışla düzeltme yapılmıştır. Toplam GR aktivitesi NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM.cm⁻¹) kullanılarak enzimatik olmayan oksidasyon çıkarıldıktan sonra reaksiyon başlangıç hızından (µmol NADPH dak⁻¹ mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.2.4.4. 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 içerisinde izlenmiştir. Toplam POD enzim aktivitesi, guaiakol'ün ekstinksiyon katsayısı (6.39 mM.cm⁻¹, 436 nm) kullanılarak reaksiyon başlangıç hızından (nmol H₂O₂ dak⁻¹ mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

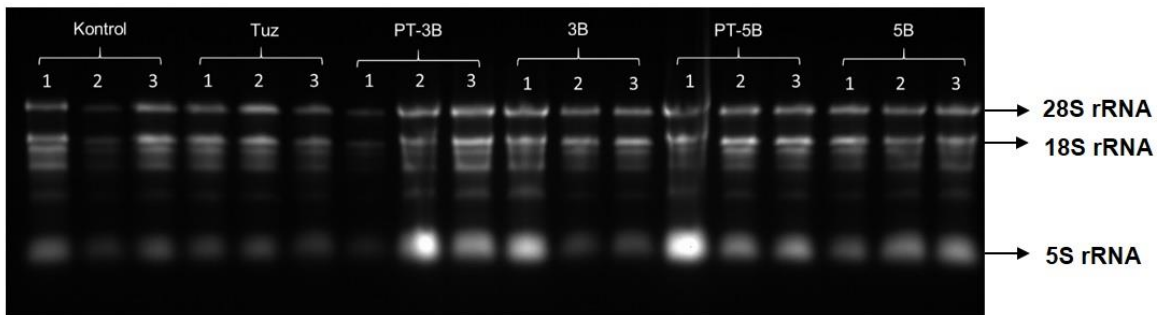
3.2.4.5. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi

(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 (µmol. mg protein⁻¹.dak⁻¹) hesaplanmıştır.

3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

3.2.5.1. 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 B stres gruplarına ait bitkilerin taze yaprak örnekleri sıvı azotta havanda ezildikten sonra üzerlerine 900 µl Qiazol konularak homojenize edilmiş ve 10 dakika çoklu vortekste karıştırılmıştır. Ardından 14000 rpm 5 dk 22°C'de santrifüj edilmiştir. 900 µl süpernatant üzerine faz ayrımını sağlamak için 180 µl kloroform eklenmiş ve tüpler 15 saniye boyunca çalkalanmıştır. Faz ayrımının meydana gelmesi için 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve ependorf tüpler 15 dk 14000 rpm 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 dakika 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 cihazıyla belirlenmiş ve konsantrasyonları ng/µl olarak Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'larının agaroz jelelektroforezi görüntüleri (1-3: Kontrol , 4-6 : PT, 7-9: 3B, 10-12: PT-3B, 13-15: 5B, 16-18: PT-5B)

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

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 alınırlar. 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 dakika

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

Tekrar Numarası	Uygulama Adı	RNA Konsantrasyonu (ng/µl)	A260/A280
1	C	1964.11	2.2
2	C	1413.97	2.19
3	C	805.4	2.17
4	PT	563.34	2.14
5	PT	829.67	2.16
6	PT	534.87	2.13
7	3B	2432.36	2.2
8	3B	2860.8	2.22
9	3B	503.11	2.13
10	PT3B	996.5	2.18
11	PT3B	973.33	2.16
12	PT3B	594.99	2.16
13	5B	422	2.11
14	5B	716.95	2.17
15	5B	866.54	2.17
16	PT5B	1059.8	2.18
17	PT5B	1267.12	2.19
18	PT5B	1425.48	2.21

ve ardından 70°C'de 5 dakika inkübasyon olarak ayarlanır. Elde edilen cDNA tüpleri -80°C'de saklanmaktadır.

3.2.5.3. 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. Primerlerin sekansları, AGI kodları ve gen adları Çizelge 3.5.'de verilmiştir. 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, Tm (primerlerin cDNA'ya tutunma sıcaklığı) değerleri ve ürün büyüklükleri (baz çifti) Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

3.2.5.4. 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 cycler) 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 dakika, daha sonra miktar tayini için 40 kez gerçekleşecek bir döngüye maruz bırakılmıştır. Bu döngü 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye tutunma ve 72°C'de 30 saniye uzama olaylarını içermektedir. Son olarak erime eğrisi (melting curve) çizilmesini sağlayan veriler cihazın 65°C de 1 dk. 99°C ise 5 saniyede 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.

3.2.5.5. 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 edilmiş miktarını hesaplamak için hedef gen miktarı referans gene bölünmüş ve ortalamalarının log dönüşümleri (log₂) yapılmıştır. Log dönüşümleri yapılmış normalize edilmiş ifade değerleri birbirleri ile 2^{-deltaCt} karşılaştırılmıştır.

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

AGI Kodu	Gen Adı	Kısaltma	Yön	Sekans (5' – 3')	Tm (°C)	Sekans boyutu (bc)
AT1G65060	Coumarete:CoA Ligase	<i>4CL3</i>	Forward	AAAGGCTTTCAGGTCCCTCC	59	20
			Reverse	TCCATTTGATCGCACCACGA	57	20
AT1G56650	MYB Domain Protein 75	<i>MYB75</i>	Forward	GGCTTCTAGGGAATAGGTGGTC	62	22
			Reverse	GGTGTGTAGGAATGGGCGT	59	20
AT1G66380	MYB Domain Protein 114	<i>MYB114</i>	Forward	GAGGGTTCGTCCAAAGGGTT	60	21
			Reverse	CACCGATTTAGCCCAGCTCTT	59	20
AT1G70000	MYB D	<i>MYBD</i>	Forward	CCAACCGATGACGGTGGTTA	59	20
			Reverse	ATGGAGTTCCTCGTTTGCCT	57	20
AT2G30490	Cinnamate 4-Hydroxylase	<i>C4H</i>	Forward	TGAAGCTGAGCAGAAGGGAG	59	20
			Reverse	AATGTTGTCTCAATCGCGGC	57	20
AT3G53260	Phenylalanine Ammonia Lyase 2	<i>PAL2</i>	Forward	GAAGCTCATTAGATTTTTGAACGCCG	60	25
			Reverse	ATTGCGGCAGTGTGTGACAT	57	20
AT4G09820	Transparent Testa 8	<i>TT8</i>	Forward	TCCTCAACAACGGGTCTTGG	59	20
			Reverse	CTCCGCTGGTTGAGTTGCT	59	20
AT4G22880	Anthocyanidin Synthase	<i>ANS</i>	Forward	ACGCGAGTGGACAATTGGAA	57	20
			Reverse	CGTACTCACTCGTTGCTTCTATGT	61	24
AT5G17220	Glutathione S-Transferase 26	<i>GST26</i>	Forward	TATGGACAGGTAACAGCAGC	57	20
			Reverse	AACTTGACCAAATGGCTGACG	58	21
AT4G23100	Glutamate Cysteine Ligase	<i>GSH1</i>	Forward	GAAGCCACATATGGACAGACT	59	20
			Reverse	CTCAAACCCAAAAGAGTCATCGAAA	59	20
AT3G18780	Actin 2	<i>ACT2</i>	Forward	CTTGACCTTGCTGGACGTGA	59	20
			Reverse	AATTTCCCCTCTGCTGTTG	57	20

3.3. Veri Analizi

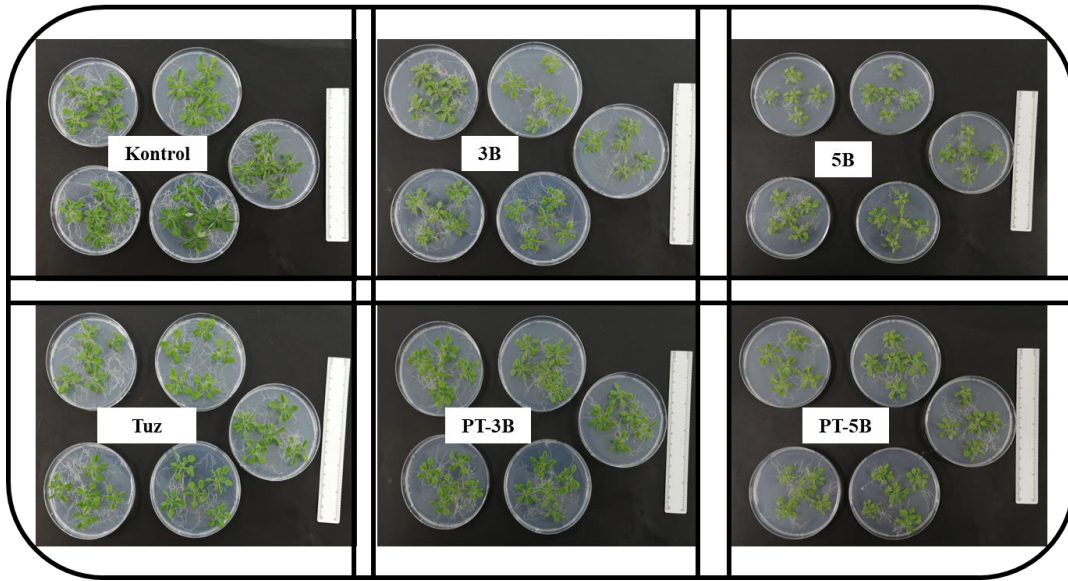
Denemeler rastgele deneme desenine göre 3 tekrarlı ve her bir tekrarda 5 bitki olacak şekilde düzenlenmiştir. Denemelerde her bir değişken için kullanılan örneklem sayısı (n) ilgili ölçüm açıklamasında verilmiştir. Denemelerden elde edilen verilere, istatistik paket programı (SPSS, versiyon 20) ve R istatistiksel yazılımı (R Core Team, 2014) için bir arayüz sağlayan R Studio programı (RStudio Team, 2016) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Analiz sonucunda her bir değişken için uygulamalar arasındaki istatistiksel olarak en küçük anlamlı önemli fark (Least Significant Differences; LSD) %5 düzeyinde hesaplanmıştır. Anlamlı ($P < 0.05$) farkların hangi uygulamalardan kaynaklandığı ise Tukey testi ile karşılaştırılmıştır. Her bir değişken için qRT-PCR verileri normal dağılım göstermediğinden student non-parametrik t-testi ile analiz edilmiştir ($P < 0.05$). Grafikler üzerindeki barlar standart hatayı göstermektedir ($\pm SH$).

4. BULGULAR

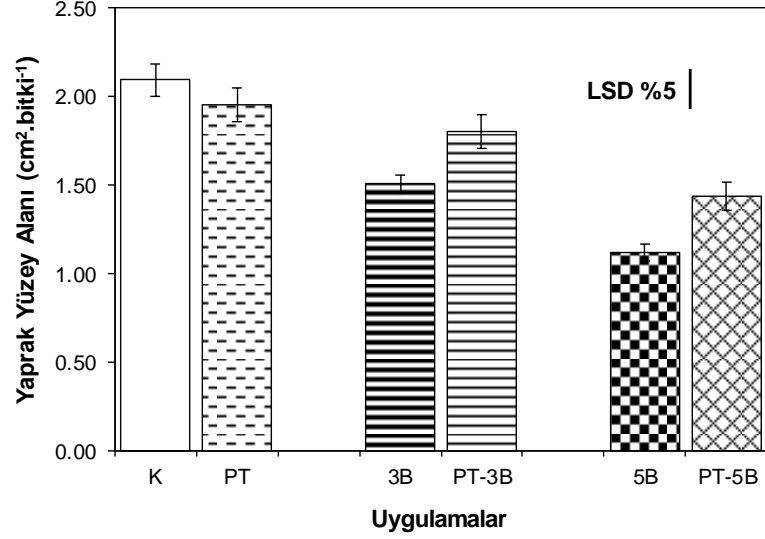
4.1. Model Organizma *Arabidopsis thaliana* Bitkisinde Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransının Kazanımında Morfolojik Değişimler

4.1.1. Bitki Gelişimi ve Yaprak Yüzey Alanındaki Değişimler

Farklı seviyelerde bor toksisitesine (3B ve 5B) maruz bırakılan tuz ön uygulamalı (PT) ve/veya ön uygulamasız *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin gelişimi incelendiğinde; B toksisitesine maruz kalan bitkilerin gelişiminin kontrol gruplarına göre olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Tuz ön uygulaması gruplarının (PT-3B ve PT-5B) uygulamasız gruplara göre (3B ve 5B) B toksisitesinden daha az etkilendiği saptanmıştır (Şekil 4.1).



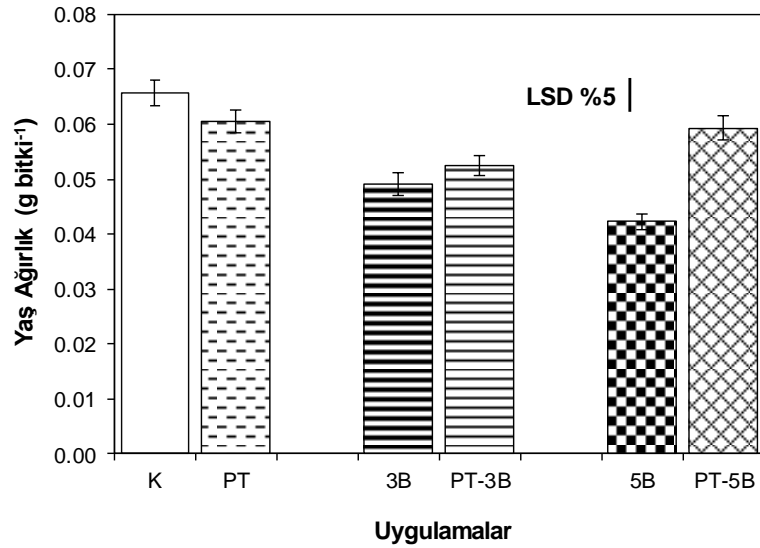
Şekil 4.1. 22 günlük deneme sonunda tuz ön uygulamalı ve/veya ön uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin genel görüntüsü. Bor toksisitesine maruz kalan bitkilerin görüntüleri, ImageJ@ programı kullanılarak analiz edilmiş ve yaprak yüzey alanları belirlenmiştir. Bor toksisite düzeyinin artışına bağlı olarak bitkilerin yaprak yüzey alanlarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$; Şekil 4.2). Yaprak yüzey alanındaki, bu azalma kontrole göre 3mM B'da %28 ve 5mM B düzeyinde ise %47 oranında olduğu saptanmıştır. Tuz ön uygulamaları ile her iki B toksisitesinin yaprak yüzey alanı üzerindeki olumsuz etkisini anlamlı seviyede hafifletilmiş ve PT-3B'de 3B'a göre %20, PT-5B'de ise 5B'a göre %28 oranında yaprak yüzey alanının daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$; Şekil 4.2).



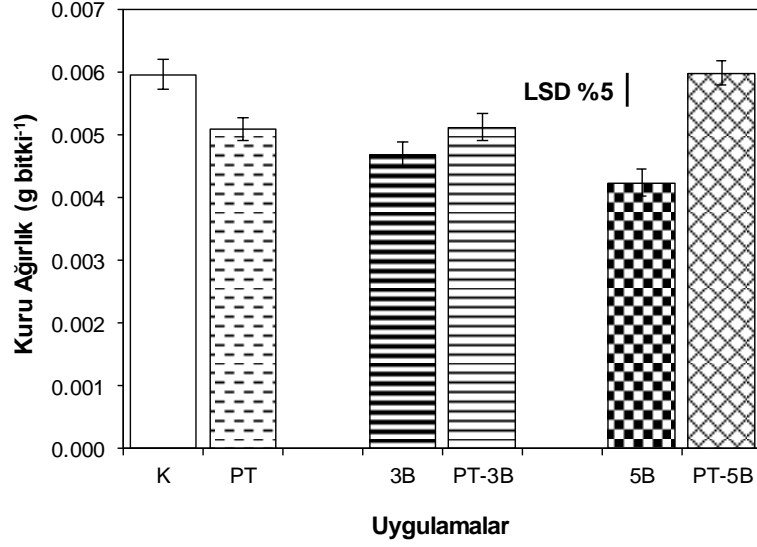
Şekil 4.2. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde imageJ@ programı ile hesaplanan yaprak yüzey alanlarındaki değişim

4.1.2. Yaş ve Kuru Ağırlık (Biyokütle) Değişimleri

Farklı seviyelerde bor toksisitesine maruz bırakılan tuz ön uygulamalı ve/veya ön uygulamaz *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin biyokütellerindeki değişim incelendiğinde; toksisiteyle birlikte biyoküttelede önemli düzeyde ($P < 0.05$) azalma belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).

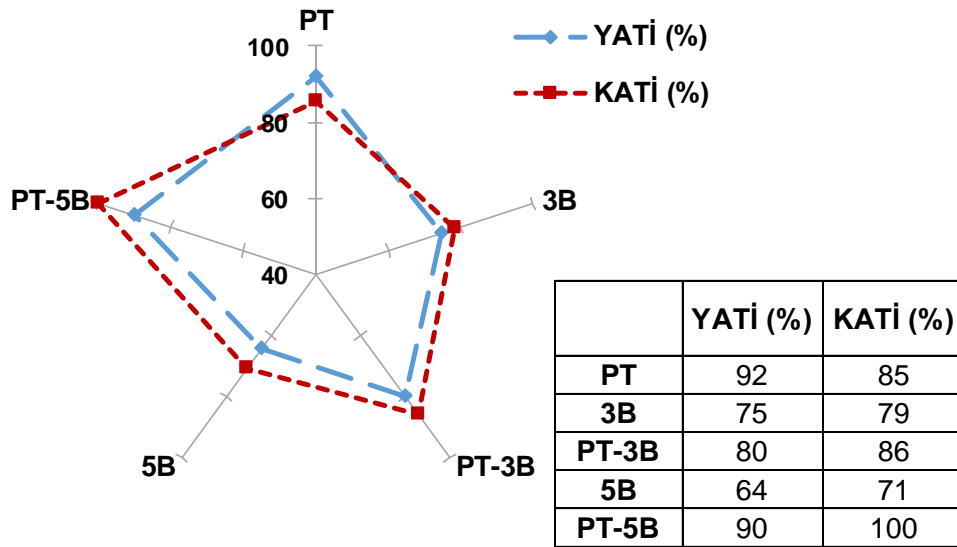


Şekil 4.3. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaş ağırlığı üzerine etkisi



Şekil 4.4. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin kuru ağırlığı üzerine etkisi

B toksisitesinin (3B ve 5B) artışı ile yaş ağırlık değerleri kontrole göre sırayla %25 ve %36 oranında (Şekil 4.3), kuru ağırlık değerleri ise %21 ve %29 oranında azalmıştır (Şekil 4.4). Bu azalma, istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). Yaş ve kuru ağırlık verilerinden hesaplanan yaş ve kuru ağırlık tolerans indeks (YATİ ve KATİ) değerleri de artan bor toksisitesinin bitkilerde büyümeyi inhibe ettiğini ve tuz ön uygulaması ile bu olumsuz etkinin hafifletildiğini ve toksik B düzeylerine karşı toleransın geliştiğini göstermektedir (Şekil 4.5).

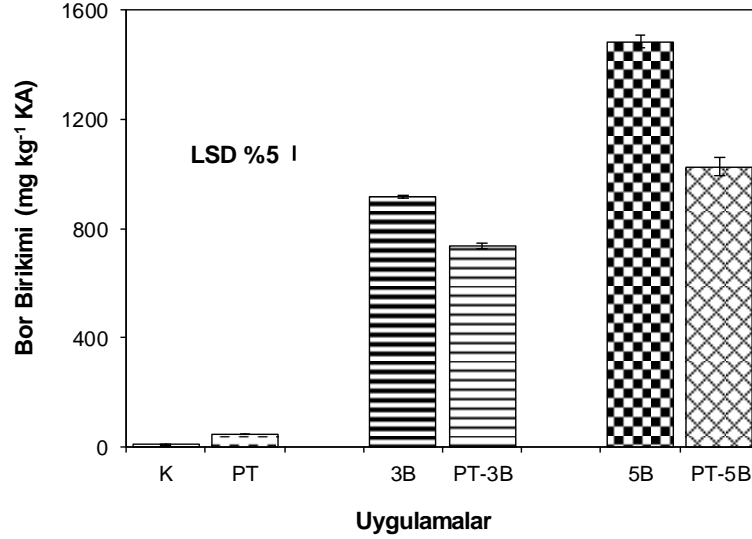


Şekil 4.5. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaş ve kuru ağırlık tolerans indeksi üzerine etkisi

4.2. Model Organizma *Arabidopsis thaliana* Bitkisinde Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransının Kazanımında Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler

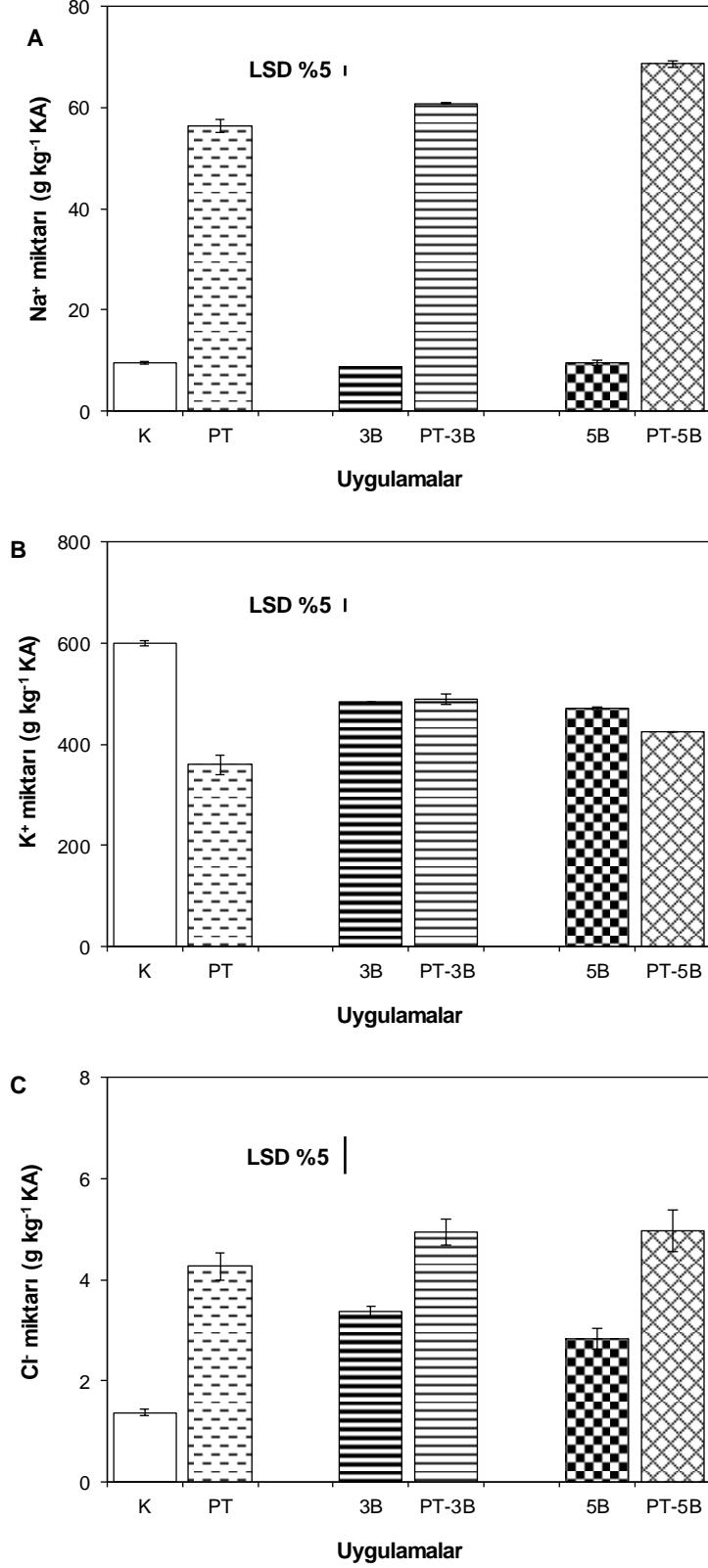
4.2.1. Bor Birikimi ve Bazı İyon İçeriklerindeki Değişimler

Artan konsantrasyonda bor toksitesine maruz kalan *Arabidopsis* bitkilerinde, kökleri vasıtasıyla alınan bor elementinin, sürgündeki birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.6). *Arabidopsis* bitkilerinin sürgününde bor birikimi, toksite artışına bağlı olarak artmıştır ($P<0.05$; kontrole göre 3B'da 122 kat, 5B'da 198 kat artış). En yüksek B birikimi, 5mM B konsantrasyonunda belirlenmiş olup, $1486 \text{ mg.kg KA}^{-1}$ seviyesindedir. Bunun yanı sıra, tuz ön uygulaması ile bor birikimi PT-3B'da 3B'a göre %20, PT-5B'da ise 5B'a göre %31 oranında daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$; Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin (A) bor birikimi

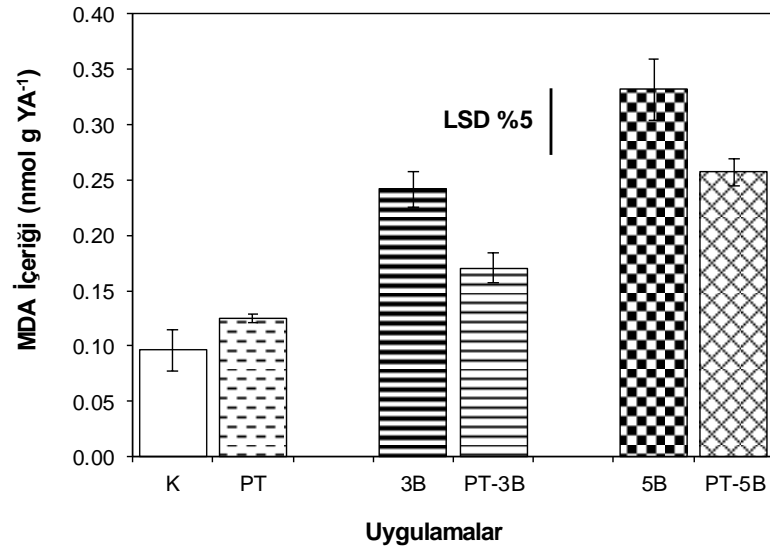
Bor toksitesine karşı tolerans kazanımının sağlanması için 40 mM konsantrasyonda NaCl tipi tuz ön uygulaması (PT) yapılmıştır. Tüm ön uygulamalarda Na⁺ ve Cl⁻ içeriği önemli düzeyde artmıştır ($P<0.05$) ve bu artış kontrole göre sırasıyla PT'de 5.8 ve 3.1, PT-3B'da 3B'a göre 6.9 ve 1.5, PT-5B'da ise 5B'a göre 7.2 ve 1.8 kat artmıştır (Şekil 4.7A ve B). K⁺ içeriği ise, tuz ön uygulamasında sadece tuz uygulamasında kontrole göre %40, PT-5B'da ise 5B'a göre %10 oranında azalmıştır ($P<0.05$; Şekil 4.7C). Bunun yanı sıra, bor toksitesi *Arabidopsis* bitkilerinin sürgününde bor birikimi ile birlikte Cl⁻ alımının artmasına, K⁺ alımının ise azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.7 B ve C). 3B ve 5B'da sırasıyla K alımı kontrole göre %19.5 ve %21.5 oranında azalırken; Cl⁻ alımı 1.46 ve 1.06 kat oranında artmıştır ($P<0.05$).



Şekil 4.7. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin (A) sodyum, (B) klor ve (C) potasyum miktarları üzerine etkisi.

4.2.2. Membran Bütünlüğündeki Değişimler

Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikaller membranlarda lipid peroksidasyonlarına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarındaki değişimlerde membran hasarları hakkında bilgi vermektedir. B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde MDA miktarı kontrole göre 3B'da 2.52 kat, 5B'da ise 3.45 kat artmıştır ($P < 0.05$). Tuz ön uygulaması yapılan gruplarda ise PT-3B'da 3B'a göre %29, PT-5B'da 5B'a göre %22 oranında daha az MDA miktarı belirlenmiştir ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$; Şekil 4.8).

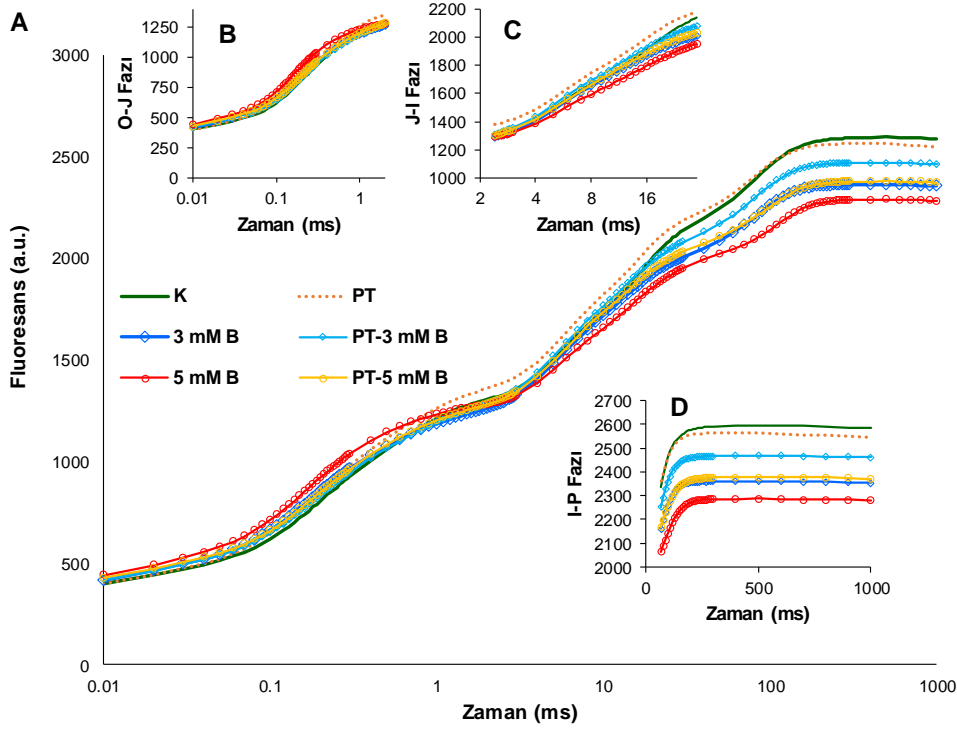


Şekil 4.8. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin MDA içeriği üzerine etkisi

4.2.3. Fotokimyasal Aktivitedeki Değişimler

Klorofil a floresans ölçümleri, kontrol ve uygulamalar sonunda *Arabidopsis* yapraklarının 30 dk karanlığa adapte olmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Floresans ölçüm verilerinin analizi, fotosentetik aparatındaki enerji akışları teorisi temeline dayanan ve "JIP-testi" olarak bilinen teste göre yapılmaktadır. Bor toksisitesinin *Arabidopsis* yapraklarında ölçülen floresans geçişleri (OJIP) logaritmik zaman skalasında çizilmiştir (Şekil 4.9). Tipik bir OJIP eğrisi (Kautsky eğrisi); O-J, J-I ve I-P evreleri olmak üzere üç ana faza sahiptir. Kautsky eğrisi, *Arabidopsis thaliana*'da toksik B düzeylerinin klorofil a floresans geçişlerini etkilediği ve tuz ön uygulamasının B toksisitesinin etkisini hafiflettiğini göstermektedir (Şekil 4.9A). Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz B toksisitesi gruplarındaki bitkiler, kontrole göre değişimler göstermekle birlikte tipik OJIP

polifazik yükselişi göstermişlerdir. O-J fazının B uygulama gruplarında kontrole göre yükseliş göstermektedir ($P<0.05$; Şekil 4.9.B).



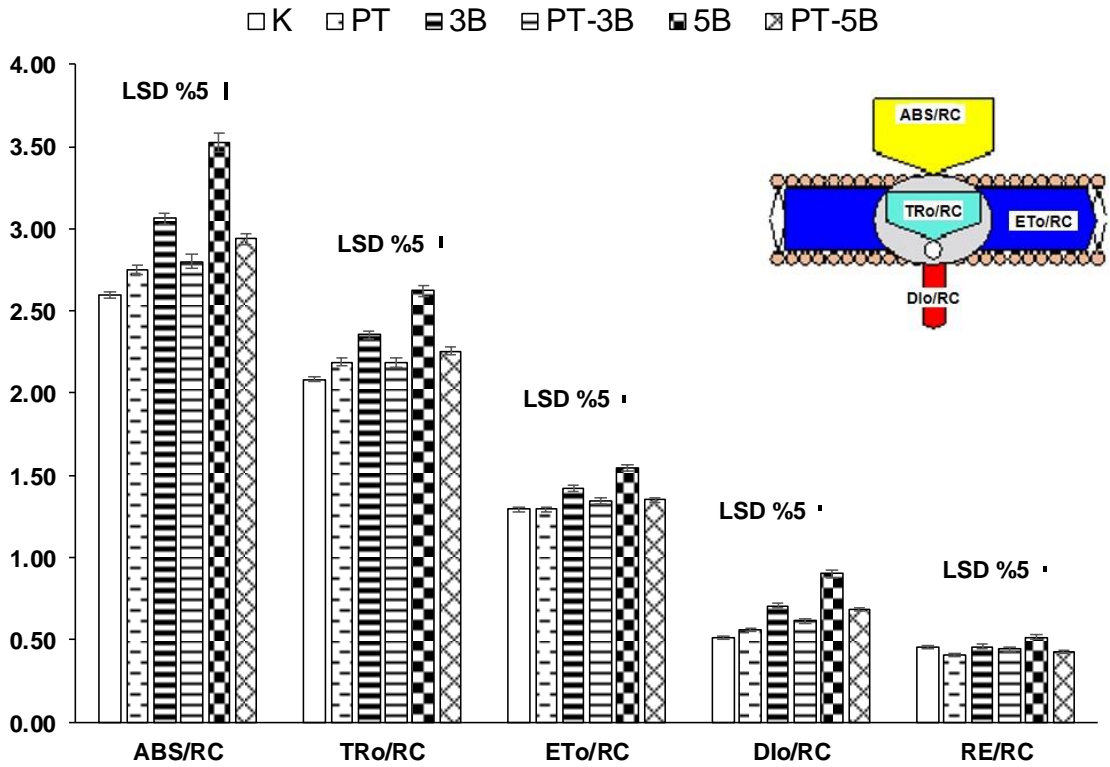
Şekil 4.9. (A) Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin fotosentetik aparatlarındaki polifazik klorofil a floresans geçişleri. Ölçülen klorofil a floresans geçişleri kaydedilmiş ve logaritmik zaman ölçeğinde (0.01-1 s) grafiklendirilmiştir. Yapraklardaki karakteristik polifazik OJIP eğrileri; (B) O-J (C) J-I ve (D) I-P

Eğrinin sonraki J-I fazı, bütün uygulama gruplarında kontrole göre düşük bulunmuştur ($P<0.05$; Şekil 4.9.C). Düşüş ön uygulama yapılmayan toksik B gruplarında ön uygulama yapılan toksik B gruplarına göre daha yüksektir. B toksisitesinin J-I fazındaki olumsuz etkisi, I-P fazında daha da belirginleşmiştir (Şekil 4.9.D). Bununla birlikte I-P genişliğindeki (amplitude) düşüşün, 5B grubunda diğer gruplara göre daha belirgin olduğu görülmüştür. Ancak, tuz ön uygulaması bitkilerdeki B'un toksik etkisini 3B grubuna kadar iyileştirebilmiştir (Şekil 4.9.D).

Tilakoid membranlardaki enerji akışları teorisine göre yapılan JIP testi hesaplamaları ile uygulamaların *Arabidopsis*'in spesifik (PSII'nin her bir ölçüm yapılan RC başına hesaplanan; membran modeli) ve fenomenolojik (fotosentetik örneğin ölçüm yapılan her birim alanından hesaplanan; yaprak modeli) enerji akışları ve bazı JIP testi parametreleri üzerine olan etkileri de incelenmiştir (Şekil 4.10 – 4.13).

Spesifik enerji akışları tuz ön uygulamalı veya uygulamasız B toksisitesinden etkilenmiştir (Şekil 4.10): Spesifik enerji akışı parametrelerinden reaksiyon merkezi başına absorbe edilen veya ortalama anten büyüklüğünü ifade eden ABS/RC'nin, tüm bor uygulamalarında kontrole göre önemli düzeyde arttığı bulunmuştur ($P < 0.05$).

Bitkilerde reaksiyon merkezi başına yakalanan enerji akışı (TR_o/RC) ve elektron transportu (ET_o/RC) ile fotokimya dışında ısı şeklinde kaybedilen enerjiyi (DI_o/RC) ifade eden değerler, B toksisitesinin artışına bağlı olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($P < 0.05$; Şekil 4.10). Tuz ön uygulaması ile bu etkinin hafifletildiği belirlenmiştir. B uygulamalarının artışına bağlı olarak PSI'in en son elektron alıcılarını redükleyen ve her bir aktif reaksiyon merkezine transfer edilen elektron akışını yansıtan RE_o/RC 'deki artış da ABS/RC'deki değişimle benzer olarak inaktif reaksiyon merkezleri sayısındaki artışla bağlantılı olabilir.



Şekil 4.10. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin fotosentetik aparatlardaki spesifik enerji akışları (RC başına)

Bununla birlikte, yakalanan eksiton enerjisinin elektron olarak elektron transportuna aktarımının kuantum verimi hakkında bilgi veren ϕ_{EO} (ET_o/ABS) değerleri model bitkide artan B toksisitesi altında önemli düzeyde azalmıştır

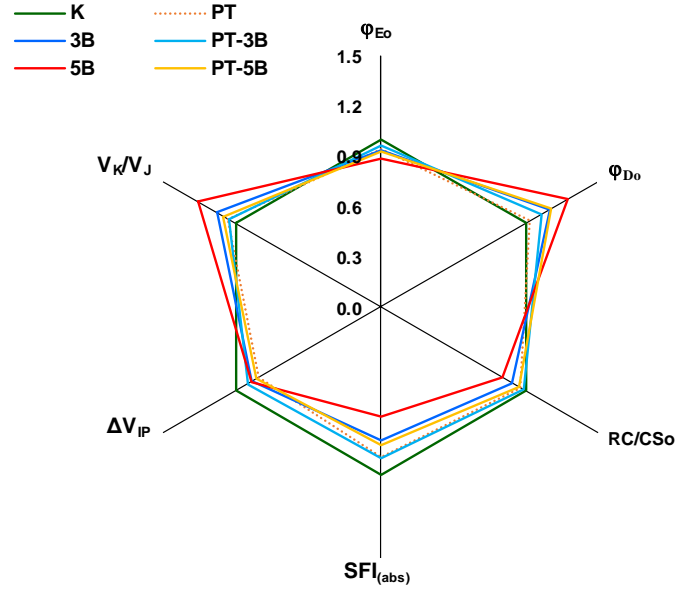
($P < 0.05$; 3B'da %7, 5B'da ise %34 oranında; Şekil 4.11). Bitkilerde artan B toksitesi ile PS II'nin donör (verici) ve PSI'nin akseptör (alıcı) bölgelerinin redoks durumu hakkında bilgi veren sırası ile V_K/V_J ve ΔV_{IP} parametrelerindeki değişimler de incelenmiştir (Şekil 4.11). Model bitkide oksijen oluşturan kompleksin (OEC) inaktivasyonunu ve olası hasarını belirten V_K/V_J değeri de 3B'da %13, 5B'da ise %26 oranında artmıştır ($P < 0.05$). Bunun yanı sıra, B konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ΔV_{IP} değeri istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($P < 0.05$).

Bor toksitesi ile reaksiyon merkezi başına yakalanan enerjinin fotokimyasal yola aktarılmadan ısı olarak enerji kaybının (DI₀/RC) artmasının yanı sıra; enerji yayılımının kuantum verimini ($t = 0$ sn) ifade eden ϕ_{DO} (F_0/F_M) değeri bitkilerde bor toksitesinde önemli düzeyde artmıştır ($P < 0.05$; Şekil 4.11). Q_A 'yi redükte etme kapasitesine sahip reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu gösteren RS/CS₀; tüm uygulamalarda kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır. Ancak bu azalmanın toksik bor düzeylerinde daha dramatik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).

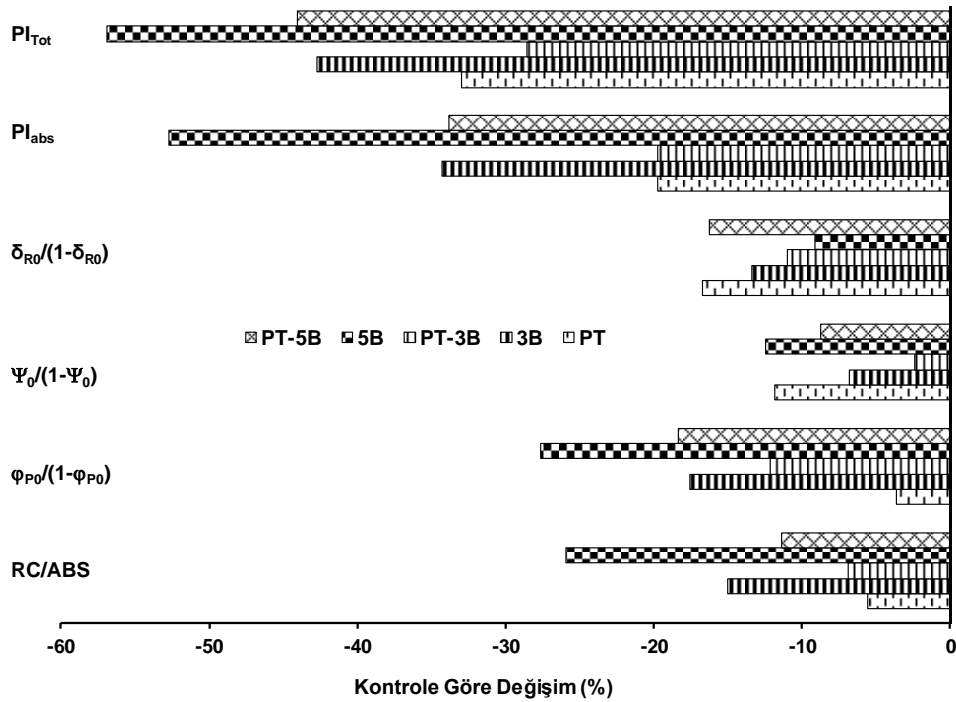
PSII'nin yapısal ve fonksiyonel durumunu belirten $SFI_{(abs)}$ ile PSI'nin alıcı tarafındaki azalmayı belirten ΔV_{IP} parametresine ait değerler ise Arabidopsis bitkisinde artan B toksitesi altında önemli düzeyde azalmıştır ($P < 0.05$; sırasıyla 3B'da %20 ve %11, 5B'da %34 ve %11 oranında azalış). B toksitesinin model bitkinin fotosistemlerinde oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel inhibisyon tuz ön uygulaması ile hafifletildiği saptanmıştır (Şekil 4.11).

Bitkinin fotosentetik performansını ortaya koyan performans (canlılık) indeksleri (PI'leri - PI_{ABS} ve PI_{TOT}) en çok kullanılan hassas JIP parametrelerindedir ve her iki PI parametresi de B toksitesi altında *Arabidopsis thaliana*'da önemli düzeyde azalmıştır (sırasıyla 3B'da %34 ve %43, 5B'da, %53 ve %57 oranında azalış) ($P < 0.05$; Şekil 4.12). PI'lardaki bu azalma, B toksitesi altında model bitkide PI bileşenlerinin genel olarak anlamlı düzeyde azalmasının sonucudur. Reaksiyon merkezi başına PSII anten klorofilleri tarafından indirgenen Q_A miktarı (RC/ABS) ile primer fotokimyasal reaksiyonun etkinliğinin göstergesi ($\phi_{PO}/(1 - \phi_{PO})$ 'ndaki bu azalma diğer bileşenlere göre daha fazladır ve bu azalış sırasıyla 3B uygulamasında %15 ve %18, 5B 'da ise %24 ve %28 oranındadır ($P < 0.05$).

Bunların yanı sıra, tuz ön uygulaması ile artan bor toksisitesinin PI'leri ve bileşenleri üzerindeki olumsuz etkisi azaltıldığı görülmektedir.

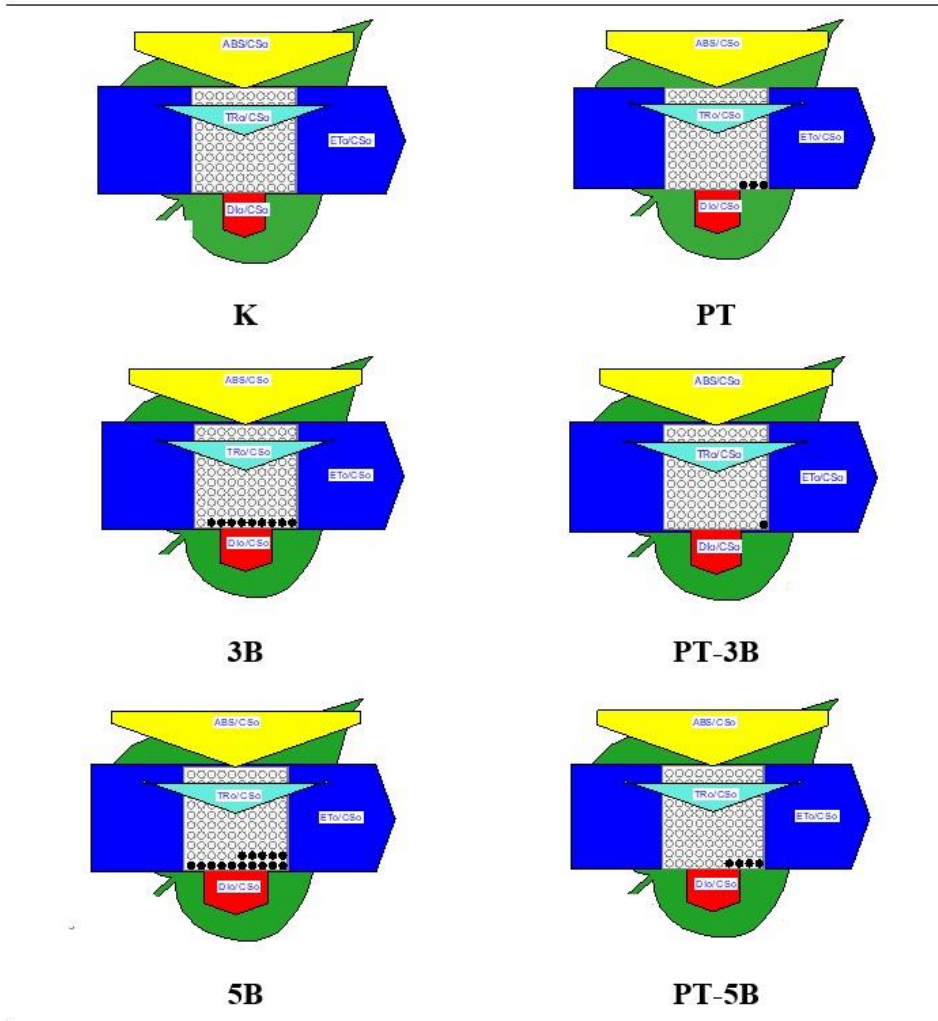


Şekil 4.11. Tuz ön uygulamalı veya uygulamasız olarak farklı konsantrasyonlarda bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin fotosentetik aparatlarında enerji akış teorisine dayanan ve JIP test ile hesaplanan bazı JIP parametrelerindeki değişim



Şekil 4.12. Tuz ön uygulamalı veya uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin fotosentetik performansları ve bileşenleri üzerine etkisi

Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin birim yaprak alanı başına (CS₀), PS II'deki fenomolojik enerji akışları yaprak *pipe-line* modeli ile açıklanmıştır (Şekil 4.13). Bu modelde enerji akışı, yakalanan fotonlar, elektron transportu ve fotokimyasal olmayan kullarımdaki değışimler okların kalınlıkları ile gösterilmiştir. Toksik B konsantrasyonunun artışına bağlı

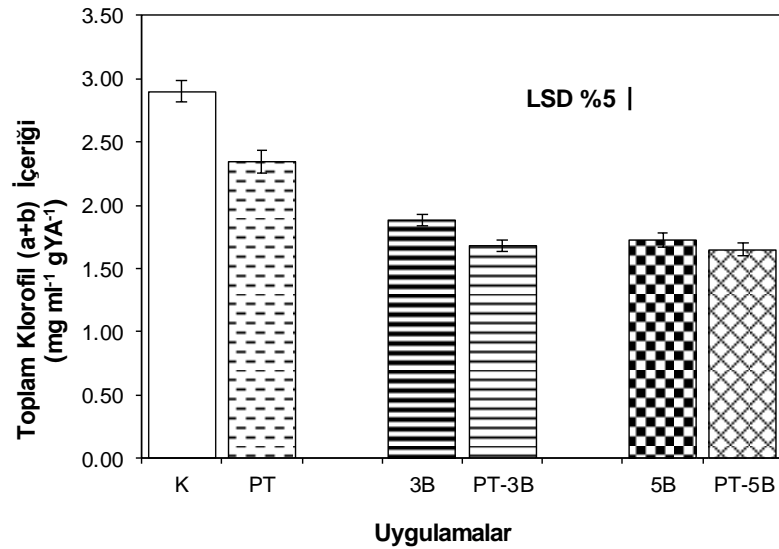


Şekil 4.13. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yapraklarındaki fenomolojik enerji akışları (birim yaprak alanı başına, CS₀). Fenomolojik enerji akış parametrelerini gösteren okların genişlikleri, parametrelerin nispi değerlerini temsil etmektedir. Enerji akışları; her bir yaprak alanı başına absorplanan enerji (ABS/CS₀), yakalanan enerji (TR/CS₀), elektron taşıma (ET/CS₀) ve aşırı uyarılma enerjisinin ısı olarak yayılımını (DI/CS₀) içermektedir. Siyah daireler inaktif, açık daireler aktif reaksiyon merkezlerini temsil etmektedir.

olarak bitkilerin fenomenolojik enerji akışlarında da önemli değişimlerin olduğu saptanmıştır ($P<0.05$; Şekil 4.13). Birim yaprak alanı bazında absorblanan uyarılma enerjisi (ABS/CS₀), yakalanan enerji (TRo/CS₀) toksik B konsantrasyonunda anlamlı düzeyde ($P<0.05$) artış sergilemiştir. Absorblanan enerjinin fotokimyasal kullanımı (ETo/CS₀) önemli düzeyde bir değişim göstermemiş, enerjinin büyük bir kısmı ısı şeklinde (DIO/CS₀) kaybedilmiştir. Bununla birlikte toksik bor uygulamaları tilakoid membranlarda inaktif reaksiyon merkezlerinin artışına yol açmıştır.

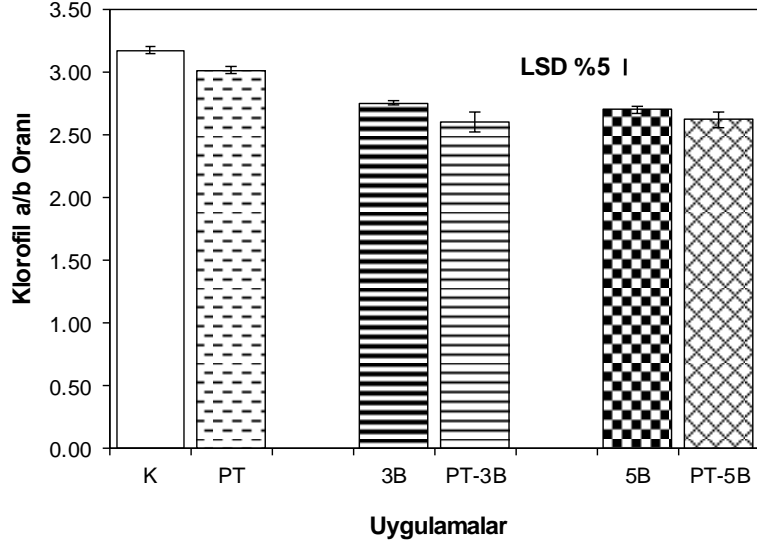
4.2.4. Fotosentetik Pigment İçeriğindeki Değişimler

Bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yapraklarında bulunan toplam klorofil a+b miktarının kontrole göre önemli düzeyde azaldığı görülmüş ve toplam klorofil içeriği her iki B konsantrasyonunda da sırayla %42 ve %43 oranında azalmıştır (Şekil 4.14). Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yapraklarındaki toplam klorofil içeriklerindeki değişim en yüksek B uygulamaları arasında (PT-5B ve 5B) önemli bulunmamıştır ($P>0.05$; Şekil 4.14).



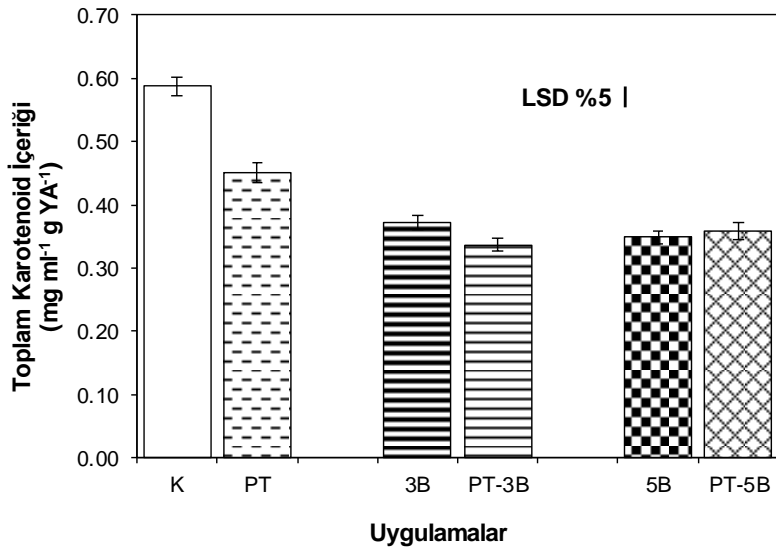
Şekil 4.14. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin toplam klorofil (a+b) miktarı üzerine etkisi

Toplam klorofil içeriğinin yanı sıra, B toksisitesine bağlı olarak *Arabidopsis* bitkilerinde klorofil a/b oranı da kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$; iki B konsantrasyonunda da kontrol grubuna göre %18 azalma görülmüştür; Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinde klorofil a/b oranı üzerine etkisi

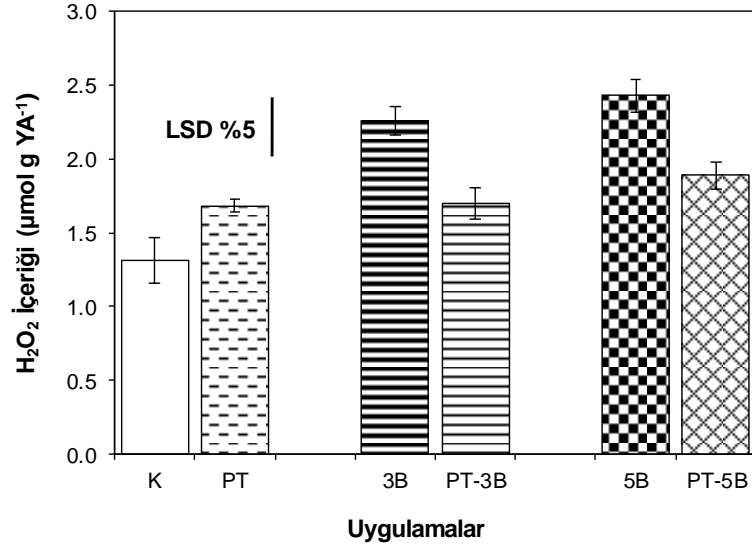
Arabidopsis bitkilerinde B toksitesine bağlı olarak toplam karotenoid (x+c) miktarının anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($P < 0.05$; 3B ve 5B uygulamalarında sırasıyla %43 ve %39 oranında azalma). Tuz ön uygulamasında ise *Arabidopsis* bitkilerinde sadece PT-3B'da 3B'a göre azalışların anlamlı olduğu (%10) saptanmıştır ($P < 0.05$; Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi

4.2.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarındaki Değişimler

B toksisitesi altında *Arabidopsis* bitkilerinde H₂O₂ miktarı da MDA'ya benzer değişimler sergilemiştir. H₂O₂ miktarı kontrole göre 3B'da %72, 5B'da ise %85 oranında artmıştır. Tuz ön uygulamaları ile H₂O₂ miktarında B toksisitesinin neden olabileceği artışların azaltıldığı ve H₂O₂ miktarlarının PT-3B'da 3B'a göre %25 ve PT-5B'da ise 5B'a göre %22 oranında daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

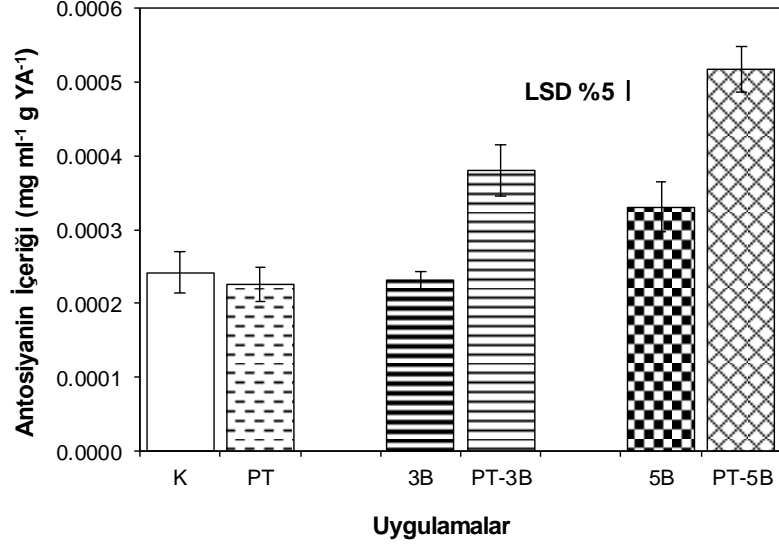


Şekil 4.17. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin H₂O₂ içeriği üzerine etkisi

4.2.6. Tolerans Kazanımında Savunma Sistemlerinin Rolü

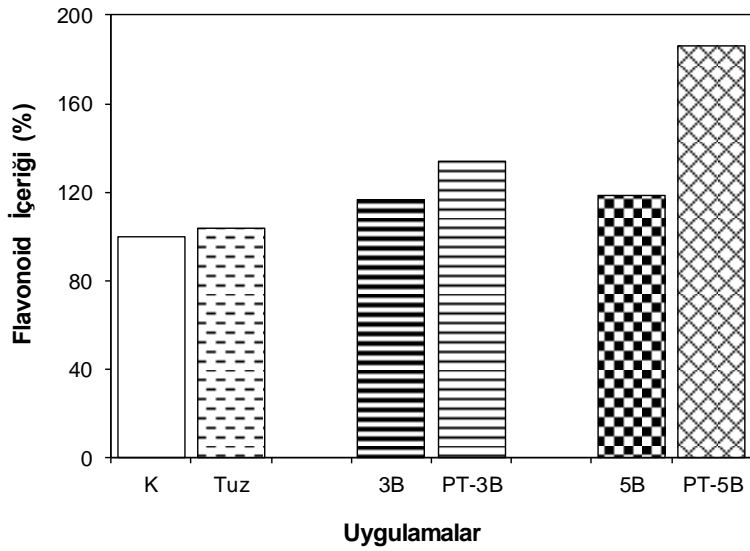
4.2.6.1. Antosiyanin ve Flavonoid Pigment Miktarlarındaki Değişimler

Arabidopsis thaliana bitkilerinin yapraklarında antosiyanin miktarı; bor toksisitesine maruz kalan bitkilerde kontrollere göre sadece 5B uygulamasında %36 oranı ile anlamlı düzeyde artarken, tuz ön uygulamalarında ise PT-3B'da 3B'a göre %64, PT-5B'da ise 5B'a göre %57 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir (P<0.05; Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin antosiyanin içeriği üzerine etkisi

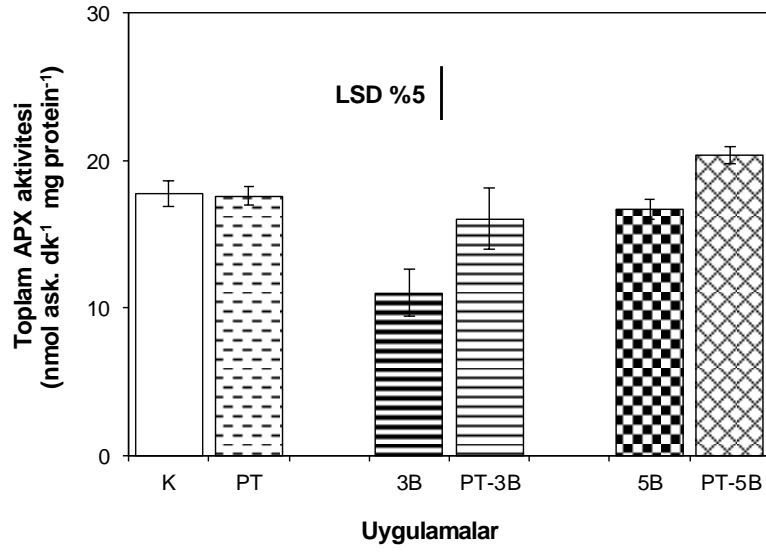
B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis* bitkilerinde flavonoid içeriği de antosiyanin ile uyumlu sonuçlar vermiştir. B toksisitesi altındaki bitkilerde kontrollerine göre 3B'da %17, 5B'da ise %18 oranında önemli düzeyde artarken, tuz ön uygulamalarında ise PT-3B'da 3B'a göre %15, PT-5B'da ise 5B'a göre %57 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$; Şekil 4.19).



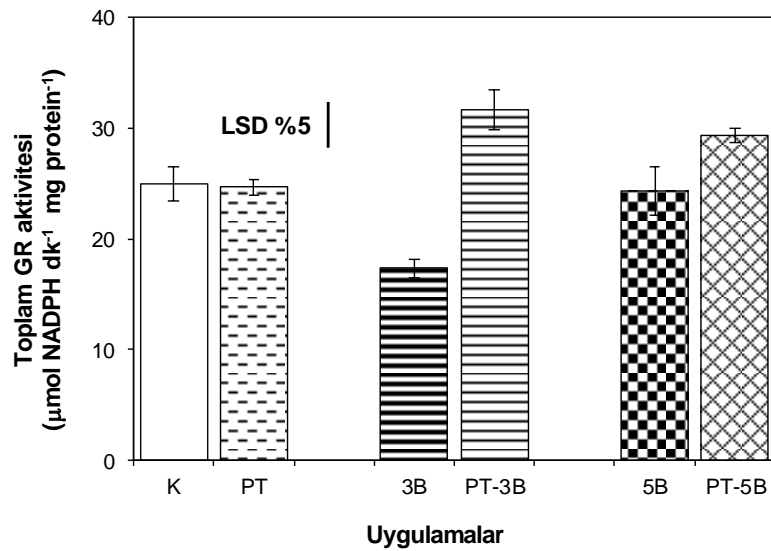
Şekil 4.19. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin flavonoid içeriği üzerine etkisi

4.2.7. Metaloid Detoksifikasyonunda Rol Alan Bazı Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

4.2.7.1 Askorbat Peroksidaz (APX) ve Glutatyon Redüktaz (GR) Aktiviteleri
Asada-Halliwell (askorbat-glutatyon) yolunda yer alan APX ile GR enzim aktiviteleri benzer yönde değişim göstermiştir (Şekil 4.20 ve 4.21). Her iki enzim aktivitesi de bor toksisitesi altında sadece 3B’da kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($P < 0.05$) ve bu azalış APX’de %38 iken GR’da %31 oranında olmuştur. Bunun yanı sıra tuz ön uygulamasında ise APX ve GR enzim aktiviteleri PT-3B’da 3B’a göre %45 ve %83, PT-5B’da ise 5B’a göre %22 ve %21 oranında artmıştır.



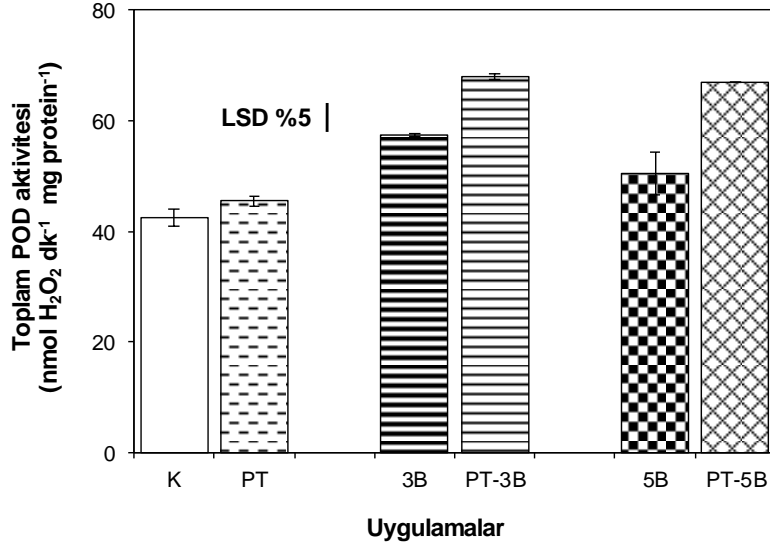
Şekil 4.20. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin APX aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.21. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin GR aktivitesi üzerine etkisi

4.2.7.2. Peroksidaz (POD) Aktivitesi

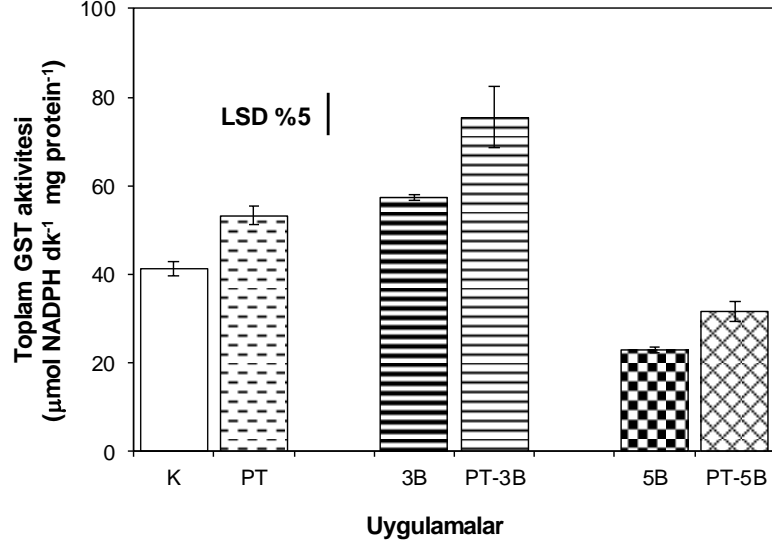
B toksisitesi altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde ön uygulamalı ve ön uygulamaz gruplarda peroksidaz (POD) aktivitesi kontrole göre; PT-3B grubunda %46, PT-5B grubunda %66 artmıştır ($P<0.05$). Ön uygulamalı B grupları ön uygulama yapılmayan gruplara göre anlamlı şekilde iyileştirici etki göstermiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksisitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin POD aktivitesi üzerine etkisi

4.2.7.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi

Arabidopsis thaliana bitkisinde yapılan ön uygulamalı ve ön uygulamaz bor toksisitesi glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesini kontrole göre 3B grubunda %39 artırmış ve 5B grubunda ise %45 azaltmıştır ($P<0.05$; Şekil 4.23). Tuz ön uygulamalı ve ön uygulamaz B toksisitesi grupları arasındaki farklar PT-3B'da 3B'a göre %32; PT-5B'da ise 5B'a göre %37 oranında önemli bir artış saptanmıştır ($P<0.05$).

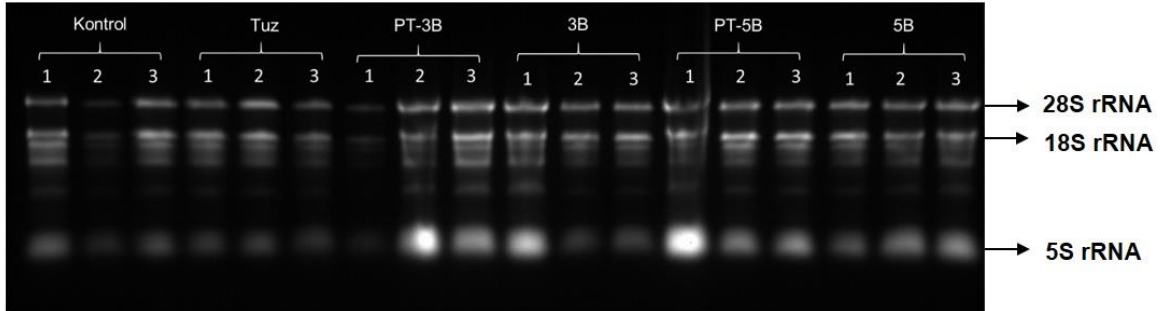


Şekil 4.23. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz bor toksitesinin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin GST aktivitesi üzerine etkisi

4.2.8. *Arabidopsis thaliana*'da, Tuz Ön Uygulaması ile Bor Toleransında Antosiyanin Biyosentez Yolağında Yer Alan Bazı Gen ve/veya Genlerdeki Değişimler

4.2.8.1. RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

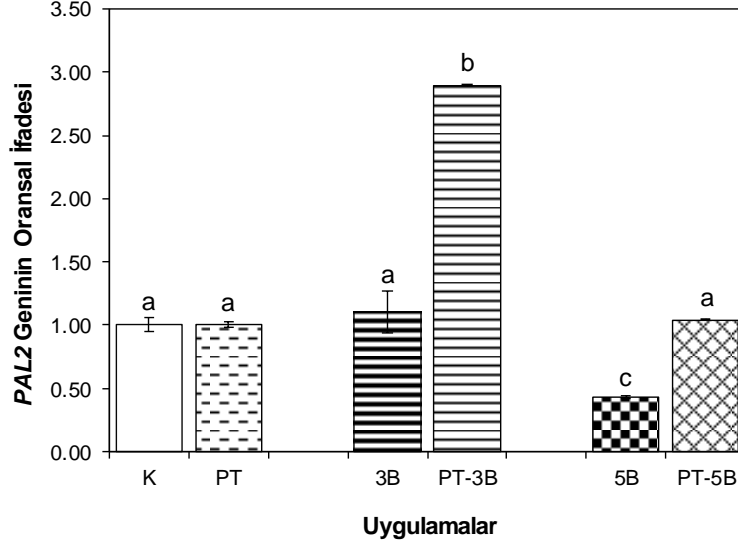
Arabidopsis thaliana bitkisinin yapraklarından izole edilen RNA'lar öncelikle agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş olup ardından da NanoDrop ile miktar tayini yapılmıştır (Şekil 4.24)



Şekil 4.24. Yaprak dokusundan izole edilen toplam RNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntüleri

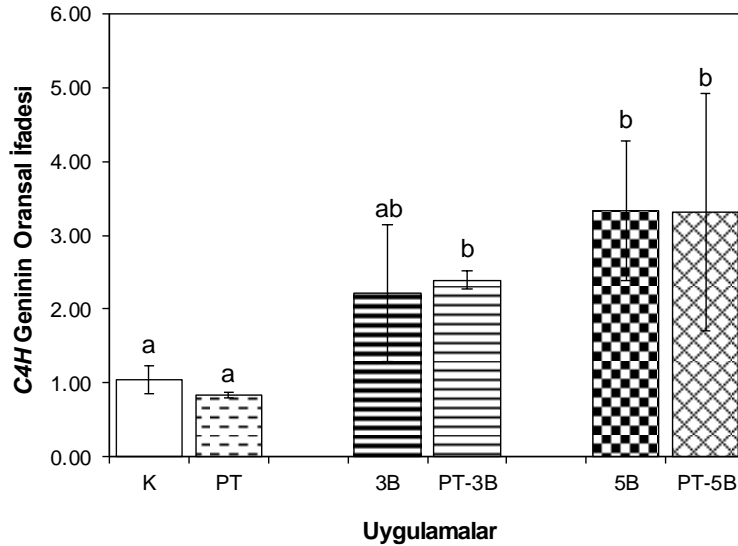
4.2.8.2. Genlerin Oransal İfadesi

PAL2 (Phenylalanine Ammonia Lyase 2) geninde PT-3B grubunda kontrole göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($P < 0.05$; 2.8 kat; Şekil 4.25).



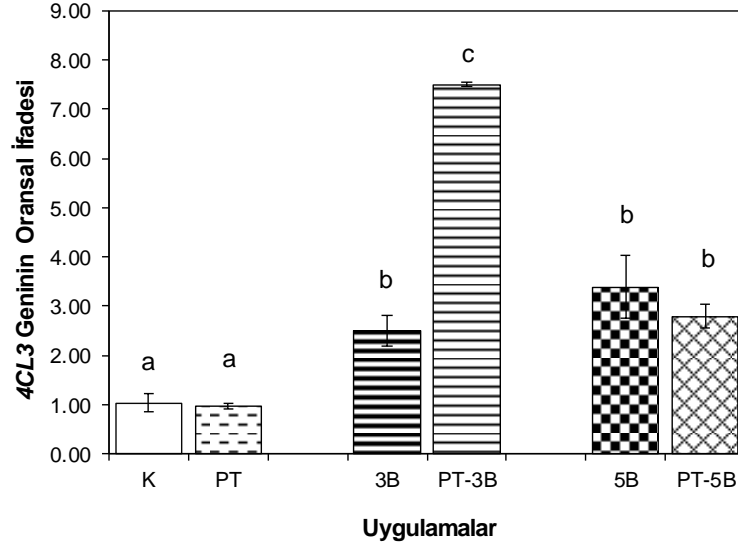
Şekil 4.25. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *PAL2* geninin ifade oranları. Farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın %5 düzeyinde önemli olduğu göstermektedir. Ayrıca, tuz ön uygulamalı gruplarda ön uygulama yapılmayan gruplara göre *PAL2* geninin ifadesindeki artış istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Fakat toksisite seviyesi arttıkça bu ifade artışının azaldığı görülmüştür.

C4H (Cinnamate 4-Hydroxylase) geninde kontrole göre sadece PT-3B, 5B, PT-5B gruplarında anlamlı bir artış görülmüş (sırayla; kontrole göre 2.3 kat, 3.3 kat), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P < 0.05$; Şekil 4.26).

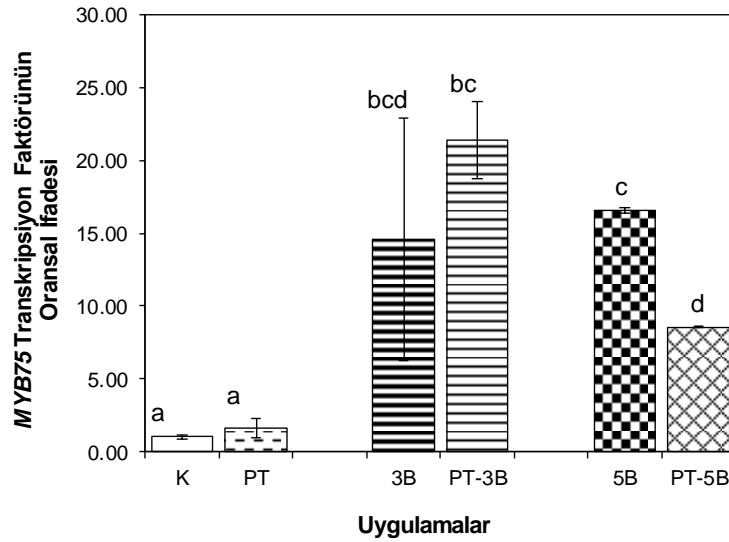


Şekil 4.26. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *C4H* geninin ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

Tuz ön uygulamalı ve ön uygulamasız bor toksisitesi altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde *4CL3* (Coumaret-CoA Ligase) geni ifadesi, PT-3B grubunda kontrole ve 3B grubuna göre anlamlı seviyede artmıştır (kontrole göre 7.2, 3B'a göre 3 kat). PT-5B grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı artış görülürken ($P < 0.05$; 2.7 kat), 5B grubuna göre artış önemli bulunmamıştır (Şekil 4.27).



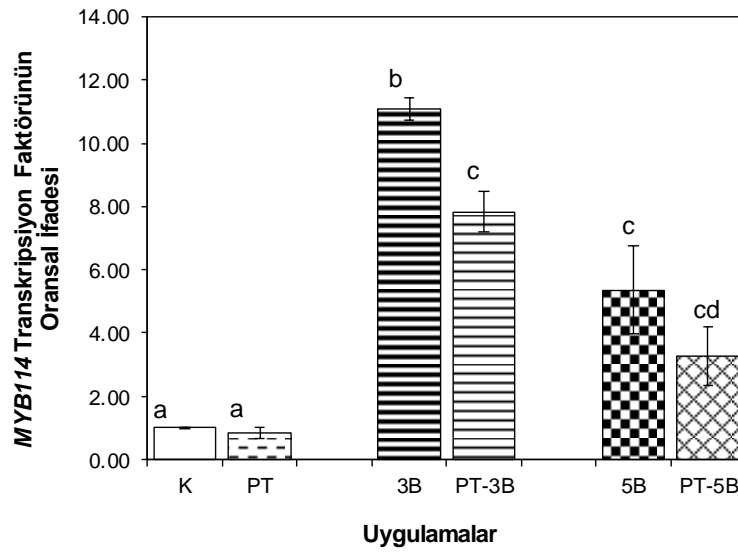
Şekil 4.27. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *4CL3* geninin ifade oranları (Bknz Şekil 4.25) MYB75 (MYB Domain Protein 75) gen ifadesinde toksik B koşullarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür ($P < 0.05$; 3B'da 14, PT-3B'da 21, 5B'da 16



Şekil 4.28. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *MYB75* transkripsiyon faktörünün ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

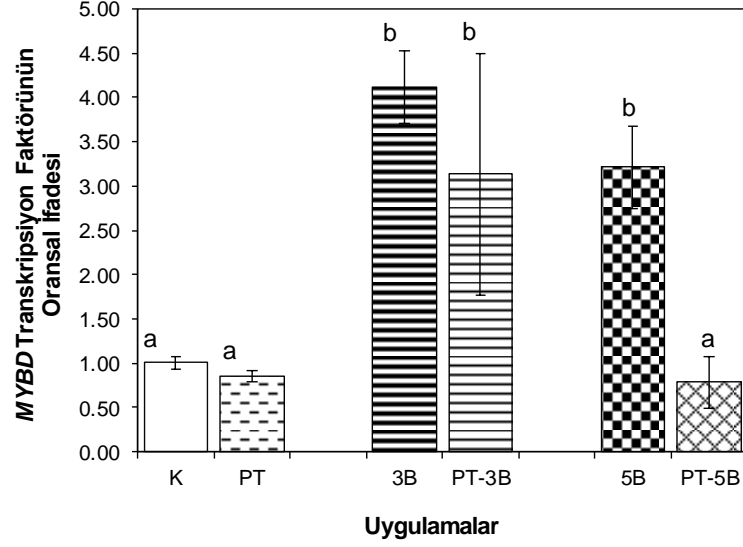
PT-5B'da 8 kat). Fakat PT-3B, 3B ve 5B grupları arasındaki fark anlamlı saptanmazken, PT-5B grubunda 5B grubuna göre anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($P<0.05$; yaklaşık %50; Şekil 4.28).

MYB114 (MYB Domain Protein 114) tüm uygulamalarda kontrole göre artış (3B'da 11 kat, PT-3B'da 8 kat, 5B'da 5 kat ve PT-5B'de 3 kat) önemli bulunmuştur ($P<0.05$; Şekil 4.29). Tuz ön uygulamalarında B toksitelerine göre sadece PT-3B ile 3B arasındaki değişimin önemli olduğu saptanmıştır ($P<0.05$; yaklaşık %30 azalma) .



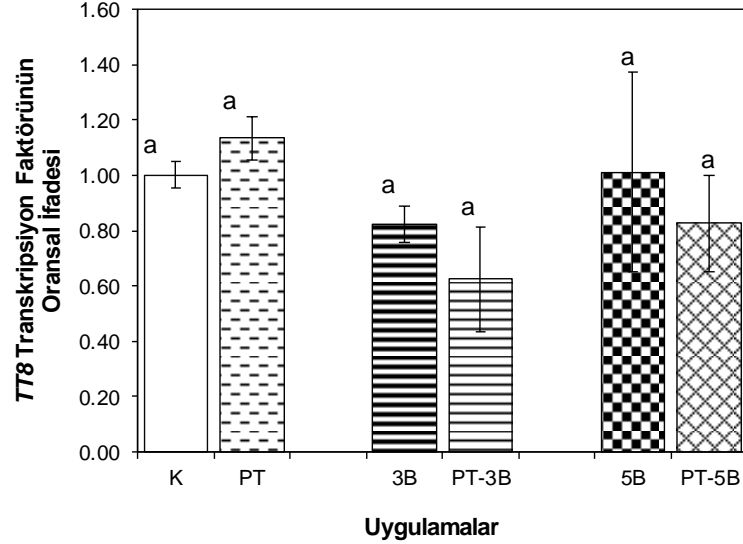
Şekil 4.29. Tuz ön uygulamalı ve uygulamaz B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *MYB114* transkripsiyon faktörünün ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

MYBD transkripsiyon faktörünün ifadesinde PT-5B hariç diğer uygulama gruplarındaki artış kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$; Şekil 4.30). Bunun yanı sıra, tuz ön uygulamalarında *MYBD* transkripsiyon faktörünün ifadesi bor toksisite uygulamalarına göre daha düşük bulunmuştur.



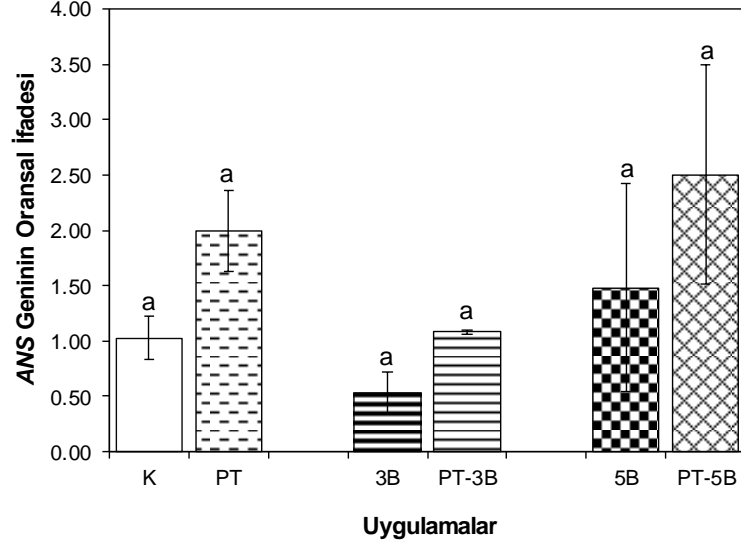
Şekil 4.30. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *MYBD* transkripsiyon faktörünün ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

Diğer yandan, *TT8* (Transparent Testa 8) transkripsiyon faktörünün ifadesindeki değişim incelendiğinde; uygulamalar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.31).



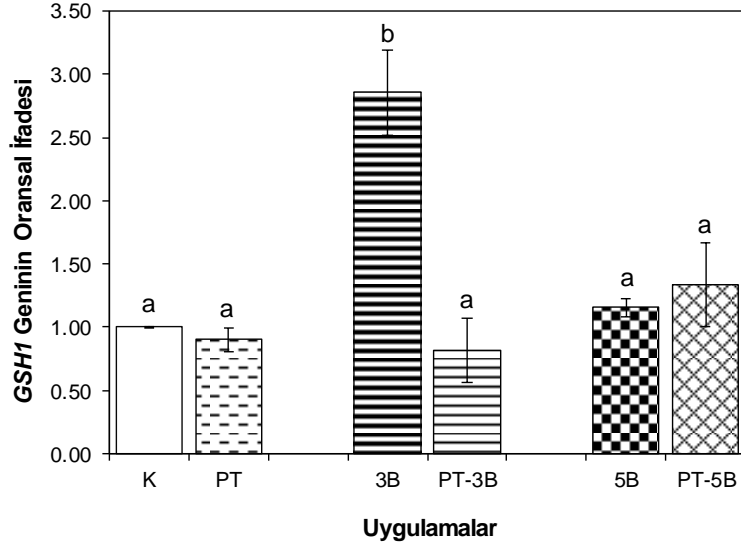
Şekil 4.31. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *TT8* transkripsiyon faktörünün ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

ANS (Antosiyanidin sentaz) geninin ifade seviyesindeki değişim, tuz ön uygulamalı ve ön uygulamasız bor toksisitesi altındaki bitkilerde istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($P > 0.05$; Şekil 4.32).



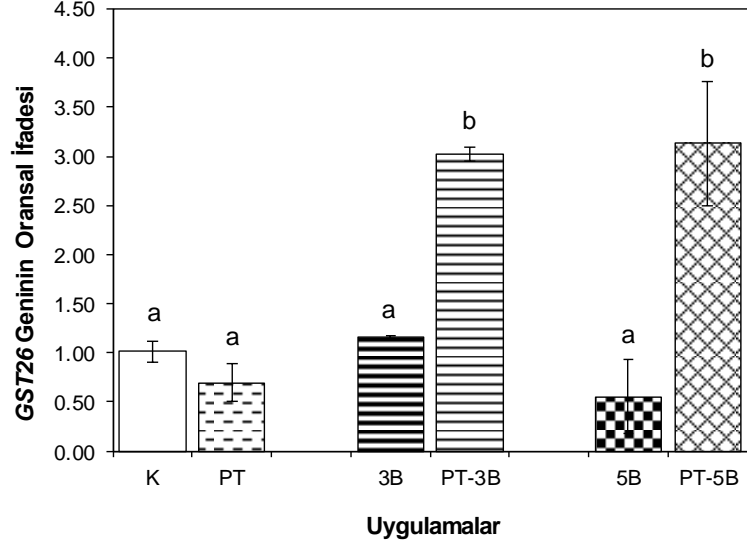
Şekil 4.32. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde ANS geninin ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

Tüm uygulamalarda *GSH1* (Glutamate Cysteine Ligase) gen ifadesindeki değişimin sadece 3B grubunda anlamlı olduğu, diğer gruplardaki değişimin ise istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($P>0.05$; Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *GSH1* geninin ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

GST26 (Glutathione S-Transferase 26) geni ifadesinde ise PT-3B ve PT-5B arasında bir fark belirlenmezken, bu tuz ön uygulamalar ile kontrol (PT-3B 2.9 kat, PT-5B 3 kat artış) ve B toksisite grupları (PT-3B 3B'ye göre 2.5 kat, PT-5B 5B'ye göre 5.6 kat artış) karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmüştür ($P<0.05$; Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde GST26 geninin ifade oranları (Bknz Şekil 4.25)

5. TARTIŞMA

Bor, bitki büyüme ve gelişme sürecinde metabolizmanın etkili bir şekilde sürdürülebilmesi için zorunlu ihtiyaç duyulan mikro-besin elementlerinden biridir (Warington, 1923). Ancak, tipik bir mikro-besin elementi gibi bitkinin ihtiyaç duyduğu optimal bor miktarı, noksanlık ile toksisite arasında dar bir aralıkta yer almaktadır (Garcia-Sanchez ve ark., 2020). Toleranslı bitkiler $2-4 \text{ mg L}^{-1}$ B ile sulama suyundaki B'nin toksik etkisinin üstesinden gelebilirken, $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ B'dan daha yüksek değerler hassas bitkiler için toksisiteye yol açabilir (Nable, Banuelos ve Paull, 1997). Yüksek bor düzeyi bitkilerin pek çok metabolik sürecine etki ederek, büyüme ve biyokütle üretiminde azalmaya neden olmaktadır. Toksik düzeyde bor elementinin bitkiler üzerindeki etkisi bitkinin türüne, fenolojik evresine, toksisiteye maruz kaldığı süreye ve toksisite şiddetine bağlı olarak değişim göstermektedir.

Transgenik yaklaşım metotları kullanılmadan, doğal koşullarda bor akümülatörü özelliği olmayan bitkilerin, bor toksisitesine dayanıklılığını artırmak için, bazı uygulamalar yapılarak bitkiler uyumlandırılıp bor toksisitesinin olumsuz etkilerine karşı dayanıklı hale gelmeleri sağlanabilmektedir. Silikon (Çelikkol Akçay ve Erkan, 2016), mannitol (Coşkun ve ark., 2014), nitrik oksit (Esim ve Atıcı, 2013), kalsiyum (Siddiqui ve ark., 2013), tuz (Grieve ve ark., 2010), ve arbuskular mikoriza (Liu ve ark., 2018) gibi uygulamaların, toksik bor koşulları ile birlikte verildiğinde bitkide bor toksisite zararlarını azalttığı ileri sürülmektedir. Bu uygulamalarda temel mekanizma; hücre zarında uygulaması yapılan maddenin bor ile yarışa girmesi ya da dolaylı olarak bor toksisitesinin sebep olduğu oksidatif zararın bu uygulamayla azaltılması esasına dayanmaktadır. Literatürde, bor ile ilişkili yapılan birçok çalışma bu ve benzeri mekanizmalarla ilişkilidir.

Bu tez kapsamında, iki farklı toksik bor konsantrasyonunda tuz ön uygulamalı ve uygulamasız grupların toprak üstü dokularındaki bor, sodyum, potasyum ve klor birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.6-4.7A, B ve C). Bor konsantrasyonunun artışına bağlı olarak toksisite semptomlarının ve dokulardaki bor birikiminin arttığı, tuz ön uygulaması yapılan gruplarda ise bu birikimin ve toksisite semptomlarının azaldığı tespit edilmiştir. Tuz ön uygulaması yapılan gruplarda sodyum ve klor

birikiminin diğerk gruplara göre önemli düzeyde artış göstermesi, bu gruplara verilen tuzun alındığını ve biriktiğini göstermektedir (Şekil 4.7A ve C). Ayrıca, bor toksisitesi sürgünlerdeki bor birikimi, K⁺ alımının azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.7B). Bitkiye kökleri vasıtasıyla alınan B elementi hücreye kısmen lipid tabakasından pasif difüzyon yoluyla girebildiği gibi, kısmen de protein kanalları ve aquaporinler vasıtasıyla girebilmektedir (Pereira ve ark., 2021). Ayrıca bor elementinin kökten yaprak uçlarına kadar taşınımı; hem ksilem boyunca transpirasyon akımı ile, hem de floem üzerinden polioller -şeker alkoller- ile kompleks oluşturarak gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Landi ve ark., 2019; Brdar-Jokanović, 2020; Pereira ve ark., 2021). Arabidopsis bitkisinde bor alımının artarken K⁺ alımının azalması, rizosferde K⁺ ile bor elementinin rekabet etmesi ve bor elementinin K⁺'un kökten sürgüne translakosyonunun olumsuz etkilenmesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Sarafi, Chatzissavvidis ve Therios, 2017). Bunun yanında, tuz ön uygulamasına maruz kalan bitkilerde, bor alımında rol oynayan aquaporinlerin işlevselliğinin azalması ile bitkilerde bor birikiminin sınırlandırılarak borun toksik etkisinin hafifletilebileceği bildirilmektedir (Martínez-Ballesta, Bastías ve Carvajal, 2008). Bazı bitkiler ile yapılan çalışmada; tuzluluk ve yüksek B konsantrasyonunun birlikte uygulanmasının, dayanıklı genotipte B ve Na⁺ arasındaki alım yolunda oluşan rekabet nedeniyle tuzun olumsuz etkilerinin azaltıldığı bildirilmiştir (Alpaslan ve Güneş, 2001; Eraslan, Savaşurk ve Güneş, 2007; Bañón ve ark., 2012). Tez kapsamında elde edilen bulgular, Na⁺ ve B elementinin alımında ve taşınımında bir yarışın olmadığını, ön tuz uygulaması ile B alımının düzenlenerek, sınırlandırıldığını ve böylece B toksisitesinin olumsuz etkilerinin hafifletildiğini düşündürmektedir. Tuz ön uygulamalarında K⁺ içeriğinin azalmasının nedeni Na ve K arasındaki antogonistik etkileşim ile ilişkili olabilir (Lee ve ark., 2006).

Bitkilerde yüksek verim göstergesine katkı sağlayan parametreler yaprak yüzey alanı, yaş ve kuru kütledeki değişimlerdir. Bu parametreler incelendiğinde, yaprak yüzey alanı artan bor toksisitesinde önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.2). Ancak tuz ön uygulaması yapılan gruplarda bu azalış, her iki toksisite düzeyinde de hafifletilmiştir. Aynı örüntü bitkilerin yaş ve kuru ağırlığı incelendiğinde de görülmüş, tuz ön uygulamasının toksik bor düzeyinin olumsuz etkilerini

iyileştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3 - 4.4 - 4.5). Benzer sonuçlar ayçiçeği ile yapılan çalışmada da gösterilmiştir (Ekmekçi ve ark., 2020).

Bor toksisitesinin hedeflerinden biri de membranlar olup, toksisiteye bağlı olarak oluşan peroksidasyonlar membran geçirgenliğinde bozulmalara neden olur (Hua ve ark., 2021). MDA, çoklu doymamış yağ asiti hidroksiperoksitlerinin bozunması ile ortaya çıkan ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir belirteçtir (Petridis ve ark., 2012). *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde MDA birikimi, bor toksisitesinin artışa bağlı olarak önemli düzeyde (yaklaşık 2.5 - 3.5 kat) artmıştır (Şekil 4.8). Tuz ön uygulaması ile MDA içeriğindeki artış bor uygulamalarına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, ön uygulama ile muhtemelen membranlarda oluşan hasarların giderilebilmesi için gerekli fosfolipid yenilenme mekanizmasının devreye sokularak membran bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir.

Birçok abiyotik stres faktörü gibi B toksisitesi de bitkilerin fotosentetik aktivitesini doğrudan veya dolaylı yönden etkilemektedir. Fotosentezdeki bu olumsuz etkilenme klorofil a floresans kinetiğindeki değişimler ile ortaya konulmuştur. Polifazik klorofil a floresans geçişleri (OJIP), JIP testi kullanılarak fotosentetik akışlar hakkında ayrıntılı bilgi sağlamakta böylece bitkilerde stresin neden olduğu değişiklikleri ortaya koymakta bir araç olarak kullanılmaktadır (Oukarroum ve ark., 2007; Kalaji ve ark., 2016). Tipik OJIP eğrisi (Kautsky eğrisi), O-J, J-I ve I-P olmak üzere üç ana faza sahiptir. Fotosistemlerin redoks durumundaki değişiklikleri temsil eden bu fazlar, çevresel streslere karşı oldukça duyarlıdır (Strasser, Tsimilli-Michael ve Srivastava, 2004; Umar, Uddin ve Siddiqui, 2019). OJIP eğrisi, *Arabidopsis* bitkisinde toksik B düzeylerinin floresans geçişlerini etkilediği ve tuz ön uygulamasının B toksisitesinin etkisini iyileştirdiğini göstermektedir (Şekil 4.9A). Tüm uygulamalarda bitkiler tipik OJIP polifazik yükselişi sergilemişlerdir. OJIP eğrisinin O-J fazı; fotosistem II (PSII)'nin primer elektron alıcısı Q_A 'nın indirgenme durumunu yansıtır, anten boyutu hakkında bilgi verir ve ışık bağımlı fotokimyasal bir fazdır. Uygulamalarda O basamağındaki önemsiz değişimler, anten komplekslerinden reaksiyon merkezlerine enerji kaybının çok az ya da olmadığını göstermektedir. O-J fazında kontrole göre özellikle 5mM B konsantrasyonunda daha yüksek oluşu, Q_A 'ın reoksidasyonunda bir problem olduğunu göstermektedir (Şekil 4.9B). Eğrinin bir

sonraki J-I fazı; plastokinon havuzunun indirgeme durumu ile ilişkilidir. J basamağındaki artış, elektronların sonraki basamaklara aktarımında sorun olduğunu ve indirgenmiş PQ'nun birikimini göstermektedir (Kalaji ve ark., 2014). Fotokimyasal etkinlik analiz sonuçlarına göre, model bitkide B toksisitesinin J-I fazında neden olduğu olumsuz etkilenme, I-P fazında daha da belirgin ortaya çıkmıştır (Şekil 4.9D). Tüm uygulamalarda I-P fazının yükselişindeki ve dolayısıyla genliğindeki düşüş, kontrole göre önemli bulunmuştur (Şekil 4.9D). I-P genliğindeki düşüşün, 5mM B toksisitesinde diğer uygulamalara göre, daha dramatik olduğu ancak, tuz ön uygulaması ile bu olumsuz etkinin 3mM B toksisitesi düzeyine kadar hafifletildiği görülmektedir (Şekil 4.9D). Genlikteki azalma PSI'e doğru olan elektron aktarımında bir problem olduğunu düşündürmektedir. I-P fazının PSI'in akseptör (alıcı) tarafındaki indirgenme oranını gösterdiği gibi, PSI'in reaksiyon merkezinin (RC) miktarı ile de ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ceppi ve ark., 2012; Goltsev ve ark., 2016; Ripoll ve ark., 2016; Kalaji ve ark., 2018). Bunun yanı sıra, B toksisitesi altında I-P genliğindeki azalma; plastosiyanın ve P700⁺ 'nın yeniden indirgenmesi, siklik elektron taşınımı boyunca elektron aktarımının azalması, PSI son elektron alıcılarına doğru elektron transfer etkinliğinin azalması veya PSI kompleksinin miktarındaki azalmaya bağlı olarak PSI'nin alıcı tarafındaki inhibisyonu yansıtabileceği ileri sürülmektedir (Kalaji ve ark., 2016).

Tilakoid membranlarda enerji akışları teorisine dayanan JIP testi hesaplamalarına göre model bitki Arabidopsis'te PSII'nin RC başına hesaplanan spesifik enerji akışları, tuz ön uygulamalı veya uygulamaz B toksisitesinden etkilenmiştir (Şekil 4.10): Spesifik enerji akışı parametrelerinden reaksiyon merkezi başına, absorbe edilen veya ortalama anten büyüklüğünü (ABS/RC), yakalanan enerji akışı (TR_o/RC) ve elektron transportu (ET_o/RC) ile fotokimya dışında ısı şeklinde kaybedilen enerji (DI_o/RC) B toksisitesine bağlı olarak önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.10). Bu değişimler bitkilerde, enerji absorpsiyonu, transferi ve kaybının B toksisitesinden önemli düzeyde etkilendiğini, tuz ön uygulaması ile bu etkinin hafifletildiğini göstermektedir. B uygulamalarının artışına bağlı olarak ET_o/RC, RE_o/RC ve ϕ_{EO} değerlerinde belirlenen değişimler, B stresi altında yakalanan uyarılma enerjisinin elektron transportunda etkin bir şekilde kullanılmadığı ve durumun kuantum verimini olumsuz etkilediğini

göstermektedir (Şekil 4.10-11). Bitkilerde oksijen oluşturan kompleksin (OEC) inaktivasyonunu ve olası hasarını belirten V_K/V_J değeri B toksisitesinin artışına bağlı olarak artmıştır (yaklaşık %13-%26) ve bu artış OEC'deki hasar ile birlikte PSII donör kısmındaki etkilenmeyi ifade etmektedir. V_K/V_J değerinin aksine; PSII/PSI oranını yansıtan (Ceppi ve ark., 2012; Umar, Uddin ve Siddiqui, 2019) ΔV_{IP} değeri önemli düzeyde azalmıştır. Ayrıca ΔV_{IP} , I-P faz genliğinin boyutu, ferredoksin ve NADP'nin indirgendiği PS I'in çevresindeki elektron transport etkinliğini hakkında da bilgi verir. Bu sonuçlar, PSI'in etkilendiğini bloke ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, B toksisitesi yakalanan enerjinin fotokimyadan çok, ısı olarak kaybedildiği (D_{I_0}/RC 'de artış) ve fotokimyasal kuantum veriminin [ϕ_{DO} (F_0/F_M)'de artış] azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.10-11). Fotokimyasal olmayan yatıştırma OEC etkinliğindeki azalma ile ilişkili olabilir (Sun ve ark., 2016). Muhtemelen, toksik B koşullarında PSII'nin çok fazla inaktif reaksiyon merkezine sahip olması ve PSII alıcı bölgesinin bloklanması nedeni ile OEC'den gelen fazla elektronları kabul edememektedir. Bu durum fenomolojik enerji akışları ile de tutarlıdır (Şekil 4.13). Ayrıca RC/CSO'nun toksik bor düzeylerindeki dramatik azalışı Q_A 'yi redükte eden reaksiyon merkezlerinin yoğunluğunun azaldığını göstermektedir (Şekil 4.11). $SFI_{(abs)}$ değerindeki azalma ise PSII'de yapısal ve fonksiyonel hasarın olduğunu göstermektedir. B toksisitesinin fotosistemlerde oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel inhibisyon tuz ön uygulaması ile iyileştirilerek, bitkilerde bor tolerans kazanımı sağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

Bor toksisitesi altında *Arabidopsis thaliana*'da fotosentetik performans indeksleri (PI'leri - PI_{ABS} ve PI_{TOT}) ve bileşenleri toksisitenin şiddetine bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.12). Tuz ön uygulaması ile de artan bor toksisitesinin PI'leri ve bileşenleri üzerindeki olumsuz etkisi hafifletilerek, model bitkinin toksisiteye karşı fotosentetik etkinlik açısından bir tolerans kazanımı sağlanabildiği canlılığı ortaya koyan bu önemli parametre ve bileşenleri ile de doğrulanmaktadır.

Bor toksisitesinin PS II'deki fenomolojik enerji akışları üzerine etkileri değerlendirilmiş ve enerji akışlarında da önemli değişimlerin olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13). Birim yaprak alanı bazında hesaplanan tüm parametrelerde

(ET_0/CS_0 hariç) önemli düzeyde artış kaybedilmiştir. Fenomolojik akışlardaki bu değişimler, artan B toksisitesi bitkilerin birim yaprak alanı başına aktif reaksiyon merkezlerini uyarılma enerjisini ısı enerjisi şeklinde yayacak havuzlar olan inaktif reaksiyon merkezlerine dönüştürdüğüünün bir göstergesidir.

JIP test analizlerinden elde edilen bu bulgular, B toksisitesi altındaki bitkilerin fotokimyasal etkinliğindeki azalışın, aktif reaksiyon merkezindeki azalış ve enerjinin ısı şeklinde kaybı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca B toksisitesi her iki fotosistemde olumsuz etkilediği ve PSI 'in PSII'ye göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Model bitkide B toksisitesinin neden olduğu bu etkilenmenin fotosentetik etkinliği durduracak (fotoinhisyon) düzeyde olmadığı ve tuz ön uygulaması ile hafifletilebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular MDA sonuçları ve biyokütlerdeki değişim ile de uyumludur.

Yüksek bitkilerde ışık enerjisini yakalayan ve fotosentetik pigment grubunu oluşturan klorofiller, fotosistemlerin hem ışık toplayıcı anten komplekslerinde hem de reaksiyon merkezinde bulunurlar (Scott, 2011). Bor toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yapraklarında toplam klorofil a+b içeriğinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bununla birlikte, klorofil pigment miktarındaki bu azalış klorozise yol açmıştır (Şekil 4.1). Stres koşulları altında klorofil içeriğindeki azalma; tilakoid membranlarda oluşan hasarlara bağlı olarak fotosentez aktivitesindeki azalmalarla ilişkili olabileceği (Şekil 4.9; Şekil 4.13) gibi pigmentlerin fotooksidasyonu veya klorofil yıkımındaki artış ile de bağlantılı olabilir (Ekmekçi ve ark., 2020). Toplam klorofil içeriğinin yanı sıra, B toksisitesine bağlı olarak *Arabidopsis* bitkilerinde klorofil a/b oranı da önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.15). Işık toplayıcı komplekste klorofil moleküllerinin miktarında birbirlerine göre değişimi gösteren klorofil a/b oranı (Reed ve ark., 2012), PSI ve PSII'deki anten boyutu hakkında bilgi veren iyi bir indikatör olup, klorofil a ve b içeriğine bağlı olarak değişmektedir (Çiçek ve Çakırlar, 2008). Işık toplayıcı anten komplekslerinde her iki klorofil pigmentleri (a ve b) bulunurken, reaksiyon merkezinde ise sadece klorofil a yer alır ve buna bağlı olarak daha küçük bir klorofil a/b oranı, daha büyük anten boyutuna; daha yüksek bir oran ise daha küçük anten boyutuna işaret etmektedir. Klorofil a/b oranında bu bulgular, fotosentetik parametrelerden olan ve anten boyutundaki değişim hakkında da

bilgi veren ABS/RC değerleri ile uyumludur (Şekil 4.10). Ayrıca, tuz ön uygulamasına maruz kalan Arabidopsis bitkilerinde sadece PT-3B'da 3B'a göre azalışların anlamlı olduğu ve buna göre toplam klorofil miktarı %11, klorofil a/b oranı ise %6 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14-15). Pigment içeriğinin tuz ön uygulaması yapılan bitkiler ile sadece B toksisitesine maruz kalan bitkilerde benzer yöndeki değişimi, her iki uygulamada da ışığın absorpsiyonunu azaltacak fotokoruyucu bir mekanizmanın devreye girmesinin de göstergesi olabilir (Liu ve ark., 2011; Koffler ve ark., 2014). Uygulamalarda hem anten hem de reaksiyon merkezi pigmentlerinde azalma olması ile birlikte mevcut pigment miktarı fotosentetik aktivitenin devamlılığını mümkün kılmıştır. Klorofil a fluoresans analizleri de bu sonucu desteklemektedir.

Fotosentetik pigment ve sistemlerin bir diğer grubunu oluşturan karotenoidler, pigment-protein komplekslerinin stabilizasyonunu sağlama, aşırı ışık enerjisini termal ısı şeklinde yayarak oluşabilecek aktif oksijen türlerine (AOT) karşı fotosentetik aparatları korumada rol oynarlar (Dankov ve ark., 2009). Arabidopsis bitkilerinde B toksistesine bağlı olarak toplam karotenoid miktarını önemli oranda azalmıştır. Tuz ön uygulamasında ise Arabidopsis bitkilerinde karotenoid içeriğinde önemli bir iyileştirme sağlamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Fotosentetik pigmentlerde stres koşulları altında birbirleri ile uyumlu sonuçlar elde edilmesi, klorofil pigmentleri ile karotenoidlerin fotosistemlerin anten kompleksleri ile reaksiyon merkezlerinde birbirleri ile iş birliği içinde olduğunu göstermektedir.

Aktif oksijen türlerinden (AOT) biri olan hidrojen peroksit (H_2O_2), O_2 'nin elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan O_2 'den kendiliğinden veya SOD enziminin katalizlediği reaksiyon sonucunda açığa çıkar. Diğer ROS'lara göre daha kararlı olan H_2O_2 , yüksek konsantrasyonlarda toksik bir molekül olarak rol oynarken, düşük konsantrasyonlarda sinyal molekülü olarak da işlev görür (Fedina, Nedeva ve Çiçek, 2009; Blokhina ve Fagerstedt, 2010). B toksisitesine bağlı olarak bitkilerde H_2O_2 miktarı anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 4.17). Ayrıca, tuz ön uygulamaları ile H_2O_2 miktarında B toksisitesinin neden olabileceği olumsuz etkiyi yaklaşık %25 civarında hafiflettiği tespit edilmiştir. Bu sonuca göre tuz ön

uygulamasý ile H₂O₂ miktarlarýndaki artýþýn daha dýþük olması ise bu molekülün toksik etkiden ziyade hücreyel sinyallerde görev aldýðýnýn göstergesi olabilir. Antosiyanin, bitkilerde suda çözünelir fotosentetik olmayan pigmentlerden olan flavonoid polifenolik bileþikler grubunda yer alır. Antosiyanin ve flavonoidler, antioksidan görevi görür ve fotosentetik aparatý, optik filtreler gibi iþlev görerek yüksek enerji akýþýlarının neden olduðu hasarlardan korurlar (Baskar, Venkatesh ve Ramalingam, 2018; Stetsenko ve ark., 2020). Ayrıca, flavonoidler ROS üretimini tetikleyen geçiþ metal iyonlarını þelatlayarak metal stresine karþý bitki savunmasını artırabilir (Khalid ve ark., 2019). Arabidopsis bitkisinin B stresi altında antosiyanin sentez mekanizmasını yeterli düzeyde aktifleþtiremediðini, ancak tuz ön uygulamasý ile de bu engeli aþarak antosiyanin pigmentinin miktarýnı bor toksisitesine göre %50 den daha fazla oranda artırabildiðini göstermektedir (Þekil 4.18). B toksisitesi altında Arabidopsis bitkilerinde flavonoid içeriði de antosiyanin ile uyumlu sonuçlar vermiþtir (Þekil 4.19). Arabidopsis bitkisinde bor toksisitesi ile kıyaslandýðında tuz ön uygulamasında flavonoid ve antosiyanin gibi pigmentlerin sentezlerindeki artýþ, bu moleküllerin B toksisitesinin neden olabileceði hasarlara karþý savunmada rol oynadýðýnýn bir göstergesi olabilir.

Guaiakol peroksidaz (POD), Askorbat peroksidaz (APX), Glutasyon redüktaz (GR) ve Glutasyon S transferaz (GST)'dan oluþan metaloid toksisitesini bertaraf eden antioksidan ađ, stres koþullarında sentezi artan ve toksik bir yan ürünü olan H₂O₂'nin detoksifikasyonunda dođrudan/dolaylý olarak önemli bir rol oynar (Kumar ve ark., 2017). Asada-Halliwell (askorbat-glutasyon) yolunda yer alan APX ile GR enzim aktiviteleri bulguları bu yolun etkinliðinin bor toksisitesi altında azaldýðýný, tuz ön uygulamasý ile borun toksik etkisinin üstesinden gelindiðini göstermektedir (Þekil 4.20 ve 4.21). Hem bor toksisitesinde kontrole, hem de tuz ön uygulamalarında bor toksisitesine göre POD enzim aktivitesi önemli düzeyde artmýþtir (Þekil 4.22). Bununla birlikte, H₂O₂'in detoksifikasyonu esnasında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyona (GSSG) dönüþümünü katalize eden GST enzim aktivitesi kontrole göre 3B'da %39 oranında artarken, 5B'da %45 oranında azalmýþtir (Þekil 4.23). Tuz ön uygulamalarında ise GST aktivitesi B uygulamalarına göre önemli oranda artmýþtir. GST enzim aktivitesinde bu deðiþim, 3B toksisitesi altında 5B'a göre enzim aktivitesinin artýþý ile Arabidopsis bitkisinde H₂O₂ detoksifikasyonunda daha etkin rol oynayabildiði görülmektedir.

Tüm antioksidan enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, bor toksisitesi koşullarında sentezi artan H₂O₂'in detoksifikasyonunda en etkin enzimin POD olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ön uygulamalarda POD, APX, GR ve GST enzimlerin aktivitelerinin anlamlı düzeyde artması ve tuz ön uygulaması ile bor toksisitesinin savunma sistemleri üzerindeki sınırlandırıcı etkisinin özellikle düşük bor düzeyinde azaltılabildiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, H₂O₂ miktarının tuz ön uygulamasında bor toksisitesine göre anlamlı düzeyde düşük olması, antioksidan savunma sistemlerinde görev alan enzimlerin ROT detoksifikasyonunda etkin bir şekilde görev aldığını göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, toksik B koşullarında bitkilerin dokularındaki B miktarını azaltabilmek için B-antosiyenin komplekslerini oluşturup, vakuolde biriktirerek B tolerans kazanımının sağlanabildiği bildirilmiştir (Landi Tattini ve Gould, 2015). Ayrıca, GST ve GSH'ın da vakuolar B-antosiyenin kompleksinin birikimine katkı sağlayabildiği ileri sürülmüştür (Petruşa ve ark., 2013). Antosiyeninler sitozolde GSH ile tek başlarına ya da GST aktivitesi ile geçici olarak metal veya metaloidi iyonlarla glutatyonilantosiyenin-metal (ya da metaloid) bağlanarak kompleksler oluşturur (Landi Tattini ve Gould, 2015). Bu nedenle, GSH-noksan mutant Arabidopsisler farklı metallere aşırı duyarlılık gösterirler (Vernoux ve ark., 2000). Bu çalışmada tuz ön uygulamalı B grupları (PT-3B ve PT-5B), kontrol gruplarına ve tuz ön uygulaması yapılmayan gruplara göre, önemli düzeyde antosiyenin birikimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.18). B toksisitesiyle karşılaşmadan önce belli bir konsantrasyonda (40mM) tuz ile karşılaşan bitkiler antosiyenin üretimlerini artırmıştır (Kim ve ark., 2017). Bu tez kapsamında bu antosiyenin artışının transkripsiyonel regülasyonu, antosiyenin biyosentez genlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin ifade seviyelerindeki değişim araştırılmıştır.

Antosiyenin biyosentezi fenilalanin (Phe) ile başlar. Genel olarak, fenilpropanoid yolağının başlangıcı, flavonoid yolağının ilk adımları ve geç antosiyenin yolağı olarak üç fazda fenilalaninden antosiyenin sentezi sağlanmaktadır. *PAL*, *C4H* ve *4CL3* fenilalaninin sırayla sinnamik aside, kumarik aside ve 4-kumaroil-CoA'ya çevrilmesini sağlayarak antosiyenin sentezinin ilk basamağını oluştururlar (Shi ve Xie, 2014). *PAL* aktivitesi, bitkilerde çevresel strese karşı bir yanıt olarak kabul

edilmektedir (Dixon ve Paiva, 1995). *PAL2* geninin ifadesi ön uygulamalı B grubunda (PT-3B) anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.25). Fakat bu artışın artan toksik etkiyle azaldığı görülmüştür. Buna karşın, arpa bitkisiyle yapılan çalışmada *PAL* geni ifadesi 5 mM B ve 10 mM B'da anlamlı seviyede arttığı bildirilmiştir (Öz ve ark., 2009). Arabidopsis bitkisinde toksisitenin artmasıyla *PAL* ifadesinin azalması, *PAL* aktivitesinin post-translasyonel mekanizmalar ile karmaşık şekilde düzenleniyor olmasıyla ilgili olabilir. Çünkü hücresel *PAL* seviyesi çevresel faktörlere yanıtta geçici olarak artar ve sonra hızlı bir şekilde bazal seviyeye geri döner (Shields, Wingate, and Lamb, 1982; Jones, 1984). Ayrıca, yüksek miktarda oluşan biyosentez ara ürünleri *PAL* aktivitesi ve ifadesindeki hızlı düşüşü tetikleyebilir (Bubna ve ark., 2011). Bir sonraki basamakta yer alan *C4H* sinamik asidin kumarik aside dönüşümünde görev alır. *PAL* aktivasyonu ne kadar fazla ise *C4H* substratının artmasını, dolayısıyla *C4H* aktivasyonunun da artması beklenir. Bu iki genin birbirini regüle ettiği bildirilmiştir (Blount ve ark., 2000). Deneyler sonucunda *C4H* gen ifadesinde kontrole göre stres ve iyileştirici gruplarda artış görülse de tuz ön uygulamalı ve uygulamasız B grupları arasında artmış ancak bu artış anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.26). Muhtemelen ifadedeki bu artış bu basamağın regülasyonu için olmuş olabilir. Kumarik asidin kumaroil-Co-A'ya çevrilmesinden sorumlu olan *4CL3* geninin ifadesi kontrole göre bütün gruplarda anlamlı artmış, bu artışın ön uygulamalı 3B (PT-3B) grubunda oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.27). Benzer şekilde arpa ve Arabidopsis ile yapılan bor toksisitesi çalışmalarında da *4CL3* geninin ifadesinin yüksek seviyelerde ifade olduğu saptanmıştır (Öz ve ark., 2009; Kayıhan, 2021). Flavonoid yolağı ile ilişkili olduğu bildirilen *4CL3* gen ifadesinin (Ehltling ve ark., 1999) şiddetli B toksisitesinde dikkate değer bir şekilde artması, flavonoid yolağının da uyarıldığını açıkça göstermektedir. Ayrıca *4CL3* genlerinin ifadesinin tuz stresi altında arttığı ve çevresel streslere toleransta rol oynadığı hem Arabidopsis bitkisinde hem de kayın ağaçlarında gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015; Chun ve ark., 2019). Tuz ön uygulamalarında *4CL3* geninin artışı, tuzun önceden flavonoid yolağını uyarmasıyla sonradan karşılaşılan B toksisitesine karşı tolerans kazanımında cevap rolü üstleniyor olabilir. Ön uygulamalı gruplardaki yüksek flavonoid birikimi de bu sonucu desteklediği görülmektedir (Şekil 4.19).

Antosiyanin biyosentezi öncelikle transkript düzeyinde düzenlenir ve R2R3-MYB, bHLH gibi transkripsiyon faktörleri ve bunların etkileşimleri esas olarak antosiyanin yapısal genlerinin ifade modellerini, bu genlerin promotöründe spesifik cis etkili elementleri bağlayarak belirler (Koes Verweij ve Quattrocchio, 2005; Lang ve ark., 2010). *MYB75*, *MYB114*, *MYBD* ve *TT8*, *ANS* (antosiyanidin sentaz) gibi geç biyosentez genlerinin ifade seviyesini düzenleyerek antosiyanin sentezini artırır (Gonzalez ve ark., 2008; Dubos ve ark., 2010). *MYB75*, *MYB114* ifadeleri, 3B ve PT-3B gruplarında en yüksek seviyede ifade edilirken, toksisite seviyesi yükseldikçe ifadenin biraz azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.28-29). *MYBD* de benzer bir örüntü gösterirken *TT8* genin ifadesindeki değişim anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.30-31). Stres altında transkripsiyon faktörlerinin ifadelerindeki bu artışa rağmen, ilginç bir şekilde *ANS* geninin ifade seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.32). Bunun sebebi transkripsiyon faktörlerinin dinamik regülasyonu ve *ANS* gibi genlerin B toksisitesi altında antosiyanin biyosentezi için post-translasyonel düzenlemelere gereksinimi olabilir. Çünkü antosiyaninlerin üretimi mekânsal-zamansal olarak sıkı bir şekilde düzenlenir (Gou ve ark., 2011). Ayrıca, bu durum bitkilerde antosiyanin biyosentezinin ve taşınmasının karmaşık regülasyon mekanizmaları ile de ilgili olabilir. Yapılan bazı çalışmalar antosiyanin seviyelerinde değişiklik olmaksızın antosiyaninle dolu vakuolar yapılarda çarpıcı bir artış olduğu bildirilmiştir (Poustka ve ark., 2007). Tez bulgularında antosiyanin miktarındaki önemli artış bu durumu desteklemektedir (Şekil 4.18).

Landi, Tattini ve Gould (2015) B-antosiyanin komplekslerinin vakuollerde birikmesinin, B toksisitesine karşı bir tolerans mekanizması olduğunu öne sürmüşlerdir. Buna göre, antosiyanin-GSH ve/veya GST-antosiyanin kompleksleri metal ya da metaloid iyonlarına geçici olarak bağlanabilir ve vakuolde biriktirilerek sitozol içerisindeki serbest metal/metaloid miktarı düşürülerek oksidatif hasarın önüne geçilebilir. *GHS1* geninin ifadesi B toksisitesi uygulamalarında kontrole göre önemli düzeyde artarken tuz ön uygulamalı gruplardan ise sadece PT-5B'da 5B a göre artmıştır (Şekil 4.33). Bunun yanı sıra *GST26* geninin ifadesi ise tuz ön uygulamalı B uygulamalarına göre anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 4.34). *GST26* ifadesi değişimi bitkilerin B stresine karşılaşmadan önce düşük miktarda tuz ile karşılaşması GST sistemlerini

önceden uyarıyor olabilir. GST enzim aktivitesi sonuçları da ifade artışlarını destekler yönde bulunmuştur (Şekil 4.23). Aynı şekilde Kayıhan Kayıhan ve Ciftçi, (2019) yaptıkları çalışmada B toksisitesinin *GST* ve *GSH* genlerinin ifadelerinin arttığını bildirmişlerdir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemiz ve dünya toprakları, ya doğal süreçlerle ya da aşırı gübreleme ve fazla miktarda bor içeren su ile sulama sonucu bor toksisitesi ile karşı karşıyadır. Yüksek bor içeren bu topraklarda yetişen bitkilerde, bor alımı ve birikimine bağlı olarak, toksik bor düzeyleri hücrelerde fizyolojik, metabolik ve biyokimyasal değişimlere yol açarak bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Toksik bor düzeylerine maruz kalan bitkilerde fotosentetik etkinliği devam ettirebilme yeteneği bitkilerin toleransında önemli etkenlerden biridir. Bitkilerin bor toksisitesine verdikleri cevaplar veya tolerans durumları bitkiden bitkiye, türden türe hatta aynı türün çeşitlerinde bile farklılık gösterebilmektedir. Çeşitli bitkilerle yapılan çalışmalarda; bitkinin kritik seviyenin üzerindeki boru hücre içine alımını sınırlandırmasıyla bor tolerans kazanımını gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda, bor toleranslı genotiplerin daha az bor biriktirdikleri ortaya konulmuştur. Böylece, bitkinin bor toleransında bor alımını sınırlamadan ziyade, bor atım mekanizmasının daha etkin olduğu önerilmiştir. Bunun yanı sıra, doğal koşullarda bor akümülatörü özelliği olmayan bitkilerin, bor toksisitesine dayanıklılığını artırmak için, bazı ön uygulamalar yapılarak bitkiler uyumlandırılıp, bor toksisitesinin olumsuz etkilerine karşı toleranslı hale gelmeleri sağlanabilmektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde;

- Tuz ön uygulamasından (40 mM NaCl) sonra toksik bor düzeylerine maruz kalan model bitki Arabidopsis'in, doğrudan toksik bor koşullarındakilere göre daha toleranslı bir fenotip sergiledikleri ve daha az bor akümüle ettikleri belirlenmiştir. Toksik bor düzeylerinin olumsuz etkisi, tuz ön uygulaması ile hafifletildiği ortaya konulmuştur.
- Bitkiler kökleriyle aldığı bor elementini, sürgünlerine taşıdığı ve konsantrasyonunun artışına bağlı olarak toksisite semptomlarının ve dokulardaki bor birikiminin arttığı, tuz ön uygulaması yapılan gruplarda ise, bu birikimin ve toksisite semptomlarının azaldığı tespit edilmiştir. Sürgüne transfer edilen toksik bor düzeyleri, yaprakların fotosentetik aparatlarını ve fonksiyonelliklerini olumsuz yönde etkilemiştir. JIP test analizlerinden elde edilen bu bulgular, B toksisitesi

altındaki bitkilerin fotokimyasal etkinliğindeki azalışın, aktif reaksiyon merkezindeki azalış ve enerjinin ısı şeklinde kaybı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca B toksisitesinin her iki fotosistemi de olumsuz etkilediği ve PSI'in PSII'ye göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Model bitkide B toksisitesinin neden olduğu bu etkilenmenin fotosentetik etkinliği durduracak (kronik fotoinhisyon) düzeyde olmadığı ve tuz ön uygulaması ile hafifletilebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, MDA sonuçları ve biyokütledeki değişim ile de uyumludur.

- Toksik düzeylerde bor birikimi sonucunda üretilen bir reaktif oksijen türlerine karşı, bitkilerin oluşturduğu savunma stratejilerinden biri de antioksidant savunma sistemidir. Toksik bor konsantrasyonlarının oluşturduğu oksidatif hasar ürününden biri olan H₂O₂'i bertaraf etmede özellikle POD'in yer aldığını aktivitesindeki artış açıkça göstermektedir. Ayrıca GST, antosiyanin ve flavonoid aktivitelerindeki artışlar da B toksisitesine karşı oluşturulan tolerans kazanımında yer almış olabileceğine işaret etmektedir.
- Antosiyanin birikiminde, tuz ön uygulaması ve sonrasında toksik bor düzeylerine maruz kalan bitkilerde oldukça belirgin bir artış saptanmıştır. Genel olarak, fenilpropanoid yolağının başlangıcı, flavonoid yolağının ilk basamakları ve geç antosiyanin yolağı olarak üç evrede fenilalaninden, antosiyanin sentezi gerçekleşmektedir. Ön tuz uygulaması ile toksik B düzeyleri (özellikle 3mM B düzeyi) *Arabidopsis*'ta antosiyanin sentez yolağında yer alan bazı transkripsiyon faktörleri ve genlerinin ifadeleri indüklenmiş ve kısmende koordineli bir şekilde düzenlendiği tespit edilmiştir. Bitkilerde başlangıç ve erken evrelerinde bu geçici düzenlemeden sonra, özellikle 3 mMB toksisitesi altında antosiyanin transkripsiyon faktörlerindeki artışlar, esas olarak antosiyaninlerin vakuolar sekresyonu dahil olmak üzere geç antosiyanin işlemlerini düzenleyebileceği ve bu da B-antosiyanin komplekslerinin vakuollere taşınarak depolandığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, tuz ön uygulamalı B toksisitesine maruz kalan *Arabidopsis thaliana*'da antosiyanin biyosentezi ile ilgili genlerin transkripsiyonel regülasyonunun ve transkripsiyon faktörlerinin ve ayrıca *GSH* ve *GST* gen ifadelerindeki değişim, *Arabidopsis thaliana*'da antosiyanin içeriğindeki artışa, bu

artış da antosiyaninin B-şelatlayıcı rolünü indükleyerek, B toksisitesinin etkisini hafifletmede rolü olabileceğini göstermektedir.

Öneriler;

Bu tez çıktıları, tuz ön uygulaması ile bor tolerans kazanımının sağlandığı model bitkide ortaya konulmuştur. Bu durumda ekimden önce tohumlara tuz kaplama işlemi yapılarak (priming işlemi) bor konsantrasyonunun çok yüksek olduğu bölgelerin ve/veya bor madenlerine yakın tarımsal alanların değerlendirmesi mümkün olabilir.

Arabidopsis sürgünlerinde B'un yüksek oranda birikimi, mor bitkilerin (antosiyanin sentezini indükleyen bitkilerin) fitoremediasyonda kullanılma potansiyeli açısından değerlendirilebileceğini önerilmekteyiz.

Yapılacak daha ileri çalışmalarla model bitki Arabidopsis'te tuz ön uygulaması ile bor tolerans kazanımı ile ilişkili transkriptomik ve proteomik değişimler incelenebilir ve bunların toleranstaki rolü daha detaylı ortaya konulabilir. Ayrıca global skalada potansiyel değişen gen ve protein ekspresyonları ile etkin metabolik yollar aydınlatılabilir. Bu transkriptomik, proteomik ve cDNA transformasyon ve bunun gibi gelişmiş teknolojilerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilecek bilgiler, diğer çevresel stres (sıcaklık, kuraklık, tuz, metal kirliliği gibi) faktörlerine karşı toleransın kazandırılması ve/veya toleranslı tarımsal bitkilerin geliştirmesine yönelik, modern (biyoteknolojik) ve klasik ıslah çalışmalarına yön verici olabilir.

KAYNAKLAR

- Acar, Y.S., İşkil, R., and Erden, Y., Bor stresi altında *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi, *Journal of Boron*, 3(3), 145-150, **2018**.
- 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**.
- Ahammed, G.J., and Yang, Y., Anthocyanin-mediated arsenic tolerance in plants, *Environmental Pollution*, 292, 118-475, **2021**.
- Alpaslan, M., and 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**.
- 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**).
- Aquea, F., Federici, F., Moscoso, C., Vega, A., Jullian, P., Haseloff, J.I.M. and Arce-Johnson, P.A., Molecular framework for the inhibition of arabidopsis root growth in response to boron toxicity, *Plant, Cell & Environment*, 35(4), 719-734, **2012**.
- 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**.
- Arslan, Ö., Çulha Erdal, Ş., Balkan Nalçaiyi, A., Eyidoğan, F. And Ekmekçi, Y., Influence of supra optimal boron levels with salt pre treatment on antioxidant enzyme activities membrane damage and ion concentrations of two safflower cultivars, *Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, PRAG, Çek Cumhuriyeti*, 26 - 30 Haziran **2016**.
- Bañón, S., Miralles, J., Ochoa, J. And Sánchez-Blanco, M.J., The effect of salinity and high boron on growth, photosynthetic activity and mineral contents of two ornamental shrubs, *Horticultural Science*, 39(4), 188-194, **2012**.
- 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**.
- Baskar, V., Venkatesh, R. And Ramalingam, S., Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. *Antioxidants And Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, Gupta, D.K., Palma J.M., Corpas, F.J. (Eds.), Springer, Switzerland, 253-268, **2018**.
- Bastías, E., Fernández-García, N. And Carvajal, M., Aquaporin functionality in roots of *Zea mays* in relation to the interactive effects of boron and salinity, *Plant Biology*, 6(04), 415-421, **2004**.

- Bellaloui, N., Brown, P.H. and Dandekar, A.M., Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiology*, 119(2), 735-742, **1999**.
- Ben-Gal, A. and Shani, U., Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress, *Plant and Soil*, 247(2), 211-221, **2002**.
- 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**.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M., Boron in plant structure and function, *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 481-500, **1998**.
- Blokhina, O. and Fagerstedt, K.V., Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 447-462, **2010**.
- Blount, J.W., Korth, K.L., Masoud, S.A., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R.A., Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway, *Plant Physiology*, 122(1), 107-116, **2000**.
- 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 Hu, H., Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species, *Annals of Botany*, 77(5), 497-506, **1996**.
- Brown, P. H. and Shelp, B.J., Boron mobility in plants, *Plant and Soil*, 193(1), 85-101, **1997**.
- Brown, P. H., Bellaloui, N., Hu, H. and Dandekar, A., Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency, *Plant Physiology*, 119(1), 17-20, **1999**.
- Bubna, G.A., Lima, R.B., Zanardo, D.Y.L., Dos Santos, W.D., Ferrarese, M.D.L. L. and Ferrarese-Filho, O., Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*), *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1627-1633, **2011**.
- 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**.

- Camacho-Cristóbal, J.J., Martín-Rejano, E.M., Herrera-Rodríguez, M.B., Navarro-Gochicoa, M.T., Rexach, J. and González-Fontes, A., Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in *Arabidopsis* seedlings, *Journal of Experimental Botany*, 66(13), 3831-3840, **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**.
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Rosales, M.A., Rubio-Wilhelmi, M.M., Sánchez-Rodríguez, E., Romero, L. and Ruiz, J. M., Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants, *Plant Biology*, 11(5), 671-677, **2009**.
- 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**.
- Chen, M., Mishra, S., Heckathorn, S.A., Frantz, J.M. and Krause, C., Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis, *Journal of Plant Physiology*, 171(3-4), 235-242, **2014**.
- 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 & 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**.
- 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, 130-153 **2021**.
- Chun, H.J., Baek, D., Cho, H.M., Lee, S.H., Jin, B.J., Yun, D.J., Hong Y.-S. and Kim, M.C., Lignin biosynthesis genes play critical roles in the adaptation of *Arabidopsis* plants to high-salt stress. *Plant signaling & behavior*, 14(8), 1625697 **2019**.

Coşkun, Y., Olgunsoy, P., Karataş, N., Bulut, F. And Yarar, F., Mannitol application alleviates boron toxicity in wheat seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(7), 944-952, **2014**.

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**.

Çakmak, I. and Römheld, V., Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants, *Plant and Soil*, 193(1), 71-83, **1999**.

Çatav, Ş.S., Köşkeroğlu, S. and Tuna, A.L. Selenium supplementation mitigates boron toxicity induced growth inhibition and oxidative damage in pepper plants, *South African Journal of Botany*, 146, 375-382, **2022**.

Küçükakyüz, K. And Çatav, Ş.S. Physiological Effects of smoke-water and karrikinolide on wheat seedlings grown under boron stress, *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(3), 552-558, **2021**.

Çelikkol Akçay, U. and Erkan, I., 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**.

Çiçek, N. And Çakırlar, H., Effects of salt stress on some physiological and photosynthetic parameters at three different temperatures in six soya bean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(1), 34-46, **2008**.

Çiçek, N., Çakırlar, H. and Strasser, R.J., Arpa bitkisinde Ultraviyole-B stresinin fotosistem II etkinliği üzerine etkisi, *Anadolu University of Sciences & Technology-C: Life Sciences & 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**.

Davis, J.M., Sanders, D.C., Nelson, P.V., Lengnick, L. and Sperry, W.J., Boron improves growth, yield, quality, and nutrient content of tomato, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(3), 441-446, **2003**.

De Keyser, E., Dhooghe, E., Christiaens, A., Van Labeke, M.C. and Van Huylenbroeck, J., LED light quality intensifies leaf pigmentation in ornamental pot plants, *Scientia Horticulturae*, 253, 270-275, **2019**.

Dixon, R.A. and Paiva, N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *The Plant Cell*, 7(7), 1085 **1995**.

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**.

- Dordas, C. and Brown, P.H., Boron deficiency affects cell viability, phenolic leakage and oxidative burst in rose cell cultures, *Plant and Soil*, 268(1), 293-301, **2005**.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L., MYB transcription factors in *Arabidopsis*, *Trends in Plant Science*, 15(10), 573-581, **2010**.
- 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**.
- Ehltling, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. and Kombrink, E., Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms, *The Plant Journal*, 19(1), 9-20, **1999**.
- 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**.
- Eraslan, F., Inal, A., Savaşurk, O. and Guneş, A., Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity, *Scientia Horticulturae*, 114(1), 5-10, **2007**.
- Eraydin, E., Topraklarda bor absorpsiyonu üzerine bazı anyonların etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2000**.
- Esim, N. and 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**.
- Estelle, M.A. and Somerville, C.R., The mutants of *Arabidopsis*, *Trends in Genetics*, 2, 89-93, **1986**.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods in Enzymology*, 186, 407-421, **1990**.
- Estévez, L., Queizán, M., Mosquera, R.A., Guidi, L., Lo Piccolo, E. and Landi, M., First characterization of the formation of anthocyanin-Ge and anthocyanin-B complexes through UV-Vis spectroscopy and density functional theory quantum chemical calculations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1272-1282, **2021**.
- Fedina, I.S., Nedeva, D. and Çiçek, N., Pre-treatment with H₂O₂ induces salt tolerance in barley seedlings, *Biologia Plantarum*, 53(2), 321-324, **2009**.
- Feldmann, K.A. and Goff, S.A., The first plant genome sequence—*Arabidopsis thaliana*, *Advances in Botanical Research*, 69, 91-117, **2014**.

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**.

Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H., Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron, *Plant Science*, 168(2), 397-405, **2005**.

Giansoldati, V., Tassi, E., Morelli, E., Gabellieri, E., Pedron, F. and Barbafieri, 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**.

Gimeno, V., Simón, I., Nieves, M., Martínez, V., Cámara-Zapata, J.M., García, A. L. and García-Sánchez, F., The physiological and nutritional responses to an excess of boron by *Verna lemon* trees that were grafted on four contrasting rootstocks, *Trees*, 26(5), 1513-1526, **2012**.

Goldberg, S., Suarez, D.L. and Shouse, P.J., Influence of soil solution salinity on boron adsorption by soils, *Soil Science*, 173(6), 368-374, **2008**.

Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Bąba, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H and Allakhverdiev, S.I., Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus, *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(6), 869-893, **2016**.

Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J.M. and Lloyd, A.M., Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings, *The Plant Journal*, 53(5), 814-827, **2008**.

Gou, J.Y., Felippes, F.F., Liu, C.J., Weigel, D. and Wang, J.W., Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor, *The Plant Cell*, 23(4), 1512-1522, **2011**.

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**.

- Gupta, U.C., MacLeod, J. A. and Sterling, J.D.E. Effects of boron and nitrogen on grain yield and boron and nitrogen concentrations of barley and wheat, *Soil Science Society of America Journal*, 40(5), 723-726, **1976**.
- Güneş, A., Söylemezoğlu, G., İnal, A., Bağcı, E.G., Çoban, S. and Şahin, O. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity, *Scientia Horticulturae*, 110(3), 279-284, **2006**.
- Güneş, A., Gezgin, S., Kalinbacak, K., Özcan, H. and Çakmak, I., The importance of boron for plants, *Journal of Boron*, 2(3), 168-174, **2017**.
- 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**.
- Hall, D. Boron. *Department of Agriculture and Food Western Australia*, 1-2, **2010**.
- 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**.
- Hove, R.M., Ziemann, M. and Bhave, M., Identification and expression analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) aquaporin gene family, *Plos One*, 10(6), e0128025 **2015**.
- 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., Ortiz, M.V., Cardenas-Ninasivincha, S., Acosta-Garcia, G. and Bastías, E. Gene expression analysis in response to combined salt and boron (B) stresses in a tolerant maize landrace, *Plant Omics*, 11(2), 80-88, **2018**.
- Jones, D.H., Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development, *Phytochemistry*, 23(7), 1349-1359, **1984**.
- Kalaji, H.M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Allakhverdiev, S.I. and Goltsev, V., Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements, *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 16-25, **2014**.
- 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), 102 **2016**.

Kalaji, H.M., Rastogi, A., Živčák, M., Brestic, M., Daszkowska-Golec, A., Sitko, K. and Cetner, M.D., Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors, *Photosynthetica*, 56(3), 953-961, **2018**.

Karimi, S. and Tavallali, V., Interactive effects of soil salinity and boron on growth, mineral composition and CO₂ assimilation of pistachio seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11), 1-10, **2017**.

Karimi, S., Tavallali, V. and Wirthensohn, M., Boron amendment improves water relations and performance of *Pistacia vera* under salt stress, *Scientia Horticulturae*, 241, 252-259, **2018**.

Kayihan, D.S., Kayihan, 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**.

Kayihan, 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**.

Kayihan, 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**.

Kayihan, D.S., Kayihan, 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**.

Kayihan, C., The involvement of the induction of anthocyanin biosynthesis and transport in toxic boron responsive regulation in *Arabidopsis thaliana*, *Turkish Journal of Botany*, 45(3), 181-191, **2021**.

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**.

Kim, J., Lee, W. J., Vu, T. T., Jeong, C. Y., Hong, S. W. and Lee, H., High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of AtDFR confers significant salt stress tolerance in *Brassica napus* L., *Plant Cell Reports*, 36(8), 1215-1224, **2017**.

Koes, R., Verweij, W. and Quattrocchio, F., Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends In Plant Science*, 10(5), 236-242, **2005**.

Koffler, B.E., Luschin-Ebengreuth, N., Stabentheiner, E., Müller, M. and Zechmann, B., Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*, *Plant Science*, 227, 133-144, **2014**.

- Konuk, M., Liman, R. and Cigerci, I.H., Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells, *Pakistan Journal of Botany*, 39(1), 73 **2007**.
- 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**.
- Koornneef, M. and Meinke, D., The development of *Arabidopsis* as a model plant, *The Plant Journal*, 61(6), 909-921, **2010**.
- 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., Degl'Innocenti, E., Pardossi, A. and Guidi, L., Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 7, 255-270, **2012**.
- 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**.
- Landi, M., Guidi, L., Pardossi, A., Tattini, M. and Gould, K.S., Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*), *Planta*, 240(5), 941-953, **2014**.
- Landi, M., Can anthocyanins be part of the metal homeostasis network in plant, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 10(4), 170-177, **2015**.
- Landi, M., Tattini, M. and Gould, K.S., Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions, *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4-17, **2015**.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I. E. and Araniti, F., Boron toxicity in higher plants: an update, *Planta*, 250(4), 1011-1032, **2019**.
- Lang, D., Weiche, B., Timmerhaus, G., Richardt, S., Riaño-Pachón, D.M., Corrêa, L.G. and Rensing, S.A., Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: a timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity, *Genome Biology and Evolution*, 2, 488-503, **2010**.
- Lata, C., Kumar, A., Sharma, S.K., Singh, J., Sheokand, S., Mann, A. and Rani, B., Tolerance to combined boron and salt stress in wheat varieties: Biochemical and molecular analyses, *Indian Journal of Experimental Biology*, 321-328, **2017**.

Lee, S.K.D., Hot pepper response to interactive effects of salinity and boron, *Plant Soil and Environment*, 52: 5, 227-233, **2006**.

Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R. and Meyerowitz, E.M., The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 194(1), 15-23, **1984**.

Lichtenthaler, H.K., Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148, 350-382, **1987**.

Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y. and Yang, R., Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China, *Environmental and Experimental Botany*, 71(2), 174-183, **2011**.

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**.

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**.

Loomis, W.D. and Durst, R.W., Chemistry and biology of boron, *BioFactors*, 3(4), 229-239, **1992**.

Lordkaew, S., Konsaeng, S., Jongjaidee, J., Dell, B., Rerkasem, B. and Jamjod, S., Variation in responses to boron in rice, *Plant and Soil*, 363(1), 287-295, **2013**.

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**.

Macho-Rivero, M.A., Herrera-Rodríguez, M.B., Brejcha, R., Schäffner, A.R., Tanaka, N., Fujiwara, T., González-Fontes, A. and Camacho-Cristóbal, J.J., Boron toxicity reduces water transport from root to shoot in *Arabidopsis* plants. Evidence for a reduced transpiration rate and expression of major PIP aquaporin genes, *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 841-849, **2018**.

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., Palmer, C.M. LeafJ: An ImageJ Plugin for Semi-automated Leaf Shape Measurement. *Journal of Visualized Experiments* (71), e50028, doi:10.3791/50028 **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**.

- Marschner, P., Marschner's mineral nutrition of higher plants., 3rd. edition, Elsevier Academic Press, London, **2012**.
- Martínez-Ballesta, M.D.C., Bastías, E. and Carvajal, M., Combined effect of boron and salinity on water transport: the role of aquaporins, *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 844-845, **2008**.
- Matthes, M. and Torres-Ruiz, R.A., Boronic acid treatment phenocopies monoapteros by affecting PIN1 membrane stability and polar auxin transport in *Arabidopsis thaliana* embryos, *Development*, 143(21), 4053-4062, **2016**.
- 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**.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.T., Santoni, V., Shahzad, Z. and Verdoucq, L., Aquaporins in plants, *Physiological Reviews*, 95(4), 1321-1358, **2015**.
- McDonald, G.K., Stangoulis, J.C.R., Genc, Y., Lewis, J. and Robin, D.G., Boron toxicity, micronutrient deficiency and salt: overcoming the trifecta of nutritional problems in alkaline soils. In *The Meeting on 'Genetic Solutions for Hostile Crops'*, CSIRO Plant Industry, *Canberra, Australia*, **2003**.
- Meinke, D.W. and Sussex, I.M., Isolation and characterization of six embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Developmental Biology*, 72(1), 62-72, **1979**.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M., *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis, *Science*, 282(5389), 662-682, **1998**.
- 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**.
- Miwa, K., Takano, J. and Fujiwara, T., Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 46(6), 1084-1091, **2006**.
- 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., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T. and Fujiwara, T., Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 163(4), 1699-1709, **2013**.
- 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**.

Mohamed, A.K.S., Qayyum, M.F., Shahzad, A.N., Gul, M. and Wakeel, A., Interactive effect of boron and salinity on growth, physiological and biochemical attributes of wheat (*Triticum aestivum*), *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(2) **2016**.

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**.

Mosa, K.A., Kumar, K., Chhikara, S., Musante, C., White, J.C. and Dhankher, O.P., Enhanced boron tolerance in plants mediated by bidirectional transport through plasma membrane intrinsic proteins, *Scientific Reports*, 6(1), 1-14, **2016**.

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., Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism, *Plant and Soil*, 112(1), 45-52, **1988**.

Nable, R.O., Bañuelos, G. S. and Paull, J.G., Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193(1), 181-198, **1997**.

Nagarajan, Y., Rongala, J., Luang, S., Singh, A., Shadiac, N., Hayes, J., Sutton, T., Gilliam, M., Tyerman, S.D., McPhee, G., Voelcker, N.H., Mertens, H.D.T., Kirby, N.M., Lee, J.-G., Yingling, Y.G. and Hrmova, M., A barley efflux transporter operates in a Na⁺-dependent manner, as revealed by a multidisciplinary platform. *The Plant Cell*, 28(1), 202-218, **2016**.

Oiwa, Y., Kitayama, K., Kobayashi, M. and Match, T., Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4), 621-627, **2013**.

O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G., Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth, *Science*, 294(5543), 846-849, **2001**.

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., Yilmaz, R., Eyidoğan, F., De Graaff, L., Yücel, M. and Öktem, H. A., Microarray analysis of late response to boron toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33(2), 191-202, **2009**.
- 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**.
- 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**.
- Papadakis, I.E., Tsiantas, P.I., Gerogiannis, O.N., Vemmos, S.N. and Psychoyou, M., Photosynthetic activity and concentration of chlorophylls, carotenoids, hydrogen peroxide and malondialdehyde in loquat seedlings growing under excess boron conditions, IV. International Symposium on Loquat 1092, Palermo **2014** p. 221-226.
- Papadakis, I.E., The timeless contribution of rootstocks towards successful horticultural farming: from ancient times to the climate change era, American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 11(4), 137-141, **2016**.
- 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**.
- Pardossi, A., Romani, M., Carmassi, G., Guidi, L., Landi, M., Incrocci, L., Maggini, R., Puccinelli, M., Vacca W. and Ziliani, M., Boron accumulation and tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) with green or purple leaves, Plant and Soil, 395(1), 375-389, **2015**.
- Paull, J.G., Cartwright, B. and Rathjen, A.J., Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron, Euphytica, 39(2), 137-144, **1988**.
- Paull, J.G., Nable, R.O., Lake, A.W.H., Materne, M.A. and Rathjen, A.J., Response of annual medics (*Medicago* spp.) and field peas (*Pisum sativum*) to high concentration of boron: genetic variation and the mechanism of tolerance, Australian Journal of Agricultural Research, 43(1), 203-213, **1992**.
- 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**.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S. and Giannakoula, A., Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars, Plant Physiology and Biochemistry, 60, 1-11, **2012**.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. and Vianello, A., Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14950-14973, **2013**.

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**.

Poustka, F., Irani, N. G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K. and Grotewold, E., A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions, *Plant Physiology*, 145(4), 1323-1335, **2007**.

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*, **2013** p. 1150-1151.

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**.

Pütter, J., Peroxidases, in: Bergmeyer HU (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. II, Academic Press, New York, pp 685-690, **1974**.

Rani, C., Sharma, P.K., Kumar, B., Angrish, R. and Datta, K.S., Alleviation of boron-salt toxicity by calcium in wheat through associated changes in antioxidant defense system, *Indian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 21-28, **2008**.

Rao, M.V., Hale, B.A. and Ormrod, D.P., Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide (role of antioxidant enzymes), *Plant Physiology*, 109(2), 421-432, **1995**.

Raven, J.A., Short-and long-distance transport of boric acid in plants, *New Phytologist*, 84(2), 231-249, **1980**.

Reed, S., Schnell, R., Moore, J.M. and Dunn, C., Chlorophyll a+ b content and chlorophyll fluorescence in avocado, *Journal of Agricultural Science*, 4(4), 29 **2012**.

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 & Environment*, 27(11), 1405-1414, **2004**.

Reid, R., Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley, *Plant And Cell Physiology*, 48(12), 1673-1678, **2007**.

Reid, R. and Fitzpatrick, K., Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat, *Plant Physiology*, 151(1), 413 (**2009**) 420.

- Reid, R., Understanding the boron transport network in plants, *Plant And Soil*, 385(1), 1-13, **2014**.
- Ripoll, J., Bertin, N., Bidel, L.P. and Urban, L., A user's view of the parameters derived from the induction curves of maximal chlorophyll a fluorescence: perspectives for analyzing stress, *Frontiers In Plant Science*, 7, 1679 **2016**.
- 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**.
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W.D. and McCann, M.C., Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes, *Plant Physiology*, 132(2), 1033-1040, **2003**.
- Sang, W., Huang, Z.R., Yang, L.T., Guo, P., Ye, X. and Chen, L.S., Effects of high toxic boron concentration on protein profiles in roots of two Citrus species differing in boron-tolerance revealed by a 2-DE based MS approach, *Frontiers in Plant Science*, 8, 180 **2017**.
- Sarafi, E., Chatzissavvidis, C. and Therios, I., Response of two pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars to six boron concentrations: Growth performance, nutrient status, gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence, and proline and carbohydrate content, *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 983-994, **2017**.
- Scott, P., *Photosynthesis: The Ultimate in Autotrophy, Physiology and Behaviour of Plants*, 17-40, **2011**.
- Severson, R.C. and Gough, L.P., Boron in mine soils and rehabilitation plant species at selected surface coal mines in western United States, Vol. 12, No. 1, p. 142-146. United States, **1983**.
- 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**.
- Shields, S.E., Wingate, V.P. and Lamb, C.J., Dual control of phenylalanine ammonia-lyase production and removal by its product cinnamic acid, *European Journal of Biochemistry*, 123(2), 389-395, **1982**.
- Shi, M. Z. and Xie, D.Y., Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*, *Recent Patents on Biotechnology*, 8(1), 47-60, **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**.

Somerville, C.R. and Ogren, W.L., Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity, Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(5), 2684-2687, **1980**.

Somerville, C. and Koornneef, M., A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant, Nature Reviews Genetics, 3(11), 883-889, **2002**.

Stangoulis, J.C., Brown, P.H., Bellaloui, N., Reid, R.J. and Graham, R.D., The efficiency of boron utilisation in canola, Functional Plant Biology, 28(11), 1109-1114, **2001**.

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. In *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, In Chlorophyll A Fluorescence, 321-362, **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**.

Sun, Z.W., Ren, L.K., Fan, J.W., Salt response of photosynthetic electron transport system in wheat cultivars with contrasting tolerance, Plant Soil Environment, 11: 515-521, **2016**.

Sutton, T., Baumann, U., Hayes, J., Collins, N.C., Shi, B.J., Schnurbusch, T., Hay, A., Mayo, G., Pallotta, M., Tester, M. and Langridge, P., Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification, Science, 318(5855), 1446-1449, **2007**.

Szymanski, W.G., Kierszniowska, S. and Schulze, W.X., Metabolic labeling and membrane fractionation for comparative proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* suspension cell cultures, Journal of Visualized Experiments, 79 **2013**.

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., 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., 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**.

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**.

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, **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**.

Trojak, M. and Skowron, E., Role of anthocyanins in high-light stress response, World Scientific News, 81(2), 150-168, **2017**.

Tsimilli-Michael, M. and Strasser, R.J., In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants, In Mycorrhiza, 679-703, **2008**.

Turan, M.A., Taban, N. and Taban, S., Effect of calcium on the alleviation of boron toxicity and localization of boron and calcium in cell wall of wheat, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(2), 99-103, **2009**.

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**.

Van Goor, B.J. and Van Lune, P., Redistribution of potassium, boron, iron, magnesium and calcium in apple trees determined by an indirect method, Physiologia Plantarum, 48(1), 21-26, **1980**.

Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C. Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J. and Sung, Z. R., The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a

glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12(1), 97-109, **2000**.

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**.

Wakuta, S., Fujikawa, T., Naito, S. and Takano, J., Tolerance to excess-boron conditions acquired by stabilization of a BOR1 variant with weak polarity in *Arabidopsis*, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 4 **2016**.

Wallace, I.S., Choi, W.G. and Roberts, D.M., The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1165-1175, **2006**.

Wang, S.Y., Jiao, H.J. and Faust, M., Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple, *Physiologia Plantarum*, 82(2), 231-236, **1991**.

Wang, Q., Lu, L., Wu, X., Li, Y. and Lin, J., Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*, *Tree Physiology*, 23(5), 345-351, **2003**.

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**.

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**.

Wimmer, M.A. and Goldbach, H.E., Boron-and-salt interactions in wheat are affected by boron supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2), 171-179, **2012**.

Xu, Z., Mahmood, K. and Rothstein, S.J., ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis*, *Plant and Cell Physiology*, 58(8), 1364-1377, **2017**.

Xu, Z. and Rothstein, S.J., ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in *Arabidopsis*, *Plant Signaling & Behavior*, 13(3), 1364, 77, **2018**.

Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Keren, R. and Reid, R.J., Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield, *Plant and Soil*, 304(1), 73-87, **2008**.

Zhang, C.H., Ma, T., Luo, W.C., Xu, J.M., Liu, J.Q. and Wan, D.S., Identification of 4CL genes in desert poplars and their changes in expression in response to salt stress, *Genes*, 6(3), 901-917, **2015**.

Zhang, Y., Jiang, L., Li, Y., Chen, Q., Ye, Y., Zhang, Y. and Tang, H., Effect of red and blue light on anthocyanin accumulation and differential gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa*), *Molecules*, 23(4), 820, **2018**.