T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAKARNALIK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE BOR UYGULAMASINA TEPKİLERİN RT-PCR İLE İZLENMESİ

Zeynep ÖZBEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
KONYA, 2006

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAKARNALIK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE BOR UYGULAMASINA TEPKİLERİN RT-PCR İLE İZLENMESİ

Zeynep ÖZBEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 29/11/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir

Yrd.Doç.Dr. Erdoğan Eşref HAKKI	Prof.Dr.Sait GEZGİN	Doç.Dr.Süleyman SOYLU
(Danışman)	(Üye)	(Üye)

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAKARNALIK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE BOR UYGULAMASINA TEPKİLERİN RT-PCR İLE İZLENMESİ

Zeynep ÖZBEK

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2006, **Sayfa:** 83

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Prof. Dr. Sait GEZGİN

Doç. Dr. Süleyman SOYLU

Bu çalışmada, Orta Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak yetiştirilen makarnalık buğday (*Triticum durum*) çeşitlerinden Kızıltan-91 ve Çakmak-79'un farklı Bor (B) dozlarındaki, B taşıyıcısı olduğu varsayılan *bor1* genine ait ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Öncelikle bor taşıyıcı bu genin makarnalık buğdaydan kısmi izolasyonu yapılmıştır. Buğday çeşitleri, su kültürü ortamında H (0.49 mg B kg^{-1}), B_0 (0 mg B kg^{-1}), B_1 (1.08 mg B kg^{-1}) ve B_{100} (108 mg B kg^{-1}) dozlarında 2-3 yapraklı döneme kadar yetiştirilmiştir. Her bir ortama ait ayrı ayrı kök ve gövde RNA izolasyonları yapılarak *bor1* ve *ubiquitin* genlerinin aktivitesi zamana bağlı olarak RT-PCR ile tespit edilmiştir. Çeşitlerin farklı zaman ve B dozlarındaki B alımları ICP-AES cihazı ile belirlenmiştir.

Kullanılan çeşitlerin uygulanan B dozlarına tepkisi farklı olmuştur. Kızıltan-91'in gövde, Çakmak-79'un ise kök bünyesine daha fazla B aldığı ve bu bölgelerde daha fazla B biriktirdiği belirlenmiştir. Çakmak-79'un B_1 ve B_{100} dozlarında Kızıltan-91'in ise B_{100} dozunda bünyesine maksimum düzeyde B aldığı görülmüştür.

Daha önce yapılmış tarla çalışmalarında B noksanlığına hassas olduğu belirlenen Kızıltan-91 çeşidinde düşük B konsantrasyonlarında (H ve B_0) *bor1* geninin ekspresyonu daha yüksek olurken, normal ve yüksek bor dozlarında (B_1 ve B_{100}) ekspresyon düzeyi azalmıştır. B noksanlığına dayanıklı olarak bilinen Çakmak-79 çeşidinde ise tam tersi bir durum ortaya çıkmıştır. Kızıltan-91 çeşidinde düşük B dozlarında pasif taşınmanın aktif taşınma ile daha fazla desteklendiği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Bor, Makarnalık Buğday, Su Kültürü, ICP-AES, RT-PCR

ABSTRACT

MS THESIS

RT-PCR ANALYSIS OF DURUM WHEAT CULTIVAR'S REACTIONS TO BORON APPLICATION

Zeynep ÖZBEK

Selcuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Assoc. Prof. Asit. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2006, **Pages:** 83

Jury: Assoc. Prof. Asit. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI
Prof. Dr. Sait GEZGİN
Assoc. Prof. Dr. Süleyman SOYLU

In this study, the expression levels of the putative *bor1* gene were analyzed in Kızıltan-91 and Çakmak-79 which are commonly grown durum wheat cultivars in the region of Middle Anatolia. A part of this boron (B) transporter gene was isolated from durum wheat first of all.The plants were grown at H (0.49 mg B kg^{-1}), B_0 (0 mg B kg^{-1}), B_1 (1.08 mg B kg^{-1}) and B_{100} (108 mg B kg^{-1}) in hydroponic culture. RNAs from root and shoot samples belonging to each concentration and different time periods were isolated separately and activities of *bor1* and *ubiquitin* genes were determined via RT-PCR. B uptakes of durum cultivars in different times and B concentrations were also determined using ICP-AES.

The reactions of the cultivars were different based on the B concentrations used. It was determined that, Çakmak-79 accumulates more B in roots but Kızıltan-91 stores in shoots. While Kızıltan-91 takes maximum B at B_{100} level, Çakmak-79 takes maximum B at B_1 and B_{100}.

Kızıltan-91, previous field studies showed as a sensitive cultivar to the B deficiency, had higher *bor1* gene expression in the low B concentrations (H and B_0), but the level of expression was decreased at the normal and high B concentrations (B_1 and B_{100}). This was in contrast with the cultivar Çakmak-79 which is known to tolerate B deficiency. At low B concentrations, passive transport is believed to be supported more with active transport in Kızıltan-91 compared with Çakmak-79.

KEY WORDS: Boron, Durum Wheat, Hydroponic Culture, ICP-AES, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yüksek lisans tezi olarak planlanıp yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Bor ile ilgili çalışmaları başlattığı ve çalışmanın planlanması, analizlerin yapılması gibi konularda bilgi ve donanımlarından faydalandığım Prof. Dr. Sait GEZGİN'e, materyalin seçimi ve temini aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Süleyman SOYLU'ya, fakültemizde biyoteknoloji alanındaki çalışmalara öncülük yapan Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU'na, çalışma süresince kullanılan laboratuar, ekipman ve sarf malzeme destekleri için TÜBİTAK, DPT ve Selçuk Üniversitesi BAP'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam süresince eksikliğini hiç hissetmediğim eşim Osman ÖZBEK'e en içten dileklerimle teşekkür ederim. Ayrıca çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Ziraat Mühendisi Emine PINARKARA'ya ve laboratuarlarda çalışan diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

KONYA, 2006 **Zeynep ÖZBEK**

İÇİNDEKİLER

ÖZ i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİL LİSTESİ vi
ÇİZELGE LİSTESİ viii
KISALTMALAR ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 5
2.1. Toprakta B Elementinin Durumu ve Yarayışlılığı ile İlgili Araştırmalar 5
2.2. Bitkide B Alımı ve Taşınması ile İlgili Araştırmalar 7
2.3. B'un Bitkideki Metabolik Faaliyetleri ile İlgili Araştırmalar 11
2.4. Bitkilerde B Stresi ile İlgili Araştırmalar 15
2.5. Bitkilerde B'a Karşı Genotipik Farklılıklar ile İlgili Araştırmalar 16
3. MATERYAL VE METOD 21
3.1. Materyal 21
3.2. Metod 22
3.2.1. Sterilizasyon 22
3.2.2. Tohumlardaki B miktarlarının belirlenmesi 23
3.2.3. Danelerin çimlendirilmesi 23
3.2.4. Su kültürü çalışması 24
3.2.4.1. Fidelerin Hoagland su kültürüne aktarılması 25
3.2.4.2. Fidelerin B'suz Hoagland su kültürüne aktarılması 26
3.2.4.3. Fidelerin yeterli ve toksik seviyede B içeren Hoagland su kültürü çözeltilerine aktarılması 26
3.2.5. Moleküler genetik çalışmalar 27
3.2.5.1. Klonlama çalışmaları 27
3.2.5.1.1. Primer tasarımı 27
3.2.5.1.2. PCR çalışması 28
3.2.5.1.3. Agaroz jel elektroforez uygulamaları 30
3.2.5.1.4. PCR ürününün jelden ayrıştırılması 32
3.2.5.1.5. Gen fragmanına poly A (Adenin) takılması 33
3.2.5.1.6. Gen fragmanının plazmid vektöre klonlanması 34
3.2.5.1.7. Transformasyon için kompetant hücre hazırlanması 35
3.2.5.1.8. Rekombinant plazmid vektörün bakteriye transformasyonu 36
3.2.5.1.9. Bakteriden plazmid izolasyonu 38
3.2.5.1.10. Plazmidin fragmanı taşıdığının ispat edilmesi 39
3.2.5.2. Ekspresyon çalışmaları 40
3.2.5.2.1. RNA izolasyonu 40
3.2.5.2.2. RNA konsantrasyon saflıklarının belirlenmesi 41
3.2.5.2.3. cDNA sentezi 42
3.2.5.2.4. RT – PCR çalışmaları 43
3.2.5.2.5. Genin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi 44
3.2.6. Bitki B analizleri 45
3.2.6.1. Bitki materyallerinin mikrodalgada yakılması 45
3.2.6.2. ICP-AES ile örneklerin okunması 45

3.2.7. Denemelerin düzenlenmesi ve bulguların değerlendirilmesi 46
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 47
4.1. Moleküler Genetik Çalışmalarının Sonuçları 47
4.2. Bitkilerdeki B Konsantrasyonları 59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 67
6. KAYNAKLAR 70
EKLER 79

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. Bitkilerin çimlendirilmesi 24
Şekil 3.2. Bitki fidelerinin su kültürüne aktarılması 25
Şekil 3.3. PCR'da DNA amplifikasyonu 29
Şekil 3.4. PCR döngü aşamaları 29
Şekil 3.5. Agaroz jel elektroforez 30
Şekil 3.6. Jel dökümantasyon sistemi ve görüntü alınması 31
Şekil 3.7. Jelden bant kesimi 32
Şekil 3.8. Jel ekstraksiyon ürününün agaroz jel görüntüsü 33
Şekil 3.9. pGEM-T Easy vektör sistemi 34
Şekil 3.10. Rekombinant ve rekombinant olmayan bakterilerin LB/ampisilin/ IPTG/ X-gal içeren petri kaplarında büyütülmesi 37
Şekil 3.11. Rekombinant ve rekombinat olmayan bakteri hücrelerinde M13 primeri ile PCR 37
Şekil 3.12. Plazmid izolasyon ürününün jel görüntüsü 39
Şekil 3.13. *EcoR*I ile kesilmiş ve kesilmemiş plazmid jel görüntüsü 40
Şekil 3.14. cDNA sentezi 42
Şekil 3.15. ICP-AES cihazı 45
Şekil 4.1. Kızıltan-91 kök örneklerinde bor1 ve ubiquitin genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi 50
Şekil 4.2. Kızıltan-91 kök örneklerinde bor1 geninin ekspresyon düzeyleri 51
Şekil 4.3. Kızıltan-91 gövde örneklerinde bor1 ve ubiquitin genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi 52
Şekil 4.4. Kızıltan-91 gövde örneklerinde bor1 geninin ekspresyon düzeyleri 53
Şekil 4.5. Çakmak-79 kök örneklerinde bor1 ve ubiquitin genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi 53
Şekil 4.6. Çakmak-79 kök örneklerinde bor1 geninin ekspresyon düzeyleri 54
Şekil 4.7. Çakmak-79 gövde örneklerinde bor1 ve ubiquitin genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi 55
Şekil 4.8. Çakmak-79 gövde örneklerinde bor1 geninin ekspresyon düzeyleri 55
Şekil 4.9. Kızıltan-91 çeşidine ait gövde B konsantrasyonları 61
Şekil 4.10. Çakmak-79 çeşidine ait gövde B konsantrasyonları 61
Şekil 4.11. Kızıltan-91 çeşidine ait kök B konsantrasyonları 65
Şekil 4.12. Çakmak-79 çeşidine ait kök B konsantrasyonları 65

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1. Kullanılan çeşitlerin genel özellikleri 21
Çizelge 3.2. Hoagland besin ortamının hazırlanması..... 26
Çizelge 3.3. Kullanılan PCR primerleri 28
Çizelge 3.4. Gen fragmanının plazmid vektöre transfer reaksiyon koşulları..... 35
Çizelge 3.5. Denemelerin yürütülmesi..... 46
Çizelge 4.1. Çakmak-79 çeşidinin kök RNA konsantrasyonları..... 48
Çizelge 4.2. Çakmak-79 çeşidinin gövde RNA konsantrasyonları..... 48
Çizelge 4.3. Kızıltan-91 çeşidinin kök RNA konsantrasyonları 49
Çizelge 4.4. Kızıltan-91 çeşidinin gövde RNA konsantrasyonları 49
Çizelge 4.5. Denemede kullanılan çeşitlerin çimlenme öncesine ait dane bor konsantrasyonları 59
Çizelge 4.6. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin farklı B dozları ve farklı zamanlarda gövde B konsantrasyonlarına ait varyans analiz sonuçları. 60
Çizelge 4.7. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin gövde B konsantrasyonları..... 60
Çizelge 4.8. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin farklı B dozları ve farklı zamanlarda kök B konsantrasyonlarına ait varyans analiz sonuçları..... 63
Çizelge 4.9. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin kök B konsantrasyonları..... 63

KISALTMALAR

atm	Atmosfer basıncı (basınç birimi)
ATPase	Adenin Three Phosphatase
Bç	Baz çifti
CCRC	Complex Carbohydrate Research Center
cDNA	Komplementer Deoksi Ribo Nükleik Asit
cm	Santimetre
da	Dekar
dk	Dakika
DNA	Deoksi Ribo Nükleik Asit
DNase	Deoksi Ribo Nükleaz
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAO	Food and Agricultural Organiztion
g	Gram
ha	Hektar
IAA	Indol-3-asetik asit
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
IPTG	Izopropil β-D-thiogalaktopiranosit
Kb	Kilobaz
kD	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RG-II	Ramnogalakturonan-II
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNase	Ribo Nükleaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
s	Saniye
SSBP	Single Strand Binding Protein
t	Ton
UV	Ultra Viyole
V	Volt
w/v	Weight/volume (ağırlık/hacim)
y	Yıl
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrad derece

1. GİRİŞ

Tahıllar dünyada ekiliş, üretim ve ekonomik değer yönünden tarla bitkileri içerisinde en önemli yere sahiptir. İnsan beslenmesinde günlük gıda ihtiyacının temelini oluşturan tahıllar, hayvan besleme ve endüstride de yaygın biçimde kullanılmaktadır. İnsanların günlük kalori ihtiyacının %50'den fazla bir kısmı, hayvanlarda ise yaklaşık %20'si tahıllardan karşılanmaktadır. Tahılların yeryüzünde bu kadar yaygın oluşunun nedenlerinden en önemlisi, tarımın tarihsel gelişimi içinde en eski kültür bitkisi oluşlarıdır. Ayrıca bu grup bitkilerin geniş tür, çeşit ve ekotip zenginliğine sahip olmaları da nedenler arasındadır (Kün 1996).

Yeryüzünün 1.4 milyar ha olan işlenen topraklarının yarısından fazlasında (yaklaşık 800 milyon ha) tahıl ekimi yapılmaktadır. Kurak ve yarı kurak bölgelerdeki nadas alanlarının da büyük çapta tahıllar için boş bırakıldığı göz önüne alınırsa, dünya tarım topraklarının büyük çoğunluğunun tahıl üretimine ayrıldığı görülmektedir. Tahıllar arasında buğday ise dünyada yaklaşık 215 milyon ha ekiliş alanı, hektara 2900 kg verim ve 630 milyon ton üretim miktarına sahiptir. Buğday ülkemizde ise, 9300000 ha'lık ekiliş alanı ve 21000000 ton'luk üretim kapasitesi ile tarla bitkileri arasında en yüksek orana sahiptir. Ülkemizde buğday, tahılların yaklaşık %67'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Ülkemiz için ekimi yapılan buğdayların yaklaşık %23'lük bir kısmını makarnalık çeşitler oluşturmaktadır (Anonim 2005a). Dünya ve ülkemizde çok fazla üretim miktarına sahip olmasına karşın buğday, verim açısından düşük bir orana sahiptir. Bu denli önemi olan buğdayın, verim ve kalite parametreleri üzerinde çalışmalar yapılması gerekmektedir. İnsan beslenmesindeki önemi bakımından, besin kalitesinin yükseltilmesi ve verim unsurlarının iyileştirilmesi, hızla artmakta olan dünya nüfusu göz önüne alındığında kaçınılmazdır.

Bitkilerde verimin artırılması için, bitki istekleri doğrultusunda, topraktaki eksik besin elementlerinin karşılanması gerekmektedir. Bu da gübreleme ile sağlanmaktadır. Yakın zamana kadar bitkinin ihtiyaç duyduğu makro besin elementleri içeren N, P ve K gübreleri kullanılmakta ve mikro besin elementleri göz

ardı edilmekte idi. Ancak son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermektedir ki; mikro besin element noksanlıkları da ciddi verim kayıplarına yol açmaktadır (Çakmak 2002).

Mikro elementler gerek toprakta, gerekse bitkide çok küçük miktarlarda bulunurlar. Topraktaki yarayışlı ve bitkideki miktarları çok düşük olmalarına rağmen eksiklikleri söz konusu olduğunda tarımsal üretimin düşmesine yol açarlar (Alkan 1998). Bazı durumlarda bitkilerde mikro element eksiklik belirtileri açıkça görülmese bile mikro element uygulamaları sonucunda verimde ciddi artışlar sağlandığı bilinmektedir. Bugün ancak bölgesel olarak görülen mikro element eksikliklerinin çok yakın bir gelecekte, şayet üzerinde çalışılmaz ve eksiklik tanımlamaları tam olarak yapılmaz ise, yaygınlaşıp bitkisel üretimi ciddi boyutlarda olumsuz etkilemesi kaçınılmaz görülmektedir.

FAO (Food and Agricultural Organization) tarafından yapılan bir çalışmada dünyada tarım yapılan toprakların yaklaşık %30'unda çinko noksanlığının olduğu belirlenmiştir. Ülkemiz ise, özellikle az yağış alan bölgelerinde, toprağın yüksek pH ve $CaCO_3$ içeriği, killi yapısı ve düşük organik madde içeriği nedeniyle yaygın şekilde görülen çinko (Zn) noksanlığı ile dünya ülkeleri arasında özel bir konuma sahiptir.

Ülkemizde 2005 yılı toplam gübre tüketimi yaklaşık 10 milyon ton'dur. Bunların yaklaşık %64'ü azotlu (%21 N), %34'ü fosforlu (%17 P_2O_5) ve %2'si potasyumlu (%50 K_2O) gübrelerden oluşmaktadır. Ülkemizde tüketilen gübrelerin bazılarında mikro besin elementlerinden sadece çinko yer almaktadır. Çinko içeren gübreler 1999 yılından itibaren kullanılmaya başlanmış ve günümüzde toplam gübre tüketiminin %3'lük bir kısmını oluşturmaktadır (Anonim 2005b).

Yapılan çalışmalardan anlaşılacağı üzere çeşitli mikro besin elementlerinin eksik olduğu durumlarda bitkiye kazandırılması gerekmektedir. Aksi durumda ciddi boyutta verim azalması söz konusu olmaktadır. Ayrıca element eksik ortamda yetiştirilen ürünlerin besin değeri de çok zayıf olmaktadır.

Mikro besin elementlerinin eksikliği kadar fazlalığı da üretim kayıplarına neden olmaktadır (Taban ve Erdal 2000).

Bitkilerde B'un pek çok türde bulunduğu ile ilgili ilk verilere Agulhon H.'nin 1910 yılında yaptığı çalışmasında rastlanmaktadır. Ancak araştırmacının B'un

mutlak gerekli olduğu konusunda herhangi bir saptaması yoktur (Hakkı ve ark. 2005a). B mineralleri, bünyelerinde değişik oranlarda bor oksit (B_2O_3) içeren minerallerdir (Anonim 2005b). Ülkemizde yaygın olarak bulunan ticari öneme sahip B mineralleri; tinkal, kolemanit ve üleksit'dir. B minerali rezervleri dünyada başlıca üç kuşakta oluşmuştur. Bunlar, ABD'nin Güneybatı bölgesi Mojave Çölü, Güney-Orta Asya Alp Kuşağı (Türkiye dahil) ve Güney Amerika And Kuşağı olarak belirtilmiştir. Borik asit bazında 885 milyon ton olan dünya toplam B rezervinin %64'lük kısmını (563000000 t) Türkiye oluştururken, ABD ve Rusya %9 ve %11'lik paylara sahiptirler. Türkiye'nin dünya B üretimindeki payı %34 (520000 t) iken ABD'nin payı %40'tır (630000 t) (Anonim 2005c).

Ülkemiz B rezervleri bakımından dünyanın en zengin ülkesi olmasına rağmen, ekonomik değere sahip bu madenden yeterli derecede yararlanamamaktadır. Tarımın yüksek oranda yapıldığı Orta-Güney Anadolu Bölge topraklarının %19.7'lik bir kısmında B eksikliği bulunmasına karşın ülke tarımında henüz B'lu gübreler kullanılmamaktadır (Anonim 2002). Bununla birlikte bu mineralden daha fazla yararlanılması yönünde son yıllarda kararlı adımlar atılmaktadır. Bunların en önemlisi Bor Enstitüsü'nün (www.boren.gov.tr) kurulmuş olması ile tarımsal ve sağlık alanındaki çalışmalar başta olmak üzere, bilimsel projelere aktif destekler sağlanarak, bu alanlarda ihtiyaç duyulan Türkiye kaynaklı literatür bilgisi oluşumunun teşvik etmektir. Ayrıca sanayinin bu iki kolundaki B uygulamalarını yönlendirme, pratik kullanımının özendirilmesi yönünde bilgi üretimi ve politikalar oluşturulmaktadır. Bu kapsamda B'lu gübrelerin üretimlerine de başlanmış olup, gerek yurtiçi gerekse yurtdışı B denemeleri desteklenmekte ve B'lu gübrelerin pazarlanması yönünde aktif çalışmalar sarf edilmektedir.

Noksanlık ve toksite durumlarında ciddi verim kayıplarına neden olan B elementi, bitki metabolizmasında önemli roller üstlenmiştir. Ancak B'un görev aldığı birçok metabolik faaliyet tam olarak aydınlatılmış değildir. B'un bitkilerdeki alım ve taşınma olayları da tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da B taşıyıcısı olarak belirtilen *bor1* geni tespit edilmiştir (Takano ve ark. 2002). Bu genin ortoloğu *bor3* geni ise çeltikte tespit edilmiştir (Gu ve ark. 2003). Yapılan bu çalışmalar ışığında bitkilerin element alımı, taşınması ve birikimine ait moleküler düzeydeki çalışmaların genişletilerek

devam ettirilmesi gerekmektedir. Bu sayede özellikle ekonomik öneme sahip bitkilerdeki ciddi boyutlara ulaşan verim kayıplarının önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu araştırmada makarnalık buğday çeşitlerinin farklı B uygulamalarına verdiği tepkilerin moleküler seviyede incelenmesi ve bitkiler tarafından bu elementin alım mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca *Bor1* geninin ilk defa buğdayda ortoloğu tespit edilerek bu genin kısmi izolasyonu yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Toprakta B Elementinin Durumu ve Yarayışlılığı ile İlgili Araştırmalar

Toprakta B; kayalar, mineraller, killer ve demir ile alüminyumun su oksitlerinin yüzeylerinde adsorbe edilmiş şekilde, organik maddeye bağlanmış olarak veya toprak çözeltisinde bağımsız, iyonize olmamış borik asit (H_3BO_3) ve borat ($B(OH)_4$) iyonları şeklinde bulunmaktadır (Nable ve ark. 1997).

Tarımda yaygın olarak kullanılan B kaynakları temel olarak iki ana gruba ayrılır. Birinci grubu hem çözelti hem de katı olarak uygulanabilen rafine ürünler oluştururken, maden cevherleri ikinci grubu oluştururlar. Sulu bor, boraks ve borik aside göre daha hızlı çözündüğü için sulu bordan sıvı gübreler hazırlanabilir. Öğütülmüş üleksit ve kolemanit cevherleri genellikle N, P ve K gübrelerinin boratlaştırılmasında kullanılır. Bazı atık ürünler de borca zenginleştirilmekte ve tarımda gübre olarak kullanılabilmektedir (Gezgin ve ark. 2005).

Bitkiler için yararlı olan B, toprak çözeltisinde çözünebilen B olmaktadır. Bu miktar da toplam toprak B'unun % 10'u civarındadır. Toprakların toplam B içeriklerinin birçok faktöre bağlı olarak farklı olması yanında toprakların bitkilerce alınabilir B konsantrasyonunun da farklı olduğu yapılan birçok çalışmayla ortaya konulmuştur (Kacar ve Katkat 1999).

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan bu çalışmalar yanında Türkiye'de özellikle Orta-Güney Anadolu'da yürütülen araştırmalarda toprakların elverişli B miktarlarının 0.01 ile 63.9 mg kg^{-1} arasında değiştiği ve toprakların %26.6'sında bölgenin önemli bitki gurubunu oluşturan tahıllar için B noksanlığı (<0.5 mg kg^{-1}) ve %18 'inde ise B toksitesi (>3.0 mg kg^{-1}) bulunduğu belirlenmiştir (Gezgin ve ark. 2002).

Gezgin ve ark.'nın (2006) genişlettikleri çalışmalarında ise Orta Güney Anadolu bölgesi topraklarını temsil eden 1154 adet toprak örneği analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda toprakların %98.2'sinin kireçli, %1.8'i ise kireçsiz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu toprakların makro elementlerden, potasyum içeriğinin

%7.1'inde yetersiz, %92.9'unda yeterli ve yüksek seviyede, fosfor içeriğinin %21.9'unda yüksek, %51.1'inde yeterli, %27'sinde yetersiz seviyede, magnezyum içeriğinin ise %12'sinde yetersiz, %88'inde yeterli ve yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Mikro element besin içeriği incelediğinde ise toprakların %91'inde Cu miktarı yeterli ve yüksek düzeyde iken, %71.8'inde Fe, %60.9'unda Zn ve %6.9'unda Mn yetersiz seviyede bulunmuştur. Bölge toprakları bitkiye elverişli bor miktarları açısından değerlendirildiğinde, %19.7'si yetersiz, bor'a toleranslı bitkiler için %6.4'ü toksik ve tahıllar için %12.7' sinin toksik düzeyde bor ihtiva ettiği bulunmuştur.

B'un bitkiler tarafından alınabilirliği, toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir (Goldberg 1997).

Topraklarda B'un alınabilirliğini etkileyen en önemli faktörlerden biri toprak pH'sıdır. Toprak pH'sının artışıyla B'un bitkilerce alımında azalma görülür. Toprakların çözünür B konsantrasyonlarıyla toprağın pH'sı arasında negatif bir korelasyonun olduğu saptanmıştır. Benzer konsantrasyonlara fakat farklı pH'lara sahip topraklarda bitkilerce B alımının yüksek pH'lı topraklara göre düşük pH'lı topraklarda daha fazla olduğu bildirilmiştir (Kızılgöz ve Özberk 2005).

Kaba tekstürlü topraklar ince tekstürlü topraklardan daha düşük miktarda alınabilir B içerdiği için, B noksanlığı genelde kumlu topraklarda daha yaygındır (Gezgin ve ark. 2005).

Fleming'e (1980) göre, B'un yarayışlılığı kuru topraklarda B noksanlığına neden olacak kadar düşüktür. Kuruma ile birlikte toprak çözeltisindeki B'un mobilitesinin azalması, B'un bitki köklerine diffüzyonunu azaltmaktadır. Aynı araştırmacı B absorpsiyonunun, artan toprak sıcaklığıyla arttığını, bununla birlikte genellikle kurak geçen yaz aylarında bitkide B noksanlığı ortaya çıktığı için B absorpsiyonunun artışının toprak nemi ile toprak sıcaklığının karşılıklı etkisinden kaynaklanmış olabileceğini ileri sürmüştür (Alkan 1998).

Organik madde bir toprağın aktif olan kısmıdır ve topraktaki B'un alınabilirliğini etkileyen önemli bir toprak faktörüdür. Humusun B'a karşı çok yüksek bir kimyasal afinitesinin olduğu ve bunun da toprakta B'un tutunmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Loomis ve Durst 1992).

Genel olarak organik madde kapsamı yüksek olan topraklarda B noksanlığı daha az görülmektedir. Bu toprakların yarayışlı B kapsamı da yüksektir. Organik maddece zengin toprakların yüksek B dozlarında dahi toksiteye neden olmadığı belirtilmektedir. Gupta (1978), tarafından yapılan bir araştırmada toksik düzeyde B (10 mg B kg^{-1}) içeren organik toprakta yetiştirilen tatlı mısır bitkisinde B toksite belirtilerine rastlanmamıştır. Nitekim aynı miktarda B içeren mineral toprakta yetiştirilen bitkilerde özellikle de tahıllarda şiddetli B toksitesi ortaya çıkmaktadır. (Kaçar 1984).

2.2. Bitkide B Alımı ve Taşınması ile İlgili Araştırmalar

B'un yüksek bitkiler için mutlak gerekli bitki besin elementi olduğunun yaklaşık 76 yıl önce belirlenmesine (Warington 1923) rağmen, bitki bünyesindeki fonksiyonları tam olarak anlaşılmış değildir (Taban ve Erdal 2000).

B'un bitkiye aktif veya pasif proseslerle alınmasıyla ilgili olarak birçok tartışma konusu vardır. Bitkiler tarafından B'un alınımının kök plazma membranlarında, sonradan oluşan *cis-diol* komplekslerinin ve $B(OH)_3$'in kolaylıkla geçişini sağlayan pasif bir işleme dayandığı bildirilmiştir (Shelp 1993, Brown ve Hu 1994). Bu nedenle, B absorpsiyonu üzerinde, öncelikli olarak B'un alındığı ortamın B konsantrasyonuyla beraber aynı zamanda bitkilerin transpirasyon kapasiteleri de etkilidir (Marsehner 1995).

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

Bitki organlarında hareketi sınırlı olan B, genelde immobil olarak nitelendirilir. Bitkide transpirasyonla buhar halinde su kaybı sürdükçe, B da üst kısımlara doğru taşınmakta ve bitkinin tepe organlarında immobiliteden dolayı birikmektedir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu, bitkilerde B taşınımına ilişkin çok farklı sonuçlar verilmiştir. Bu yönüyle, primer fotosentetik

şeker ürünleri sorbitol, mannitol, duleitol olan türlerde, B'un floemde taşınımının mobil olduğu bulunmuştur. Bu fotosentatların B elementiyle poliol bağlarıyla birleştikleri ve B'un mobil hale geçtiği gösterilmiştir. Ayrıca, poliol oluşumunda çevresel faktörlerin göz önünde tutulması gerektiği vurgulanmıştır (Brown ve Shelp 1997).

Son zamanlarda tütünde yapılan genetik modifikasyon çalışmalarında, gen aktarımı yoluyla sorbitol üretmesi sağlanan tütünlerde B'un mobilitesinin sağlandığı ve kontrol bitkilerine göre B alınımının kök ve gövdede % 200 arttığı gözlenmiştir (Bellaloui ve ark. 1999).

Serbest bölgedeki, sitoplazmadaki, vakuoldeki ve hücre duvarındaki B konsantrasyonunun dış çözeltideki B konsantrasyonundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İçsel B konsantrasyonunun dış ortam B konsantrasyonundan yüksek olmasının B'un aktif alımına ilişkin kanıt olamayacağı, ancak bu durum boratın hücre içerisinde mono ya da diesterler oluşturmasından ve sonra da B izotoplarıyla yer değiştirmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Theiler ve ark. 1979).

Bitki tarafından kararlı izotop (FN 10) B ile yapılan çalışmalarda bazı bitkilerde yapraktan uygulanan B'un mevsim içinde bitkinin kabuk, çiçek, meyve gibi bölümlerine taşındığı ve bunun için de floemde B hareketinin gerektiği belirlenmiştir (Brown ve Hu 1996).

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

Bitkiler tarafından B alınmasının ve farklı organlara taşınmasının bitkinin su alımı ve ksilemdeki hareketi ile yakından ilişkili olduğu ve ayrıca bu taşınmanın bitki türleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum B'un esas itibariyle ksilemde taşındığını göstermektedir. B taşınmasının daha çok

transpirasyona bağlı olması, yaprak uçları ve kenarlarında B birikiminin nedenini de açıklamaktadır. B'un yapraklarda bu şekilde akümüle olması kimi hallerde toksik etkilere neden olabilmektedir. Bazı bitkiler B akümülasyonunun neden olacağı toksik etkilerden korunmak için ve tuzlu ortamlarda tuzun bitkilerden atılmasında da kullanılan gutasyon damlaları içinde B'u dışarı atma mekanizmasını geliştirmişlerdir (Taban ve Erdal 2000).

Subedi ve ark. (1999) bitkilerin topraktan aldığı B'un %68'inin yapraklarda, %16'sının köklerde %6'sının gövdede ve %10'unun meyvede bulunduğunu bildirmişlerdir.

Yousif ve ark.'nın (1972) susam bitkisiyle su kültüründe yaptıkları çalışmalarda en fazla B biriktiren organların yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona göre, yaprak ayası, petiol, sap şeklinde olduğunu göstermişlerdir.

Hücresel düzeydeki çalışmalarda B'un taşınmasının genel olarak pasif difüzyonla gerçekleştiği söylense de aktif taşıma ile ilgili bulgulara da rastlanmaktadır.

Hu ve Brown (1997) bildirdiğine göre Wilders ve Neales'in 1971 yılında yaptıkları çalışmada havuç ve şeker pancarından disk şeklinde kesilmiş bitki kök dokularında 0,1 µM borik asit çözeltisi kullanarak absorbsiyon ve desorbsiyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışma sonucunda hücre içi B konsantrasyonu dış ortamdan daha yüksek bulunmuştur. Burada aktif alımın gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bowen ve Nissen'in 1977'deki çalışmalarında ise 5-7 günlük arpa fidelerinden alınmış kök parçalarında kısa süreli B alım çalışmaları yapmışlardır. Farklı B konsantrasyonlarında (0,5-13 µM B) aktif B alımının gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Noguchi ve ark. (1997), B ihtiyacı yüksek, mutant *bor1-1* Arabidopsis bitkisini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada 3µM'lık B konsantrasyonunda rozet yaprakların mutant bitkide yoğun bir şekilde etkilenirken yabani tipte etkilenmediğini belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan 30µM'lık B ortamında mutant bitki normal olarak büyümüş fakat sterilite görülmüştür. Aynı ortamda yabani tip tohum oluşturmuştur. Yüksek B içeren 100µM'lık ortamda ise mutant bitkide bu olumsuz etkiler görülmemiştir. Mutant bitkide hücre içi B konsantrasyonları yabani tipe göre özellikle gövdede daha düşüktür. Radyoaktif B çalışmaları mutant bitkinin

B alımında ve taşınmasında yabani tipe göre olumsuz etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Mutasyon 2. kromozomun alt kolunda haritalanmıştır.

Takano ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde B'un bitki içerisindeki taşınımı ile ilgili ilk defa bir taşıyıcı protein kodlayan *bor1* geni tespit edilmiştir. Elde edilen sekans verileri analiz edildiğinde bu genin memelilerdeki borat taşıyıcı protein ailesine benzerlik göstediğini belirlemişlerdir. Bu gen kökte periskl hücrelerinde sentezlenerek B'un ksileme taşınmasında görev aldığı ve gövdeyi B noksanlığından koruduğu belirtilmiştir. *bor1-1* mutantı ile yapılan çalışmada, mutantın normal büyümesi için daha fazla B'a ihtiyaç duyduğu ve düşük B ortamında gövdedeki büyüme bozukluğunun köke nazaran daha fazla olduğu ifade edilmektedir. Aynı ortamda yetiştirilen yabani tip bitkinin yapraklarındaki B konsantrasyonu mutant bitkiye göre daha fazla olmuştur. Bu da mutant bitkinin B biriktirme kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Aynı sonuca araştırmacılar, işaretli B elementi ile yaptıkları çalışmada da ulaşmıştır.

Frommer ve Wiren (2002), *bor1* geninin diğer taşıyıcı genlerle filogenetik benzerlik göstermesinden dolayı bu genin de bir iyon taşıyıcı olabileceğini belirtmiştir. Ksileme borat iyonlarının, Cl^- veya H^+ iyon değişimi ile taşınabileceğini bildirmiştir.

Takano ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada *bor1-1* mutantı, yabani tip ve transgenik Arabidopsis bitkileri kullanarak farklı B koşullarında bu bitkilerin gövde B konsantrasyonları ve *bor1* geninin ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. Bitkiler Yüksek (100μM borik asit, B_{100}) ve düşük (0,1 μM borik asit, $B_{0,1}$) B ortamlarında büyütüldükten sonra tekrar yüksek B ortamına alınmıştır. B_{100} ortamında B birikimi yabani ve mutant bitkide benzer olmuştur. $B_{0,1}$ ortamında yabani tip bitki, mutanta göre gövdede daha fazla B biriktirmiştir. Tekrar B100 ortamına alınan yabani tip bitkilerde B birikimi 6 saat içinde hızla azalmıştır. Transgenik bitkiler incelendiğinde ise B noksanlığında Bor1-GFP füzyon proteinin kök ve gövdede yüksek seviyede biriktiği tespit edilmiştir. Bitkiler B_{100} ortamından $B_{0,1}$ ortamına transfer edildiğinde Bor1-GFP seviyesinin 24 saat içinde arttığı ve $B_{0,1}$ ortamından tekrar B_{100} ortamına transfer edildiğinde ise 24 saat içinde azaldığı gözlenmiştir. Buna göre *bor1* geninin birikiminin düzenlenmesinde post transkripsiyonal mekanizmalar büyük rol oynamaktadır. Kök hücrelerinin aynı odaklı lazer tarama mikroskopisi Bor1-GFP'nin

B noksanlığında hücre zarına lokalize olduğunu göstermiştir. B uygulamasından kısa bir süre sonra bor1 proteini sitoplazmada gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma Bor1 proteininin hücre zarından endozomlar vasıtasıyla kofula taşınarak parçalandığını göstermiştir. Bu sonuçlar yüksek B seviyesinde gövdeyi toksik B birikiminden ve düşük B seviyesinde ise B noksanlığından korumak için Bor1 proteininin endositozis ve parçalanma sürecinin ortamdaki B miktarı tarafından belirlendiğini göstermiştir.

Miwa ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada *bor1* geninin aktarıldığı transgenik Arabidopsis bitkisinin B noksanlığına tolerans gösterdiğini tespit etmişlerdir. Düşük B ortamında kökten gövdeye B taşınması artmış ve gövde büyümesi yabani tip bitkiye göre daha fazla olmuştur. Düşük B ortamında yabani tip bitki tohum oluşturmazken transgenik bitkide özellikle gövde ucuna B taşınması artmış ve tohum oluşturduğu gözlenmiştir.

2.3. B'un Bitkideki Metabolik Faaliyetleri ile İlgili Araştırmalar

Fizyolojik olarak B'un bitkideki fonksiyonları, şekerlerin taşınması, karbonhidrat metabolizması, solunum, hücre duvarının sentezi, hücre duvarının yapısı, lignifikasyon, hücre zarı bütünlüğünün korunması, fenol metabolizması, RNA metabolizması ve IAA metabolizması şeklinde sıralanabilir (Parr ve Loughman 1983).

Yüksek bitkiler için hücre duvarı, bitki gelişimi süresince hücre şeklini ve büyüklüğünü belirleyen önemli bir faktördür. Hücre duvarının mekanik özellikleri, yapısındaki selülozik polimerler ile hemiselülozik ve pektik polisakkaritler arasındaki bağlanmalara göre değişebilir. Hücresel B'un %90'ı hücre duvarında lokalize olmuştur. B noksanlığının ilk belirtisi hücre duvarında ve orta lamel organizasyonunda anormallikler olarak ortaya çıkar (Hu ve Brown 1994, Loomis ve Durst 1992, Matoh ve ark 1992).

Son zamanlarda hücre duvarı karbonhidrat/glikoproteinlerinin hidroksil gruplarıyla borat esterleri oluşturduklarının tespit edilmesi, hücre duvarı polimerlerinin çapraz bağlandıklarını düşündürmektedir (Loomis ve Durst 1992).

Borat köprüsü karakteristik eksiklik ve toksite belirtilerini açıklamaktadır. Bu tip bağlanma noksanlıkta yaprakların kırılgan, toksitede ise elastik olmasını sağlamaktadır. Hücre duvarının ilk zamanlardaki kayganlık özelliği borat molekülleri ile hidroksil grupları arasındaki H bağları sonucu oluşmaktadır (Carpita 1987).

Loomis ve Durst (1992) hücre duvarı polimerleriyle borat köprüsüne katılan özel moleküller belirlemişlerdir. Borat, furonoid halka üzerinde *cis-diol*lerle çok kararlı diesterler oluşturabilir. Bitkilerde bu konfigürasyona sahip moleküller riboz ve apiozdur. Daha çok nükleotitlerde bulunan ribozun B toksitesinde etkin rol alabileceği düşünülmektedir. Fukoz ve ksiloglukanların da borat köprüsünde yer aldığı tahmin edilmektedir (Carpita ve Gibeaut 1993). Buğdaygiller dışında pek çok yüksek bitkinin hücre duvarında bulunan ksiloglukan ve rhamnogalakturonanların uç kısımlarında fukoz taşıdıkları bilinmektedir.

Kobayashi ve ark. (1996) yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarlarındaki rhamnogalakturonan II'ye (RG-II) ait iki zincirin borat-diol ester bağları ile birbirine bağlandığını göstermişlerdir.

RG-II düşük moleküler ağırlığa sahip (5-10 kD) bir pektik polisakkarit olup farklı 11 glikozil bileşiği içermektedir. RG-II'nin temel iskeleti en az 8 adet α-D-Gal*p*A (1.4) bileşiği içerir. Yapıları farklı iki disakkarit (C ve D) C-3'e bağlanırken yapıları farklı iki oligosakkarit (A ve B) C-2'ye tutunmuş haldedir (Glushka ve ark. 2003, Vidal ve ark. 2000).

Yapılan laboratuar çalışmaları RG-II monomer ve dimerlerinin birbirine kolayca dönüşebildiklerini göstermiştir. RG-II dimeri düşük pH'da (pH<2) 30 dakikada monomere dönüşürken, RG-II monomeri borik asit varlığında pH 3.5-4 arasında 24 saatte dimer oluşturmaktadır. Kalsiyumun monomerler arasındaki borat köprüsünün kararlılığını artırdığı yine bu çalışmalarda tespit edilmiştir (Kobayashi ve ark.1996, Fleischer ve ark. 1999).

B ile hücre duvarındaki pektik bileşikler arasındaki ilişki ilk defa 1933'te öne sürülmüştür. Son zamanlarda yapılan araştırmalar bitkinin B ihtiyacı ile hücre duvarının pektin içeriği arasındaki bağlantıyı doğrulamaktadır (Hu ve ark. 1996).

Çayır bitkileri gibi hücre duvarları pektin içeriği düşük bitkilerin B ihtiyacı çift çenekli ve buğdaygil olmayan tek çenkli bitkilerden çok daha azdır. Bazı araştırıcılar B'un bitkilerdeki yapısal rolünün primer hücre duvarının fiziksel ve

biyokimyasal özelliklerinin kontrolünde pektinlerle oluşturdukları köprünün önemli olduğunu öne sürmüşlerdir. Berlin'deki CCRC (Complex Carbohydrate Research Center) araştırma merkezinde yapılan çalışmalar bu konudaki şüpheleri gidermiştir. *Chenopodium album* hücreleri B'suz ortamda logaritmik fazda bölünebilmişledir fakat hücre duvarlarının normal por büyüklüğünden (~3.5 nm) daha büyük porlara (~6 nm) sahip oldukları ve durağan fazda yırtıldıkları görülmüştür. B noksan hücrelerin duvarları RG-II monomerleri içerdiği halde borat köprüsüyle bağlanmış RG-II dimerleri içermemektedir. Yeter miktarda borik asit ilave edildiğinde *Chenopodium album* hücrelerinin duvar por aralıkları hızlı bir şekilde azalmış ve RG-II dimerleri de oluşmuştur (Fleischer ve ark. 1999). B noksan tütün hücrelerinin de kırılgan bir yapıya sahip olduğu ve RG-II bileşiğinin sadece %40'ının dimer oluşturduğu tespit edilmiştir (O'Neill ve ark. 2001).

Fukoz bakımından mutant olan Arabidopsis bitkisinin kısa boylu ve yapraklarının kırılgan olduğu belirtilmiştir. Yabani tip bitkide %95 RG-II dimer oluşumu gözlenirken mutant bitkide bu oran ancak %50 olmuştur. Mutant bitkiye yapraktan sıvı borat çözeltisi ve fukoz uygulandığında mutant bitkinin RG-II dimer oluşumu, kararlılığı ve B ihtiyacı yabani tip bitkininkine yakın olmuştur (O'Neill ve ark. 2001).

Arabidopsis'de *bor1* mutantı bitkilerin aşırı kısa boylu olduğu tespit edilmiştir (Noguchi ve ark. 1997). *bor1* geni, hücre zarında lokalize olmuş ve B'un periskl hücrelerinden kök taşıma hücrelerine taşınmasında rol oynayan bir protein kodlar. *bor1*, ksilem özsuyundaki B konsantrasyonunu artırarak bitkinin toprak üstü organlarını B noksanlığından korur (Takano ve ark. 2002). Yabani tip ve *bor1* mutantı bitkiler benzer yapıda RG-II kompleksine sahipken mutantlarda RG-II-Borat oluşumu yalnızca %40 olmuştur. Gövdedeki B eksikliğinin sebep olduğu RG-II dimer oluşumundaki düşüklük bitki boyunun kısa kalmasına neden olmuştur. Mutant bitkiye B verildiğinde RG-II dimer oluşumu ve bitki boyu normal seviyeye ulaşmıştır (Noguchi ve ark. 1997).

Ayrıca RG-II'nin Pb gibi ağır metallere afinitesinin yüksek olduğu da tespit edilmiştir (Vidal ve ark. 2003, Gomez 2004). Bu durum RG-II'nin gerek sağlık alanında gerekse çevre kirliliğinin giderilmesinde (Fitoremediasyon) önemli rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (Hakkı ve ark. 2005a).

B'un hücre membranı bütünlüğünde ve membran yapısında rol oynadığına ilişkin veriler bulunmaktadır (Shelp ve ark. 1995).

Yeterli miktarda B verilmiş bezelye ve mısır bitkilerinde, yetersiz B verilenlerle karşılaştırıldığında, kök uçlarında fosfor alınımının çok az olduğu bulunmuştur. Denemenin 2. aşamasında her guruptaki bitkiler (yeterli B'lu ve yetersiz B'lu) uygulama öncesi 1 saat B'la muamele edilmişler ve bu uygulama hem B'ca fakir bitkilerin hem de B'ca zengin bitkilerin fosfor alınım miktarlarını arttırmıştır (Pollard ve ark. 1977).

Çakmak ve ark. (1995) yapmış oldukları çalışmada B içeriği düşük ayçiçeği yapraklarının hücre zarında K^+, fenolik bileşikler, aminoasitler ve sukroz bakımından eksiklikler tespit etmişlerdir.

B, membran bütünlüğünün korunmasında ve tonoplast taşıma kapasitesi üzerine etkilidir. Ayrıca B, hücre zarından fosfat geçişinde önemli bir role sahiptir (Parr ve Lougman 1983).

B noksan ortamdaki mısır köklerinde düşük olan membrana bağlı ATPaz aktivitesinin, B uygulamasını izleyen 1 saat içinde, B'ca yeterli köklerdeki aktivite seviyesine ulaştığı saptanmıştır. B'un bitki köklerinde çeşitli mineral iyonlar ve glukoz alınımı üzerindeki etkisinde, plazma membranına bağlı H^+ pompalayan ATPaz üzerinde direkt veya dolaylı yoldan ilişkisinin etkili olduğu belirtilmektedir (Goldbach 1985).

B noksanlığında, çeşitli bitki dokularında DNA sentezi ve miktarında bir azalma olduğu Shkolnik'in 1974'te yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Ancak B eksikliğinin, DNA miktarındaki değişimleri birincil olarak mı, yoksa ikincil olaylar sonucu mu meydana getirdiği henüz tartışılmaktadır. Yapılan diğer bir araştırmada, yüksek seviyede B'un IAA oksidaz konsantrasyonunu azaltarak köklerde oksin akümülasyonuna neden olduğu ve sonuçta bitkinin kalsiyumu absorblama yeteneğinin engellendiği gözlemlenmiştir (Ayvaz 2002).

Agarwala ve ark.'na (1981) göre, B aynı zamanda, polen tanesinin canlılığını ve anterin polen üretme kapasitesini artırarak, döllenme olayına da olumlu katkılarda bulunmaktadır. B'un bitkilerdeki tozlaşma ve döllenme üzerindeki dolaylı etkileri ise, nektarlardaki şeker miktarını ve bileşimini arttırması şeklinde gerçekleşmektedir. Bu durum, özellikle tozlaşma ve döllenmesi böceklere bağlı olan

bitki türlerinin daha avantajlı konuma geçmesinde önemli rol oynamaktadır (Ayvaz 2002).

2.4. Bitkilerde B Stresi ile İlgili Araştırmalar

Dünya'da tarım yapılabilecek toprakların yaklaşık olarak dörtte birlik kısmının bitkilerde çeşitli mineral streslerini oluşturduğu düşünülmektedir (Dudal 1976).

B'un bitkilerde toksiteye veya noksanlığa yol açan konsantrasyonları arasında oldukça dar bir aralık olmasından dolayı bitkilerin B'la beslenmesi diğer besin elementlerine göre oldukça kritiktir (Marschner 1995, Goldberg 1997).

Kurak ve yarı kurak iklim bölgeleri topraklarının fazla B içermesi, söz konusu bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde ve özellikle tahıllarda B toksitesinin yaygın bir beslenme problemi olmasına yol açmaktadır. Örneğin, Güney Avustralya'da kurak ve yarı kurak bölgelerden alınan bitki ve toprak örneklerinde çok yüksek B konsantrasyonlarına rastlanmıştır. Güney Avustralya'da yaygın tahıl üretiminin yapıldığı alanlarda topraklarda doğal olarak bulunan B'un tahıllarda (özellikle arpada) B toksitesine yol açtığı ve ayrıca söz konusu bölgelerde yetiştirilen buğday, yulaf, bezelye ve mera bitki türlerinde önemli verim düşüşlerine neden olduğu kaydedilmiştir (Cartwrigth ve ark. 1984, 1986).

B toksitesinin buğdayda özellikle bitki boyunun uzamasını ve yeşil aksam gelişimini durduran, büyümeyi geciktiren ve kök gelişimini azaltan bir problem olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Paul ve ark. 1988, Huang ve Graham 1990).

Hakkı ve ark. (2005b) tarafından yürütülen ve B-Fe interaksiyonuna bakılan bezelye ile ilgili bir çalışmada ise yüksek dozda (20 mg kg^{-1}) B uygulamasının, bezelyede buğdayın aksine bitki boyunda belirgin bir şekilde artışa sebep olduğu gösterilmiştir.

2.5. Bitkilerde B'a Karşı Genotipik Farklılıklar ile İlgili Araştırmalar

Kültür bitkileri B ihtiyaçları bakımından hassas, dayanıklı ve yarı dayanıklı olmak üzere üç gruba ayrılır. Tek çenekli bitkiler çift çenekli bitkilere göre daha az B'a ihtiyaç duyarlar. Bu oranlar, çeltikte 5-15 mgBkg^{-1} k.m., mısırda 5-25 mgBkg^{-1} k.m., buğdayda (yazlık) 6-10 mgBkg^{-1} k.m., buğdayda 6-17 mgBkg^{-1} k.m., arpada 6-21 mgBkg^{-1} k.m. ve yulafta 14-24 mgBkg^{-1} k.m.'dir (Bergmann 1992, Gezgin ve ark. 2005).

Bitkilerin ihtiyaç duydukları B miktarı oldukça azdır. Gerek duyulan B'un çok az da olsa fazlası, B noksanlığında olduğu gibi bitkinin gelişmesi üzerine olumsuz etki yapmakta ve gelişme çoğu kez durmaktadır. Normal beslenen bitkiler 25-100 mg kg^{-1} arasında B içerirler. Bitki kuru maddesinde 20 mg kg^{-1} B'u kritik düzey olarak nitelendirmişlerse de bitkilerin B kapsamları arasında dikkate değer farklılıklar vardır ve bitkilerin B kapsamları yetiştirildikleri ortamlarda bulunan bitkilere yarayışlı B miktarı ile yakından ilgilidir (Scaife ve Turner 1983).

Tahıllar B'a karşı duyarlı bitkilerdir. Buğday yetişme ortamında 2 mg kg^{-1}'e kadar B'u tolere etmekte ve bu dozun üzerindeki B'dan ise olumsuz yönde etkilenmektedir. Arpa ve buğday gibi monokotiledon bitkiler 20-70 mg kg^{-1} B kapsamaktadır (Gupta ve ark. 1985).

Bitki türleri arasında olduğu gibi, aynı türün çeşitleri arasında da B'a duyarlılıkta büyük farklılıkların olduğu ve bu farklılıkların nedeninin de bitkilerin B toksitesinden fizyolojik olarak aynı derecede etkilenmemesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Paull ve ark. 1988, Nable 1991).

B toksitesine direnç gösteren buğday çeşitleri 150 mg B kg^{-1} uygulanan toprakta yetiştirildiklerinde üründe önemli bir azalma göstermezlerken, aynı konsantrasyonda yetiştirilen B'a duyarlı çeşitlerde ise şiddetli ürün kayıpları olmakta ve hatta bu çeşitler 25 mg B kg^{-1} uygulamasında dahi verim azalması göstermektedir (Paul ve ark. 1988).

Buğday çeşitlerinin B'a gösterdikleri tepkiler farklı olmasına karşın, yüksek dozda B uygulaması çesitlerin çoğunda kuru ağırlığı azaltmaktadır (Nable 1988, Barut 1997).

Torun ve ark. (2006) 70 makarnalık buğday genotipi ile B toksitesine karşı genotipik farklılığın boyutunu araştırmak amacıyla, ekstrakte edilebilir B'un 12 mg kg^{-1} olduğu bir toprakta iki ayrı B dozu uygulayarak (25 mg B kg^{-1} toprak; 0 mg B kg^{-1} toprak) bir sera çalışması yapmışlardır. Genotipler arasında topraktaki B toksitesine karşı, toksite belirtilerinin şiddeti ve büyümedeki azalma bakımından büyük bir genotipik varyasyonun olduğu bulunmuştur. Genotiplerden Sabil-1, Stn "S", Aconhi-89 ve Wadelmez-2'in B uygulamasından etkilenmediği ve hatta bu genotiplerde B'dan dolayı büyümede bir artma eğilimi ortaya çıktığı belirlenmiştir. Buna karşılık Lagost-3, Dicle-74, Brachoua/134xS-61 ve Gerbrach genotiplerinde büyümede bir azalma görülmüştür. Yeşil aksam B konsantrasyonu ile B'dan dolayı kuru madde azalması arasında ise bir ilişki bulunamamıştır. Bu sonuçların genotipler arasında görülen B toleransının, B'un köklerce alınmayarak dışarıda tutulma mekanizması ile ilişkili olmadığını, B'un hücre duvarında tutulması gibi içsel tolerans mekanizmalarının daha kabul edilebilir olduğunu gösterdiği düşünülmektedir.

Topal ve ark. (2002) makarnalık (Ç-1252) buğday üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, farklı B dozlarının (0, 1, 2, 3 $kgha^{-1}$) dane verimi, m^2'deki başak sayısı, her başaktaki dane sayısı, her başaktaki toplam başakçık sayısı, fertil başakçık sayısı ve steril başakçık sayısı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Artan B dozlarına paralel olarak (2 $kgha^{-1}$'a kadar) bu parametreler artış göstermiş, fakat 3 $kgha^{-1}$ B dozunda ise bir azalma tespit edilmiştir.

Soylu ve ark. (2004) durum buğdayları ile ilgili (Kızıltan-91, Ç-1252, Selçuklu 97, Kunduru 1149, Yılmaz-98 ve Çakmak-79) yaptıkları çalışmalarda aynı toprakta ekimi yapılan çeşitlerin B ihtiyaçlarının ve alım kapasitelerinin çok farklı olduğunu (genotipik varyasyonun çok yüksek olduğunu) tespit etmişlerdir.

Soylu ve ark. (2005) kireç oranı yüksek, B noksan topraklarda iki yıl süren bir tarla denemesinde 6 makarnalık (Kızıltan-91, Ç-1252, Selçuklu-97, Kunduru-1149, Yılmaz-98 ve Çakmak-79) ve 6 ekmeklik (Kınacı-97, Göksu-99, Türkmen, Bezostaja-1 ve Sultan-95) buğday çeşidinin B uygulamalarına (3 kg ha^{-1}) tepkilerini araştırmışlardır. Makarnalık buğdaylar ortalama %9.6, ekmeklik çeşitler ise %10.9 dane verim artışı göstermiştir. Makarnalık buğdaylardan Kızıltan-91 ve Yılmaz-98 B eksikliğine hassas iken Ç-1252 ve Çakmak-79 dayanıklı olarak tespit edilmiştir.

Ekmeklik buğdaylardan ise Gün-91 ve Bezostaja-1 hassas iken Kınacı-97 ve Sultan-95 dirençli olarak tespit edilmiştir.

Jefferies ve ark. (1999) arpada B toksitesine toleransı kontrol eden genlerin kromozomlarda bulunduğu yerleri ve bunun kalıtımını araştırmışlardır. B toksitesine toleranslı Sahara 3771 ile hassas Clipper arpa çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 150 haploid hattın katlanmasıyla oluşan Clipper x Sahara populasyonunun RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism= Kesilen Parça Uzunluğu Polimorfizmi) bağlantı haritası, arpada B toleransıyla ilgili kromozom bölgelerinin teşhisinde kullanılmıştır. B toleransının göstergesi olarak kabul edilebilen özelliklerin bağlı bulunduğu 4 kromozomal bölge tespit edilmiştir.

Mahboobi ve ark. (2000) 10 günlük B toksitesine dayanıklı Anadolu ve duyarlı Hamidiye arpa çeşitlerini 5 gün boyunca konsantrasyonu 10 mM olan H_3BO_3 çözeltisinde yetiştirerek kök ve yaprak proteinlerindeki değişiklikleri iki boyutlu jel elektroforez yöntemi ile belirlemişlerdir. Analizler, B uygulamasının kök ve yaprak dokularında, çok sayıda proteinde artmaya ya da azalmaya neden olduğunu göstermiştir. B uygulamasıyla toleranslı çeşitlerin kök profillerinde yeni bir proteinin sentezlendiği tespit edilmiş, duyarlı çeşitlerde bu proteine rastlanmamıştır. Toleranslı çeşitlerde kökte 3 proteinin miktarı artarken, duyarlı çeşitlerde değişiklik olmamıştır. Toksik B konsantrasyonlarının köklere göre yapraklardaki polipeptit kompozisyonunu daha fazla değiştirdiği tespit edilmiştir. Yaprak dokularında duyarlı çeşitlerde herhangi bir değişiklik olmazken toleranslı çeşitlerde en az 7 proteinin miktarı artmıştır. Özellikle sürgün düzeyindeki bu değişikliklerin B toksitesine tolerans mekanizmasının bir göstergesi olduğu düşünülmüş ve arpada bazı proteinlerin B toksitesine toleransta rol alabileceği ifade edilmiştir.

Atalay ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada makarnalık buğday (Kızıltan-91) ve arpa (Tokak-157/37) *in-vitro* fidelerinin B alım ve biriktirme durumlarını araştırmışlardır. Tohumlar B_0-B_1-B_2-B_3-B_4 (0-6.2-18.6-55.8-111.6 mgl^{-1} H_3BO_3 içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kızıltan-91'de en az B birikimi B_0 dozunda, en çok ise 15.1 μgBg^{-1} ile B_4 ortamından elde edilmiştir. Tokak-157/37'de ise en düşük B birikim 0.53 μgBg^{-1} ile B_0 ortamından, en yüksek ise 17.3 μgBg^{-1} ile B_4'de olmuştur.

Hamurcu ve ark. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada kontrollü sera koşullarında farklı seviyelerde uygulanan B (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mg kg^{-1}) ve demirin (0, 6, 12, 24 mg kg^{-1}) makarnalık buğdayın kuru madde miktarı, B konsantrasyonu ve içeriği, demir konsantrasyonu ve içeriği, Zn, Cu, Mn konsantrasyonları üzerine etkisi belirlenmiştir. Bitkide uygulanan B dozu miktarı arttıkça B konsantrasyonunun arttığı, demir miktarı arttıkça demir konsantrasyonunun belli bir noktaya kadar artış gösterdiği, belli bir seviyeden sonra ise düştüğü belirlenmiştir. Uygulanan B miktarının bitkinin demir alımı üzerine bir etkisinin olmadığı, demir uygulamasının ise uygulanan demir miktarının artışına bağlı olarak bitkinin B alımını azalttığı belirlenmiştir.

Yorgancılar ve Babaoğlu (2005) makarnalık (*Triticum durum Desf.*, Kızıltan-91, Kunduru-1149, Selçuklu-97) ve ekmeklik (*Triticum aestivum L.*, Bezostoja-1, Gerek-79, Gün-91) buğday çeşitlerinde farklı B uygulamalarının çimlenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. 0, 1.08, 3.24, 9.72, 29.16 mg B kg^{-1} içeren MS besin ortamı ve saksı denemelerinde çimlenme üzerine B dozlarının etkisi her iki şartta da önemli bulunmazken, çeşitlerin ve çeşit x bor interaksiyonunun etkisi ise önemli bulunmuştur. Buğdayda çimlenmeyi engelleyecek minimum B seviyesi eşiği olarak 29.16 mg B kg^{-1} tespit edilmiştir.

Nable ve ark. (1997) bitkilerin yüksek B konsantrasyonlarına gösterdikleri tepkide çok geniş genetik varyasyonun bulunduğunu, bu genetik varyasyonun bitki türlerinin çoğunda benzer tolerans mekanizmasına (sürgün ve köklerdeki düşük B alımına) sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Tolerans mekanizmasının birkaç baskın eklemeli gen ile idare edildiği, bazı türlerde belirli kromozom bölgelerinin toleransla ilgisinin olduğu tespit edilmiştir.

Brown ve Hu (1998) belirli türlerde B hareketinin bilinmesinin, bitkideki B durumunu teşhis etmek için kullanılması gereken yaklaşımın belirlenmesinde kolaylık sağlayacağını ifade etmişlerdir. Bunun aynı zamanda B eksikliğinin sebeplerini ve sonuçlarını anlamaya yardımcı olacağı ve kullanılması gereken optimum gübre miktarının belirlenmesini de sağlayacağı ifade edilmiştir.

Nable (1988) arpa ve buğdayı su kültüründe 35 gün boyunca 15 µM'dan 5.000 µM'a kadar artan B konsantrasyonlarında yetiştirmiştir. Tüm genotiplerde

artan konsantrasyona bağlı olarak bitkinin bütün kısımlarında B artışı olduğu ancak bu artışın dayanıklı genotiplerde daha az olduğu belirlenmiştir.

Campbell ve ark. (1998) yüksek B'a farklı tepkiler verdiği bilinen beş buğday çeşidinin fidelerine yedi farklı B konsantrasyonu (0, 1.55, 3.1, 4.6, 6.2, 7.7, 9.3mgl^{-1} H_3BO_3) uygulayarak kök uzunluklarını ölçmüş ve tolerans indeksini belirlenmeye çalışmışlardır. B uygulanmayan bitkilerde kök uzunlukları fazla bir artış göstermemiştir. B dozu artırıldıkça kök uzunluklarında bir azalma meydana gelmiş ve bu durum hassas çeşitlerde daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

Rerkasem ve Jamjod (1997) yaptıkları çalışmada türler arası ve tür içi B'a toleranstaki farklılığın derecesini, tolerans mekanizmasının fizyolojisini, kalıtımdaki genetik tabanını, genotipik farklılığın pratik uygulamalarda kullanılmasını araştırmışlardır. B'a toleranslılık özelliği bir seleksiyon kriteri olarak kullanılırsa B noksan topraklardaki büyük ürün kayıpları engellenebilir. Ek olarak B noksanlığı sonucu oluşan erkek kısırlığı kendine döllek bitkilerin çaprazlanmalarında avantaj sağlayacaktır. Böylece yan yana yetiştirilen B'a toleranslı ve hassas genotipler arasından saf hatlar elde edilecektir. Hem hibrit tohum üretiminde hem de heterezigot populasyonların oluşturulmasında basit ve ekonomik bir metod oluşturulacaktır. Toplam 68 buğday genotipine 0-0.2-1 μM B uygulanmış ve bazı genotiplerin ürün verimleri diğerlerine göre daha yüksek olmuştur.

Rerkasem ve ark. (2004) buğdayda B eksikliğinin 1960 yılından beri bilindiğini ve buğdayın B eksikliğine dikotiledon bitkilerden daha fazla eğilimli olduğunu belirtmişlerdir. B fazlalığının buğdayda büyüme ve gelişmeyi etkilediği bilinse de özellikle eksikliği ticari açıdan önemli derecede verim kayıplarına neden olmaktadır. Buğday genotiplerinin B'a karşı tepkileri bakımından farklılık gösterdiği, bazı genotiplerin düşük B'lu topraklarda yetiştirilirken verimlerinin değişmediği fakat bazı genotiplerin de bu topraklarda B eksikliğinden etkilendiklerini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak, Soylu ve ark.'nın (2005) iki yıl süren tarla çalışmaları sonucunda B noksanlığına hassas ve dayanıklı olarak nitelendirdiği Kızıltan-91 ve Çakmak-79 makarnalık buğday (*Triticum durum* L., 2n=4x=28) çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitler Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden tek başak halinde temin edilmiştir. Çeşitlerin genel özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan çeşitlerin genel özellikleri (Kün 1996)

Çeşidin İsmi	Özellikleri
Kızıltan-91:	Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından 1987 yılında tescil edilen bu çeşit, sert, beyaz, camsı tanelidir. Kılçıklı ve kahverengi kavuzlu, başakları orta-uzun, orta-sık ve dik bir yapıya sahiptir. Bin dane ağırlığı 46-48 g olup sap uzunluğu 90-95 cm'dir. Yatmaya dayanıklı olup, kuraklığa orta derecede dayanıklıdır. Makarnalık kalitesi orta derecelidir.
Çakmak-79:	Orta Anadolu Zirai Araştırma Enstitüsünde 1975 yılında elde edilmiş ve 1979 yılında tescil ettirilmiş melez bir çeşittir. Kısa boylu, yatmaya, kuraklığa ve kışa dayanıklıdır. Kahverengi kavuzlu, dane dökmeye mukavim ve yüksek verimli bir çeşittir. Amber renkli danesinin bin dane ağırlığı 55 g civarındadır. Makarnalık kalitesi çok iyidir.

Laboratuar çalışmaları S.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik Araştırma Laboratuarı ile Toprak Bölümü Elementel Analiz Laboratuarı'nda yürütülmüştür.

3.2. Metod

Bu çalışmada, makarnalık buğday çeşitlerinin B elementi alım mekanizmasının moleküler seviyede araştırılması amacıyla, Kızıltan-91 ve Çakmak-79 makarnalık buğday çeşitlerine farklı seviyede B dozları uygulanmıştır. Bu amaçla öncelikle tohumlardaki B miktarları tespit edilmiştir. Sonra su kültürü çalışması için tohumlar kavanozlarda çimlendirilmiştir. Çimlenen fideler sırasıyla, kritik seviyede (0.49 mg B kg^{-1}) B içeren (Gezgin ve ark.2002) Hoagland besin ortamında (H), hiç B içermeyen Hoagland besin ortamında (B_0), yeterli seviyede (1.08 mg B kg^{-1}) B içeren (Gupta ve ark. 1985) Hoagland besin ortamında (B_1) ve aşırı toksik seviyede (108 mg B kg^{-1}) B içeren Hoagland besin ortamında (B_{100}) büyütülmüştür. Büyütülen fidelerden, belirlenen zamanlarda, RNA izolasyonu ve B konsantrasyon tespiti için örnekler alınmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon

Sterilizasyon çalışma esnasında oluşabilecek kontaminasyon riskini engellemek amacıyla yapılması son derece önemli olan bir işlemdir.

Gerek tohumların çimlendirilmesi gerekse RNA izolasyonu aşamasında sterilizasyon yapılmıştır. Steril çalışmalar 0.22 µm porozitede hepa filtrelere sahip yatay hava akışlı (0.5 ms^{-1}) kabin (*Laminar air-flow cabinet*) içinde gerçekleştirilmiştir. Steril çalışmalara başlamadan önce yatay hava akışlı kabinin içi % 96'lık etil alkolle silinmiş ve kabin içi 20 dakika süreyle açık bırakılan ultra-viyole (U.V.) lambası ile sterilize edilmiştir.

Çimlendirme aşamasında öncelikle kavanozlar steril edilmiştir. Kavanozlar temin edildikten sonra içlerine 100 g perlit konulmuştur. Danenin su ihtiyacını karşılamak amacıyla 50 ml saf su ilave edildikten sonra otoklavda (Hirayama, Hiclive HV–85) 20 dakika boyunca 121 °C'de 1.5 atm basınç altında sterilize edilmiştir.

Tohumların sterilizasyonu da son derece önemlidir. Tohum içerisinde her hangi bir hastalık etmeni taşıyabilir. Bu riski önlemek için buğday daneleri steril

edilmiştir. Daneler 0.5 dk alkolde bekletilmiş, steril saf su ile yıkanmış ve 15 dk %5'lik NaOCl çözeltisinde tutulduktan sonra tekrar steril saf su ile yıkanmıştır.

RNA izolasyonları sırasında kullanılan porselen havanlar herhangi bir bulaşmayı önlemek amacıyla önce %96'lık etanol, daha sonra RNase off (Ambion) ile temizlenmiştir. Temizlenen havanlar, alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 170 ^{o}C'de 6 saat sıcak hava fırınında (etüv) bekletilmiştir.

3.2.2. Tohumlardaki B miktarlarının belirlenmesi

Temin edilen tohumlardaki mevcut B element içeriği ICP-AES cihazı (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) (Varian-Vista Model, axiel) ile tespit edilmiştir.

Her iki çeşidin başaklarından elde edilen daneler 0,0001 hassasiyetindeki terazi ile tartılıp her bir örneğin üzerine nitrik asit (HNO_3) ilave edilerek 25-30 dakika kadar gaz çıkışı olması için beklendikten sonra mikrodalga (CEM-Mars 5) fırınına yerleştirilmiştir. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra cam balonlara aktarılan numunelerin hacmi deiyonize su ile tamamlanmıştır. Kapaklı plastik kaplara mavi bantlı filtre kağıdıyla süzülerek aktarılan numuneler buzdolabında okuma yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Okumalar B analizleri bölümünde belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.2.3. Danelerin çimlendirilmesi

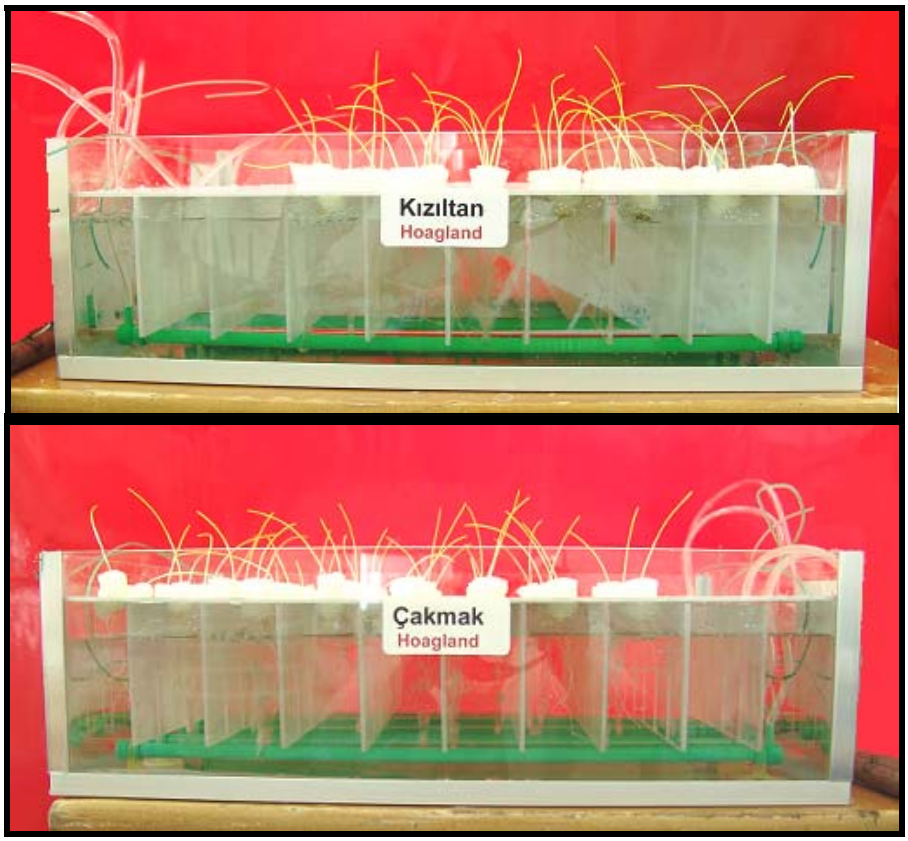
Her bir çeşide ait 45'er adet dane kullanılmıştır. Steril daneler perlit dolu kavanozlara laminar kabin içinde steril pens ile yerleştirilerek kavanozların kapakları kapatılmıştır. Kavanozlar +4 ^{o}C'de bir gün tutulduktun sonra, oda sıcaklığında ve karanlıkta bir hafta bekletilerek çimlenmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bitkilerin çimlendirilmesi

3.2.4. Su kültürü çalışması

Su kültüründe 70x50x15 cm ve 20x20x15 ebatlarında cam tanklar, tanklar içerisinde bitki köklerinin birbirine karışmasını engelleyen plastik bölmeler ve fidelerin tank üzerinde durabilmesi için plastik tabla kullanılmıştır. Kullanılan araçlar element bulaşmasını engellemek amacıyla yıkama çözeltisinden (HCl + HNO_3) geçirilmiştir. Fideler tabla üzerindeki deliklere dip kısımlarından sünger sarılmak suretiyle sabitlenmiştir. Hava sirkülasyonu için kullanılan kompresör sayesinde elementel homojenlik sağlanmıştır. Çözelti, içerisindeki besin elementlerinin sabit seviyede tutulabilmesi için, 3 günde bir değiştirilmiştir. Fideler, üzeri daha önceden delinmiş ve numaralandırılmış plaka üzerine her bir deliğe bir bitki gelecek şekilde 45 adet fide yerleştirilmiş ve tankların etrafı, bitki köklerinin güneş ışığından etkilenmemesi ve yosun gelişiminin engellenmesi için alüminyum folyo ile kapatılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bitki fidelerinin su kültürüne aktarılması

3.2.4.1. Fidelerin Hoagland su kültürüne aktarılması

Bitkiler normal büyüme ve gelişimini sürdürebilmeleri için bulundukları ortamdan ihtiyaç duydukları besin elementlerini almaları gerekir. Bunu sağlamak amacıyla su kültürü çalışmalarında Hoagland besin çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltinin hazırlanmasına ait işlemler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çimlendirilen fideler ilk olarak Hoagland besin ortamına (0,49 mg B kg^{-1} içeren) yerleştirilmiştir. Fideler bu ortamda 10 gün süresince büyütülmüştür.

Ayrıca, 10 gün sonunda her bir çeşitten RNA ve ICP analizi için örnek alınmıştır. Özellikle RNA analiz örnekleri alınırken bitki RNA'sının dış etkenlerden korunması için RNase off ile muamele edilmiş eldivenler ve önceden hazırlanmış temiz poşetler kullanılmıştır. RNA analiz örnekleri sıvı azotta ani şoklama ile dondurularak -80 ^{o}C derin dondurucuda RNA izolasyonuna kadar saklanmıştır. ICP

örnekleri ise 70 ^{o}C'de etüvde kurutularak kuru ağırlıkları alındıktan sonra oda sıcaklığında tutulmuştur.

Çizelge 3.2. Hoagland besin ortamının hazırlanması (Gamborg ve Wetter 1975)

Solüsyon A	**Solüsyon B**	**Solüsyon C**
280 mg H_3BO_3 340 mg $MnSO_4$. H_2O 10 mg $CuSO_4$. $5H_2O$ 22 mg $ZnSO_4$. $7H_2O$ 10 mg $(NH_4)_6MO_7O_{24}$. $4H_2O$ Hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır. 4°C'de saklanır.	0.5 ml derişik H_2SO_4 Hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır. 4°C'de saklanır.	3.36 g Na_2EDTA 2.79 g $FeSO_4$ Hacim yaklaşık 400 ml olarak ayarlanır. Daha sonra solüsyon 70°C'ye sarı-kahverengi renk oluşuncaya kadar ısıtılır. Soğutulduktan sonra hacim 500 ml'ye tamamlanır. 4°C'de saklanır
10x Hoagland stok Solüsyon	**1x Hoagland Besin solüsyonu**	**0.1x Hoagland Besin solüsyonu**
4.7 g $Ca(NO_3)_2$. $4H_2O$ 2.6 g $MgSO_4$. $7H_2O$ 3.3 g KNO_3 0.6 g $NH_4H_2PO_4$ 5 ml solüsyon A 0.5 ml solüsyon B Hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanır. 4°C'de saklanır.	100 ml 10x stok solüsyon 5 ml solüsyon C Hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.	10 ml 10x stok solüsyon 0.5 ml solüsyon C Hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.

3.2.4.2. Fidelerin B'suz Hoagland su kültürüne aktarılması

Fideler Hoagland çözeltisinde (0.49 mg B kg^{-1}) 10 gün yetiştirildikten sonra B dışındaki diğer besin elementlerini içeren kültür ortamına (B'suz Hoagland çözeltisi) aktarılmıştır. Aktarımdan sonra 24. saatte RNA ve B analiz örnekleri alınmıştır.

3.2.4.3. Fidelerin yeterli ve toksik seviyede B içeren Hoagland su kültürü çözeltilerine aktarılması

B'suz ortamda büyütülen her bir çeşide ait fidelerin yarısı 1.08 mg B kg^{-1} içeren, diğer yarısı da 108 mg B kg^{-1} içeren Hoagland su kültürüne transfer

edilmiştir. Aktarımdan 3, 6, 12 ve 24 saat sonra RNA ve B analiz örnekleri alınarak deneme sonlandırılmıştır.

3.2.5. Moleküler genetik çalışmalar

3.2.5.1. Klonlama çalışmaları

3.2.5.1.1. Primer tasarımı

Arabidopsis thaliana genomu sekanslanan ilk bitkidir. B'un kökten gövdeye taşınmasında rol oynayan *bor1* geni ilk defa bu bitkiden izole edilmiştir (Takano ve ark. 2002). B'un taşınmasında rol oynadığı tahmin edilen *Bor3* geni ise, genomu sekanslanan ilk ekonomik değere sahip bitki olan çeltikten izole edilmiştir (Gu ve ark. 2003). Buğdayda bu gen ile ilgili bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Buğdayda bu çalışmayı yapmak için daha önce Arabidopsis ve çeltikte tespit edilen sekanslar kullanılmıştır.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan *bor1* ve *Bor3*'e ait sekanslar araştırılmıştır. Arabidopsis bitkisinde *bor1'e* ait sekans için AB073713 aksesyon numarası, *Bor3*'e ait sekans için ise AY339063 aksesyon numarası ile bu genlerin nükleotit dizilerine ulaşılmıştır. Bu sekanslar DNASTAR sekans analiz programı ile düzenlenmiştir. Düzenlenen sekanslar aynı program aracılığıyla karşılaştırılıp, uygun nükleotid dizileri tespit edilmiştir (Ek-1). Ekspresyon çalışmalarında ilgilendiğimiz genin sentezlenme düzeyini, hücrede sürekli ekspresyonu yapılan *ubiquitin* geni ile kontrol etmemiz mümkündür. *Ubiguitin* geni baz alınarak ekspresyon yanma değerleri hesaplanabilmektedir. Bu gene ait sekans bilgisine ise NCBI gen bankasından AY297059 aksesyon numarası girilerek ulaşılmıştır. Bu sekanslar dikkate alınarak Primer3 (Primer Design) programı ile PCR işlemi sırasında kullanılan primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan bu primerlerin sentezlenmesi ticari bir firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Primerlerle ilgili temel bilgiler ve DNA dizileri Çizelge 3.3'te yer almaktadır.

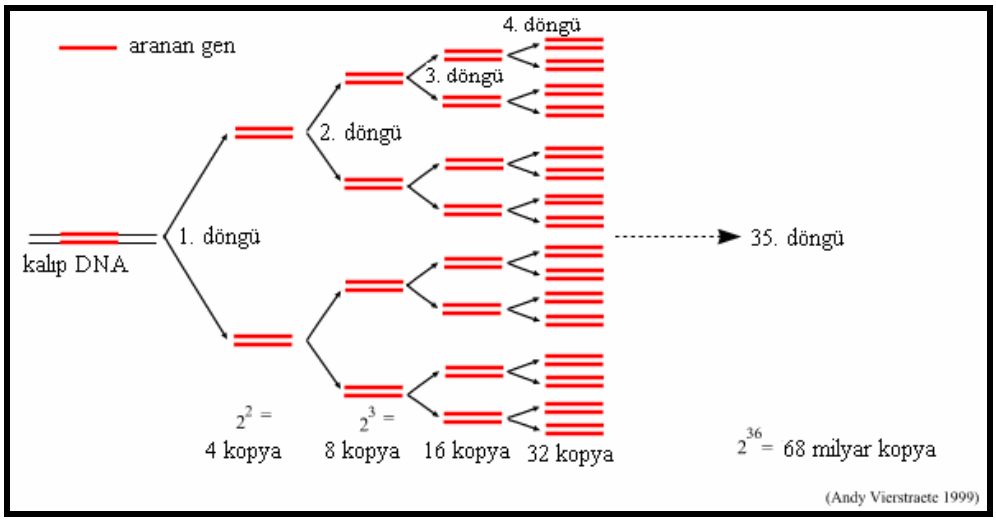
Çizelge 3.3. Kullanılan PCR primerleri

Primer adı	Nükleotid dizisi	Erime sıcaklığı (^oC)	GC oranı (%)	Uzunluk (bç)
Wbor1F1	5'-AGCATGGGTAACTTCGATGC-3'	57.3	50	20
Wbor1R1	5'-TTTGAAGAGCTTTGGGAGGA-3'	55.3	45	20
WubiquitinF	5'-CACCATTGACAACGTGAAGG-3'	57.3	50	20
WubiquitinR	5'-CAAAGACAGTCAGGCAACGA-3'	57.3	50	20

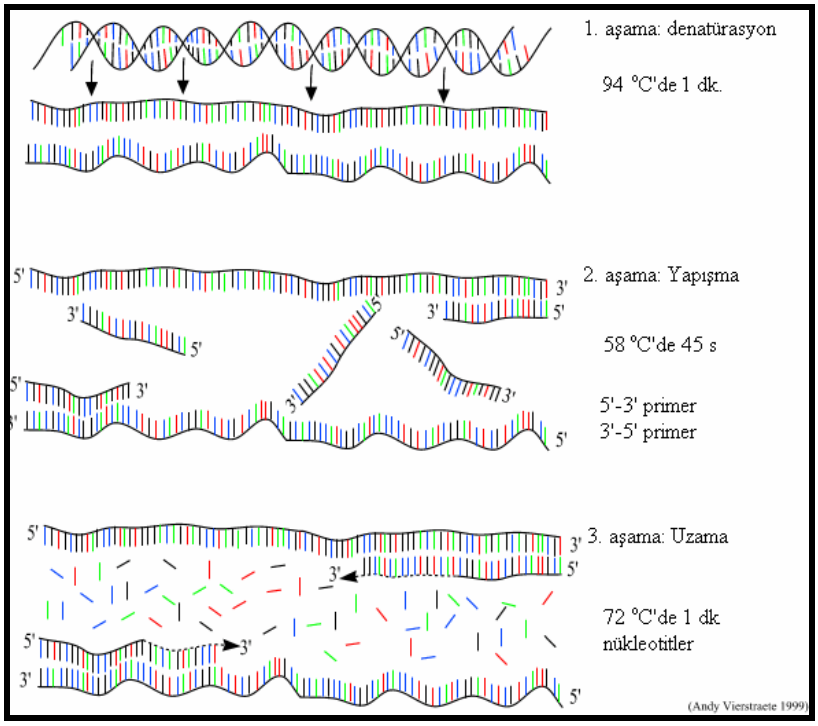
3.2.5.1.2. PCR çalışması

PCR (Polymerase Chain Reaction), DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve *DNA Polimeraz* enzimi vasıtasıyla gerçekleşen bir DNA çoğaltma işlemidir. Genellikle 0.2-2.0 kb aralığındaki fragmanların çoğaltımı yapılmakla birlikte özel bazı enzimlerle 15-20 kb uzunluğuna kadar amplifikasyon yapılabilmektedir. Bu işlemde sıcaklığın hızlı azaltılıp artırılması esastır. Canlılarda, hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen DNA zincirlerinin karşılarına yeni zincirlerin sentezlenmesi işlemi (DNA replikasyonu) PCR tekniğinde *in vitro* olarak gerçekleştirilir. Ancak hücredekinin aksine DNA zincirlerinin ayrıştırılıp işlem esnasında ayrı tutulmaları (hücre içindeki *Helicase*, Single Strand Binding Protein (SSBP) gibi organik bileşikler yerine) 90-95 ^oC gibi yüksek sıcaklıklarla sağlanmaktadır. İşlem sonucunda 2^n kadar DNA fragmanı çoğaltılmış olur (Şekil 3.3). Pratikte bu rakam biraz daha düşük olarak gerçekleşir.

PCR işlemi döngülerden meydana gelir ve her bir döngü 3 aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada, (94-96 ^oC'de) DNA zincirleri birbirinden ayrılır (denatürasyon aşaması). İkinci aşamada, ayrılan zincirlerin karşısına çoğaltacağımız gen bölgesini bulmaya yarayan primerler (kısa DNA parçaları) uygun gen bölgesine yapışırlar (yapışma aşaması). Üçüncü aşamada ise kaplıcalarda yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisine ait *Taq DNA polimeraz* enzimi ile kalıp DNA zincirinin karşısına yeni zincir sentezlenir (uzama aşaması) (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. PCR'da DNA amplifikasyonu[1]

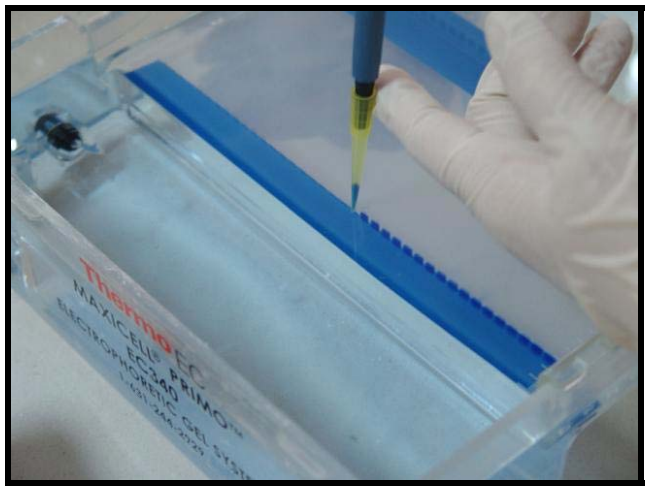


Şekil 3.4. PCR döngü aşamaları[1]

[1] http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

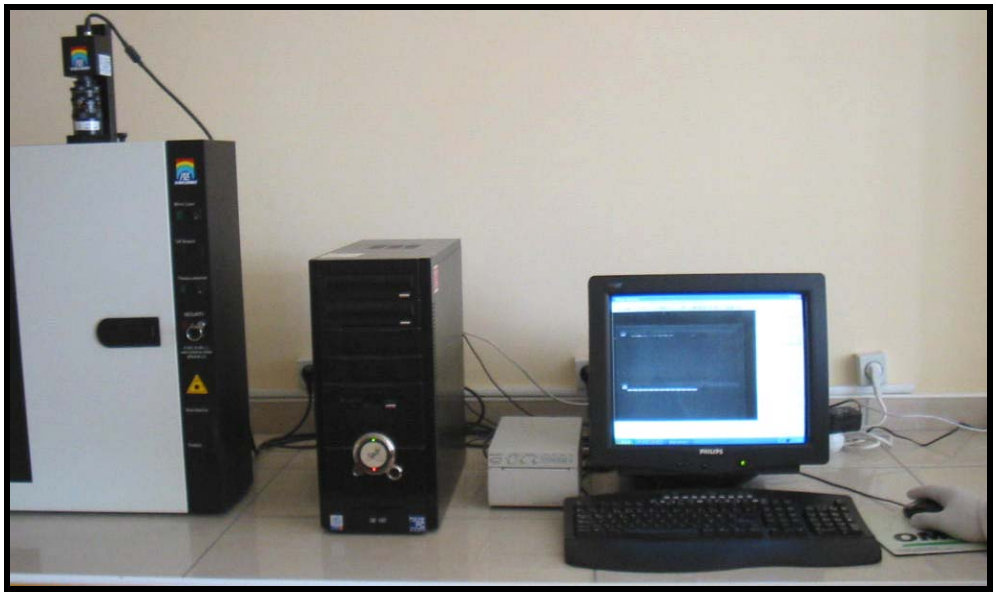
3.2.5.1.3. Agaroz jel elektroforez uygulamaları

PCR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için %1'lik (w/v) agaroz jel hazırlanmıştır. Jel hazırlanırken 25x20 cm ebatlarında jel tankı kullanılmıştır. Jeli (%1'lik) hazırlamak için, 2 g agaroz (SERVA marka), 200 ml 1X TBE (1.08 g Tris, 0.55 g borik asit ve 0.4 ml 0.5 M EDTA (Etilendiamintetraasetikasit pH 8)) çözeltisine ilave edildikten sonra mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Karışım yaklaşık 60 ^{o}C'ye kadar soğuduktan sonra PCR ürünlerinin UV ışık altında görünmesini sağlamak amacıyla 3 ml etidyum bromür eklenmiştir. İşlem sonunda jel tanka dökülerek oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Katılaştırılan jel, tankla birlikte elektroforez cihazına yerleştirilmiştir. PCR ürünlerinin elektroforez içindeki 1X TBE çözeltisine karışmasını önlemek ve yürütülmesi esnasında kolay takibi amacıyla yoğunluğu yüksek 6X yükleme boyası (10 mM Tris-HCl, % 0.03 bromophenolblue, % 0.03 xylene cyanol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA) PCR ürünlerine eklenmiştir. PCR ürünleri otomatik pipet (Eppendorf marka) kullanılarak 18,5 µl olarak jeldeki yuvalara yüklenmiş ve çoğaltılan gen fragmanının boyunu tespit etmek amacıyla örneklerden önceki yuvaya uzunluk markörü olarak *EcoR*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş, λ DNA'sı (0.3 µg/µl) yüklenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Agaroz jel elektroforez

Jel, elektrik akımında (70 V) 2 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi sona erince jeldeki bandlar görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat) ile UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 3.6).



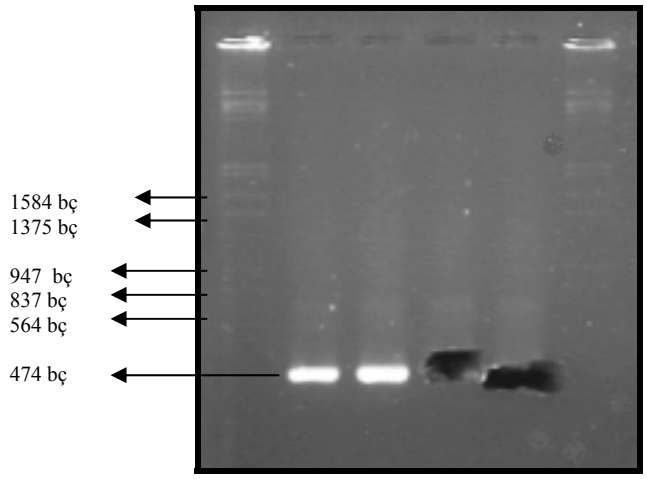
Şekil 3.6. Jel dökümantasyon sistemi ve görüntü alınması

Bir tarafına negatif (-), diğer tarafına pozitif (+) yük verilen elektroforez tankının (-) yüklü tarafına yüklenen DNA örnekleri aynı yüklerin birbirini itmesi ve zıt yüklerin birbirini çekmesi prensibine göre, agaroz jelin konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan porlardan zıt yüklü tarafa doğru DNA parçasının uzunluğu ile orantılı bir şekilde hareket eder (küçük DNA fragmanları, daha küçük por çapına sahip olan matriks şeklindeki jelde daha hızlı hareket ettikleri için büyük fragmanlardan daha çabuk yol alırlar). Fragmanların boyları, örneklerle birlikte yürütülen uzunluğu belli standard markörler sayesinde net bir şekilde belirlenebilir.

Görüntüler jel dökümantasyon sistemindeki özel bir programın içinde TIFF dosyası olarak saklanır.

3.2.5.1.4. PCR ürününün jelden ayrıştırılması

Kızıltan ve Çakmak cDNA'sı üzerinden *WborF1-R1* primerleri ile çoğaltılan PCR ürünü elektroforezde ayrıştırıldıktan sonra görüntülenen bant UV altında bistüri ile agaroz jelden kesilerek 1.5 ml'lik DNase-RNase free mikrosantrifüj tüpüne konmuştur (Şekil 3.7).



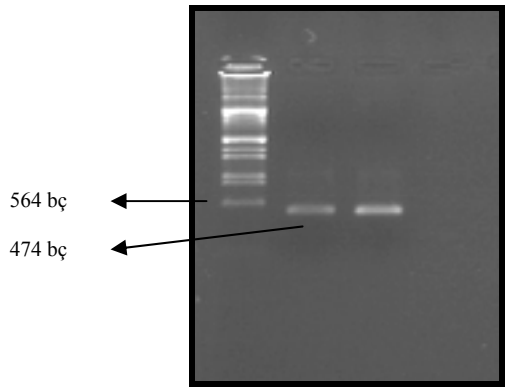
Şekil 3.7. Jelden bant kesimi

Kesilen ürün jel ekstraksiyon kiti (Qiagen MinElute) ile jelden ayrıştırılıp saf olarak elde edilmiştir. Saflaştırma basamakları şu şekildedir:

- Kesilen jelin ağırlığı belirlenmiştir.
- Jelin üzerine jel ağırlığının µl olarak 3 katı QG çözeltisi eklendikten sonra 50 ^{o}C'de 10 dk bekletilmiştir.
- Jel tamamen çözündükten sonra üzerine jelin ağırlığı kadar izopropanol ilave edilmiştir.
- Kit içerisinde bulunan filtreli tüplere jel sıvısı pipetle aktarıldıktan sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Alt sıvı faz döküldükten sonra filtre üzerine 500 µl QG çözeltisi eklenerek tekrar 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Alt sıvı faz tekrar dökülerek 750 µl PE çözeltisi ilavesinden sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

- Filtreye bağlanan gen fragmanını çözündürmek için 10 µl PCR suyu filtrenin tam ortasına uygulandıktan sonra 1 dk bekletilmiş ve daha sonra 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- İşlemin gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla elde edilen ayrıştırma ürününün 1 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Jelden kesilen bantlar saflaştırıldıktan sonra işlemin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için ekstraksiyon ürününden 1µl alınarak %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.8). Geri kalan saflaştırılmış ürün ise kullanılacağı zamana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır



Şekil 3.8. Jel ekstraksiyon ürünün agaroz jel görüntüsü

3.2.5.1.5. Gen fragmanına poly A (Adenin) takılması

Plazmid vektörü (pGEM-T Easy vektör) özel olarak PCR ürünlerinin tek aşamada klonlanmasına uygun bir şekilde, klonlama bölgesine T (Timin) nükleotidi ilave edilmiş özel amaçlı bir vektördür. PCR ürünlerinin sonunda da *Taq DNA polimeraz* enzimi fazladan A (Adenin) nükleotidi ilave etmektedir. Ancak PCR sonrası işlemler esnasında bu A nükleotidi kopabilmektedir. Klonlamayı kolaylaştırmak için saflaştırılmış PCR fragmanı ucuna tekrar bir A nükleotidi ilave etmek mümkündür. İşlem sırası şu şekildedir:

3.4 µl jelden ekstrakte edilmiş PCR fragmanı

↓

1 µl 10X reaksiyon çözeltisi

↓

0.6 µl 25 mM $MgCl_2$

↓

1 µl 10 mM dATP

↓

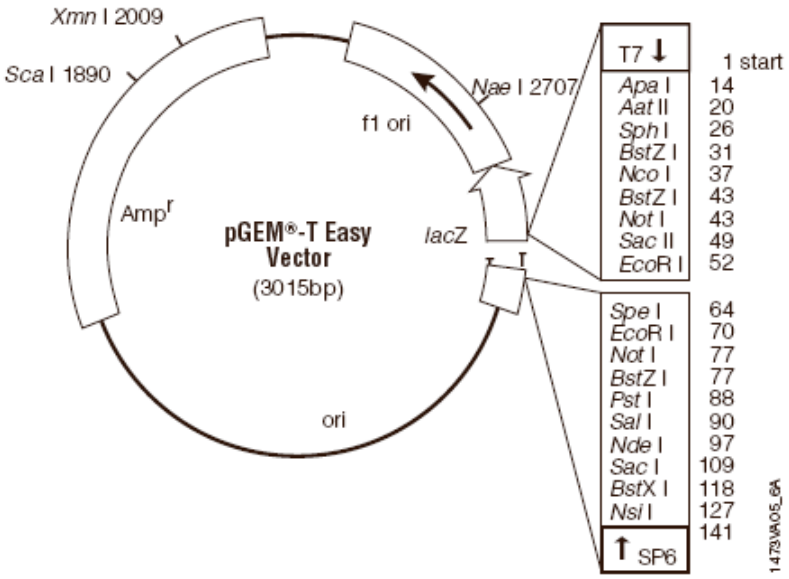
1 µl *Taq DNA polimeraz* (5u/µl)

↓

70 ^{o}C'de 30 dk inkübasyon

3.2.5.1.6. Gen fragmanının plazmid vektöre klonlanması

Klonlama işleminde pGEM-T Easy vektör sistemi (Promega) kullanılmıştır. Bu plazmid vektör ticari olarak temin edilmiştir. Vektör, *EcoR* I restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve 3' uçlarına timin nükleotidi takılmış durumdadır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. pGEM-T Easy vektör sistemi[2]

[2] www.promega.com

Reaksiyon için DNA bağlama kapasitesi düşük 0.5 ml'lik tüpler kullanılmıştır. Klonlamanın sağlıklı gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla kit içindeki kontrol klonlama DNA'sı ile reaksiyon tekrarlanmıştır. Klonlama esnasında kullanılacak pGEM-T Easy vektörü, kontrol klonlama DNA'sı ve ligasyon çözeltisi santrifüj edildikten sonra sonuna adenin takılan PCR fragmanı ile Çizelge 3.4'teki reaksiyon koşulları sağlanarak bir karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Gen fragmanının plazmid vektöre transfer reaksiyon koşulları

	Reaksiyon	**Kontrol**
2X Rapid ligation buffer	5 µl	5 µl
pGEM-T easy vektör	1 µl	1 µl
PCR fragmanı	2 µl	-
Kontrol klon DNA	-	2 µl
T4 DNA ligaz 3 u/ µl	1 µl	1 µl
PCR suyu	1 µl	1 µl

Karışım, pipetle karıştırılarak klonlamanın gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Klonlama ürünü kullanılacağı zamana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.5.1.7. Transformasyon için kompetant hücre hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteri kültürü, özel amaçlı olarak hazırlanmış *E.coli/*Dh5α kültürüdür. Önce petri kabında LB agar ortamında büyütülmüş bakteri kültüründen steril kürdan ile tek koloniden örnek alınmıştır. Alınan örnek 200 µl LB ortamının içine kürdanla birlikte atılmış ve daha sonra 37 ^{o}C'deki çalkalayıcılı su banyosunda 12 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Steril erlenin içine otoklavlanmış 125 ml SOB çözeltisi eklendikten sonra, büyütülen Dh5α bakteri kültüründen 100 µl ilave edilmiştir. Erlenin ağzı steril pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 37 ^{o}C'deki çalkalayıcılı su banyosunda büyütülmüştür. Daha sonra her 20 dk'da bir kültürden 100 µl örnek alınarak biyofotometrede, OD programı aracılığı ile bakteri konsantrasyonu 0.9 OD değerine ulaşana kadar okunmuştur. Bakteri konsantrasyonu 0.9 OD değerine ulaşınca 10 dk

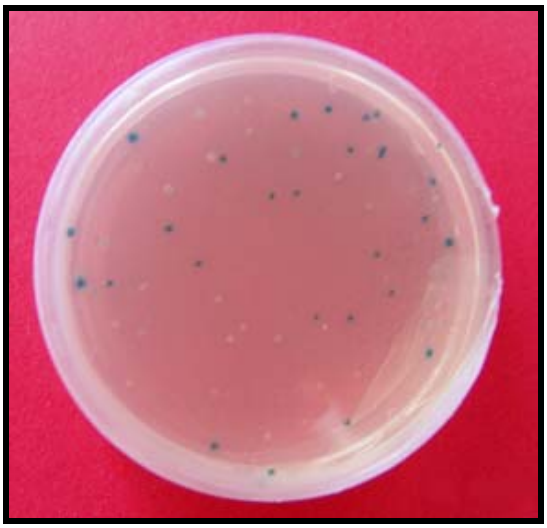
süre ile buzda bekletilmiştir. Bakteri kültürü dört ayrı 50 ml'lik tüpe bölünmüş ve 1.100 rpm'de 4 ^{o}C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz döküldükten sonra, 40 ml soğuk TB çözeltisi tüplere paylaştırılmıştır. Tüpler buzda 10 dk bekletildikten sonra tekrar santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz döküldükten sonra, üzerine 5 ml soğuk TB ve %14'lük DMSO karışımı eklenmiştir. Bakteri peletleri sıvı içerisinde çözündükten sonra 1.5 ml'lik tüplere her tüpe 500 µl olacak şekilde paylaştırıdıktan sonra -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.5.1.8. Rekombinant plazmid vektörün bakteriye transformasyonu

Hazırlanmış olan kompetant bakteri hücrelerinden 50 µl ile 2 µl rekombinant plazmid ürünü steril pipet ile hafifçe karıştırılmıştır. Karışım buzda 20 dk bekletilmiştir. Rekombinant plazmid ürününün bakteri içerisine girmesini sağlamak için, 42 ^{o}C'deki su banyosunda 45-50 s ısı şoku uygulanmış ve 2 dk buzda bekletilmiştir. Bakteri kültürü SOC çözeltisi içerisinde 37 ^{o}C'de 90 dk büyütüldükten sonra, önceden hazırlanmış olan LB/ampisilin/IPTG/X-gal içeren seçici petri kaplarına ekim yapılmıştır. Petri kapları 37 ^{o}C'de 12 saat bekletilmiştir.

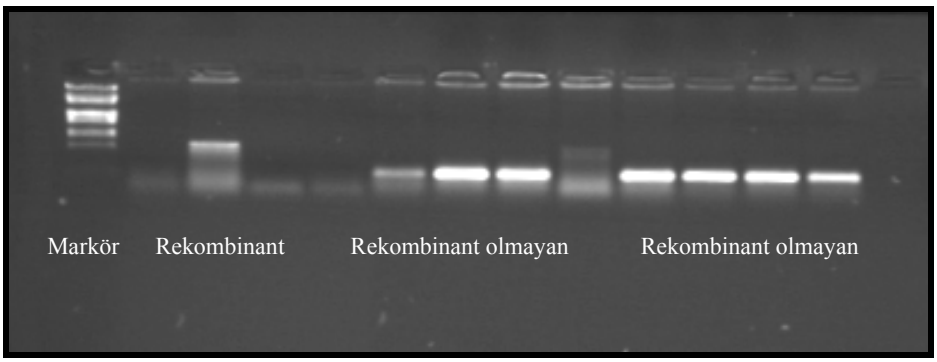
Bu ortam rekombinant plazmid içeren bakteriler ile içermeyen bakterilerin ayırdedilmesini sağlamaktadır. Rekombinant bakteri hücreleri beyaz renkli koloniler oluştururken rekombinant olmayanlar mavi renkli koloniler oluşturmaktadır. Bu renk farkı vektörün α-peptit kodlayan β-galaktosidaz enzim bölgesinin içine klonlanan gen fragmanının aktivitesinin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Klonlama gerçekleştiğinde bu enzimin aktivitesi bozulduğu için reaksiyon gerçekleşmemekte ve koloniler beyaz görülmektedir (Şekil 3.10).

Oluşan beyaz ve mavi renkli tek koloniler kalıp olarak kullanılarak M13 primerleri (Forward 5'-ACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3', Reverse 5'-GTCATAGCTGTTTCCTGTGTG-3') ile 52 ^{o}C'de 25 döngülü PCR işlemi yapılmış ve %1'lik agaroz jelde 60 V'ta yürütülmüştür. Böylece klonlanan fragmanın vektörde yer aldığı ispatlanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Rekombinant ve rekombinant olmayan bakterilerin LB/ampisilin/IPTG/X-gal içeren petri kaplarında büyütülmesi

PCR işlemi ile transformasyonun güvenilirliği test edilmiştir. PCR işleminde pozitif sonuç veren tek kolonilerden örnek alınarak 5 ml LB+ampisilin çözeltisinde 12 saat büyütülmüştür. Büyütülen bakteri kültüründen 300 µl alınarak, 100 µl LB medium + 600 µl %30'luk gliserol ile karıştırılmış ve sıvı azotta şok dondurmadan sonra -80 ^{o}C'de saklanmıştır.



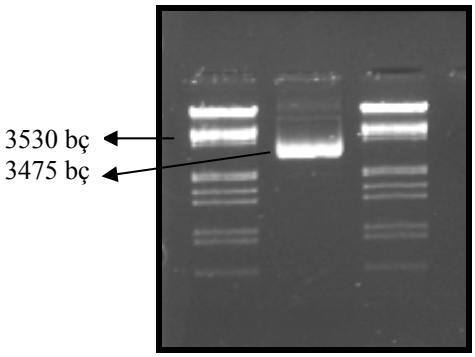
Şekil 3.11. Rekombinant ve rekombinant olmayan bakteri hücrelerinde M13 primeri ile PCR

3.2.5.1.9. Bakteriden plazmid izolasyonu

Büyütülen rekombinant bakteri kültürünün geri kalan kısmından plazmid izolasyon kiti (Qiagen) ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. İşlem basamakları şu şekildedir.

- Bakteri kültürü 2500 rpm'de, 4 ^{o}C'de, 5 dk santrifüj edilip üst sıvı faz dökülmüştür.
- Bakteri peleti 300 µl P1 çözeltisi içinde çözdürülüp üzerine 300 µl P2 çözeltisi eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
- Bakteri-çözelti karışımı 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine soğutulmuş P3 çözeltisi eklenmiştir.
- 14500 rpm'de 10 dk sanrifüj edildikten sonra üst faz kit içerisinde bulunan filtreli özel tüpün içine transfer edilmiştir. Sıvının tamamen süzülmesi beklenmiştir.
- Süzülme tamamlandıktan sonra 1 ml QC çözeltisi ile filtre yıkanmıştır.
- Filtre yeni tüpe aktarılıp üzerine 800 µl QF çözeltisi ilave edilerek DNA filtreden çözdürülmüştür.
- DNAyı çöktürmek için 560µl oda sıcaklığında bekletilmiş izopropanol ilave edildikten sonra 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edilip üst faz dökülmüştür.
- Oluşan pelet 1 ml, %70'lik etanolle yıkandıktan sonra 5 dk kuruması için beklenmiştir.
- Pelet 10 µl PCR suyu içinde çözülmüştür. Çözündükten sonra kullanılacağı zamana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

Plazmid izolasyonunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek için plazmid izolasyon ürününden 2µl kullanılarak %1'lik agaroz jelde 60 voltta 1 saat yürütülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Plazmid izolasyon ürününün jel görüntüsü

3.2.5.1.10. Plazmidin fragmanı taşıdığının ispat edilmesi

Plazmidin klonlanan gen fragmanını taşıyıp taşımadığı iki yolla ispat edilmiştir. Bunlardan birincisi PCR ile yapılmıştır.

İzole edilen plazmid ürününden 0.5 µl kullanarak M13 primerleri ile 25 döngülü (94 ^{o}C'de 1 dk, 52 ^{o}C'de 1 dk ve 72 ^{o}C'de 1,5 dk) PCR işlemi uygulanmıştır. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde 60 V'ta *EcoR*I ve *Hind*III ile kesilmiş boy markörü ile birlikte yürütülmüştür.

İkinci yöntemde ise çoklu klonlama bölgesi restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Plazmid izolasyon ürününün 3 µl'si kullanılarak *EcoR*I restriksiyon enzimi ile aşağıdaki reaksiyon koşullarında kesim işlemi yapılmıştır.

Rekombinant (Bor1F1R1) plazmid ürünü, 3 µl

↓

10X *EcoR*I tampon çözeltisi, 2 µl

↓

*EcoR*I enzimi, 1 µl (10 u/µl)

↓

PCR suyu, 4 µl

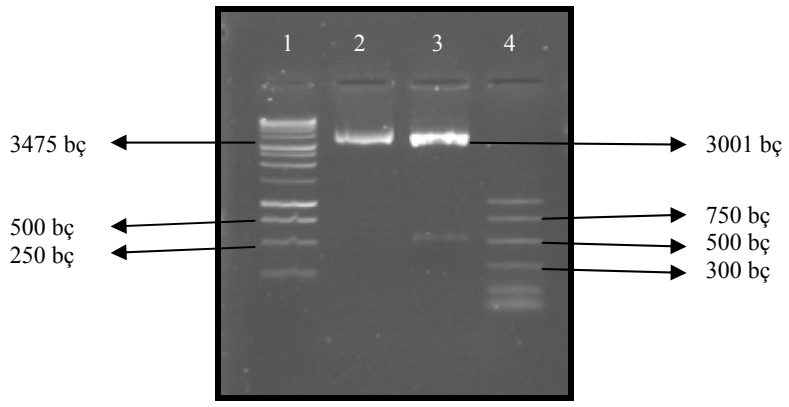
↓

37 ^{o}C'de 4 saat inkübasyon

↓

65 ^{o}C'de 20 dk inkübasyon

Kesilen rekombinant plazmid ürünü %1'lik agaroz jelde iki adet DNA markörü (Promega, cat no G7541 ve G7531) ile yürütülmüştür. Bu işlemlerle plazmide gen fragmanının transferinin başarısı test edilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. *EcoR*I ile kesilmiş ve kesilmemiş plazmid jel görüntüsü (1- DNA markörü (10000 bç), 2- Rekombinant (kesilmemiş) plazmid, 3- *EcoR*I ile kesilmiş plazmid, 4- DNA markör (1000 bç)

3.2.5.2. Ekspresyon çalışmaları

3.2.5.2.1. RNA izolasyonu

Bitkideki RNA içeriğinin zarar görmemesi için -80 ^{o}C'de saklanan kök ve gövde örnekleri ayrı ayrı sıvı azotta toz haline getirilip, Qiagen RNeasy plant mini kit ile RNA izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir.

- -80 ^{o}C'de saklanan bitki örnekleri, erimemeleri için sıvı azot içine atılmıştır.
- Örnekler steril havan içine döküldükten sonra sıvı azotta toz haline gelinceye kadar ezilmiştir.
- Ezilen örnek, steril 2 ml'lik santrifüj tüpüne alındıktan sonra üzerine 450 µl RLT çözeltisi (daha önceden %1 β-merkaptoetanol ilave edilmiş) konduktan sonra 56 ^{o}C'de 1-3 dk. bekletilmiştir.

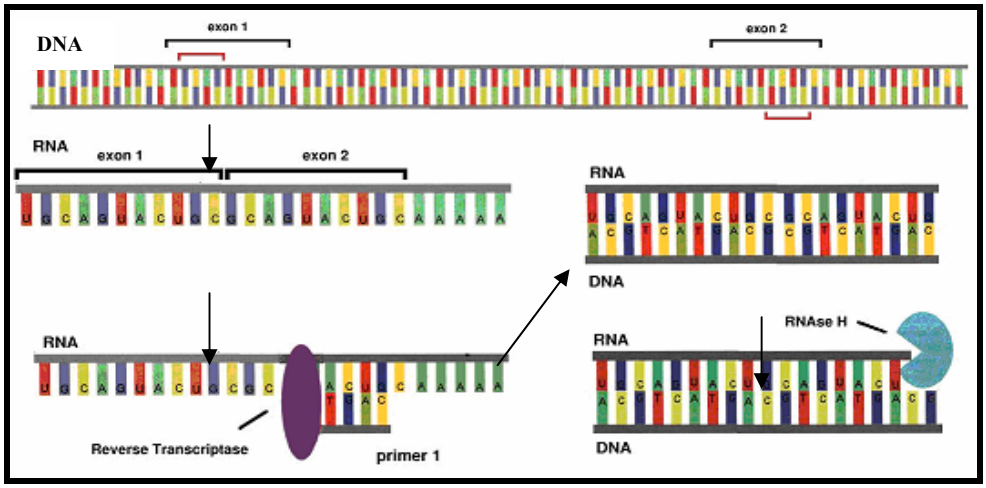
- Ezilmiş bitki örneği pipetle kit içindeki lila renkli filtreli tüplere aktarıldıktan sonra 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Oluşan üst faz yeni 2ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerine 225 µl %96'lık etanol eklendikten sonra pipetle hafifçe karıştırılıp kit içindeki pembe renkli filtreli tüplere aktarılmıştır. 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiştir. Alt faz dökülerek RNA filtreye sabitlenmiştir.
- Pembe renkli filtreli tüplerin içine kit içindeki 700 µl RW1 çözeltisi konduktan sonra 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiş ve alt faz dökülmüştür.
- Filtre yeni bir santrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Üzerine 500 µl RPE çözeltisi (44 µl etanol eklenmiş) konduktan sonra 10000 rpm'de 15 s santrifüj edilerek alt faz dökülmüştür. Bu işlemle yıkama yapılarak istenmeyen maddeler (tuz, fenolik bileşikler vb.) uzaklaştırılmıştır.
- 500 µl RPE çözeltisi konduktan sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi tekrar edilmiştir.
- Filtre, yeni 1.5 ml'lik RNase ve DNase free, steril santrifüj tüpü içine transfer edilmiştir.
- Üzerine 30 µl RNase-free su, pipetle filtrenin tam ortasına bırakılmış ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'lar su ile filtreden çözündürülmüş ve santrifüj tüpünde toplanmıştır.
- Kullanılacağı zamana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.5.2.2. RNA konsantrasyon saflıklarının belirlenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları biyofotometrede (Eppendorf marka) okunmuştur. Okuma yaparken 260 nm dalga boyunda Nükleik Asitler, 280 nm'de protein, 230 nm'de içeriğe karışan diğer bileşiklerin miktarları belirlenmiştir. Okuma sırasında 1:50 (1µl RNA ve 49 µl saf su) dilusyon oranı kullanılmıştır. RNA konsantrasyonları "ssRNA katsayısı x A_{260} değeri x dilusyon faktörü" formülüne göre belirlenmiştir. A_{260}/A_{280} oranlarının saptanması ile RNA içindeki, izolasyondan kaynaklanan protein oranları saptanmıştır.

3.2.5.2.3. cDNA sentezi

cDNA, *Reverse transcriptase* enzimi ile RNA zincirinin DNA zincirine dönüştürülmesi sonucu oluşan ilk zincir komplementer DNA materyalidir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. cDNA sentezi[3]

Konsantrasyonu belirlenen RNA örneklerinin 1 µg olacak şekilde konsantrasyonları eşitlendikten sonra Invitrogen SuperScript III Reverse Transcription kiti ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentez, PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. İşlem basamakları aşağıda verilmiştir.

- İşlem sırasında 0,5 ml'lik DNase-RNase free PCR tüpleri kullanılmıştır.
- Önce A tüpüne RNA örneği hazırlanmıştır.

Bileşenler	**Miktar**	
1 µg olacak şekilde RNA	n	A
50 µM oligo (dT)	1 µl	
10 mM dNTP mix	1 µl	
DEPC'li su ile hacim 10 µl'ye tamamlanır		

- 65 ^{o}C'de 5 dk daha sonra buzda 5 dk bekletilmiştir.
- Aşağıdaki karışım ayrı bir tüpte (B tüpü) hazırlanmıştır.

[3] http://www.ma.uniheidelberg.de/inst/ikc/molekularbiologie.html

Bileşenler	**1 Reaksiyon**	
10X RT tampon çözelti	2 µl	B
25 mM $MgCl_2$	4 µl	
0.1 M DTT	2 µl	
*RNase*Out (40 U/µl)	1 µl	
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl	

- Bu karışımdan RNA örneğine (A tüpü) 10 µl eklenmiştir. Bu işlem her bir RNA örneği için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
- Bu işlemlerden sonra RNA örneklerine (A tüpü) aşağıdaki PCR programı uygulanmıştır.

  50 ^{o}C'de 50 dk

  85 ^{o}C'de 5 dk

  4 ^{o}C'de 5 dk
- Her bir örneğe RNA'ları parçalaması için 1 µl *RNase* H eklendikten sonra örnekler 37 ^{o}C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Örnekler kullanılacakları zamana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.5.2.4. RT – PCR çalışmaları

RT-PCR tekniği total RNA üzerinden sentezlenen cDNA fragmanlarının kalıp olarak kullanıldığı bir PCR metodudur. Bu metod ile DNA üzerinde bulunan bir genin protein üretmek üzere mesajcı RNA'ya (mRNA) dönüşüp dönüşmediği ve ekspresyon yapılan genin mRNA miktarlarının karşılaştırılması mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada farklı B doz ve saat örneklerinden hazırlanan cDNA örneklerinde *bor1* geninin ekspresyon oranları RT-PCR tekniği ile karşılaştırılmıştır. PCR yapılırken 0.2 µl'lik DNase-RNase free PCR tüpleri kullanılmıştır. Her bir tüp için 0.5 µl cDNA kalıp olarak kullanılmış ve her bir reaksiyon toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı (bir tüp için);

- 10X reaksiyon çözeltisi 2.5 µl
  (10 mM Tris-HCl (pH 8.8); 50 mM KCl; 0.8% Nonidet P40)
- $MgCl_2$, 25 mM 1.5 µl

- dNTP karışımı 25 mM 0.3 µl
- Primer wBor1F1 0.2 µl
- Primer wBor1R1 0.2 µl
- *Taq DNA polimeraz* 5 u/µl 0.3 µl
- PCR suyu 19.5 µl şeklindedir.

Reaksiyon PCR cihazında (TECHNE Progene, UK) 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR programı; 94 ^{o}C'de 5 dk ön ısıtmadan sonra, 94 ^{o}C'de 50 s, 58 ^{o}C'de 45 s, 72 ^{o}C'de 1dk olmak üzere 35 döngü ve bütün sentezlerin tamamlanması için son olarak 72 ^{o}C'de 10 dk şeklinde uygulanmıştır. İşlem sonunda PCR örnekleri agaroz jelde görüntülenene kadar 4 ^{o}C'de tutulmuştur.

3.2.5.2.5. Genin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PCR ile hem Çakmak-79 hem de Kızıltan-91 genotiplerine ait olan kök ve gövde RNA'ları kullanılarak hazırlanan cDNA ürünlerinden eşit miktarda alınarak *bor1* ve *Ubiquitin* genlerinin amplifikasyonları yapılmıştır. Bu şekilde farklı doz ve saat örneklerinin ayrı ayrı ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. RT-PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jel dokümantasyon sisteminde UV altında görüntülenmiştir.

Çakmak-79 ve Kızıltan-91 genotiplerine ait farklı zamanlarda alınan örneklerin analizleri her bir genotipin ayrı jellerde yürütülmesi ile yapılmıştır. Tüm örneklerin aynı zamanda sürekli ekspresyonu görülen temel hücresel faaliyetlere ait *Ubiquitin* genine ait ekspresyonları da aynı jellerde eşzamanlı olarak yürütülmüştür. *Ubiquitin* genine ait ekspresyon değerlerinin asıl ekspresyonu ile ilgilendiğimiz *bor1* geninin değerlerine oranlanması ile her bir örnek için ayrı ayrı normalizasyon değerleri elde edilmiş ve bu değerler gene ait net ekspresyon değerleri olarak oluşturulan grafiklerin elde edilmesinde kullanılmıştır. Tüm ekspresyon değeri okumaları Scion Image Analysis programı ile jeldeki ilgili bandların yanma değerlerinin numerik formata dönüştürülmesi ile elde edilmiştir.

3.2.6. Bitki B analizleri

3.2.6.1. Bitki materyallerinin mikrodalgada yakılması

Denemeler sırasında B analizleri için alınmış her bir örnek analiz edilmiştir. Etüvde sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar kurutulan bitki kısımlarının, mikrodalgada yakma sırasında kullanılacak ağırlıkları gram olarak (0.1-1.0 g) tespit edilmiştir. Her bir örneğin üzerine 10 ml nitrik asit (HNO_3) ilave edilerek 25-30 dakika kadar gaz çıkışı olması için beklendikten sonra örnekler mikrodalgaya (CEM-Mars 5) yerleştirilmiş ve yakma işlemi tamamlanmıştır. Yakılan örnekler balon jojeye aktarılmış ve hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Kapaklı plastik kaplara mavi bantlı filtre kağıdıyla süzülerek aktarılan numuneler buzdolabında okuma yapılıncaya kadar 4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.2. ICP-AES ile örneklerin okunması

ICP-AES cihazında otomatik olarak analiz yapılmaktadır. Argon gazı ile çalışan cihaz 10.000 Kelvin sıcaklıktaki *tourch*'a püskürtülen örneğin oluşturduğu ışığın (okuması yapılan elementin) dalga boyuna göre element miktarını mg kg^{-1} olarak belirlemektedir (Şekil 3.15).

Yakılan bitki örnekleri B dozlarına göre düşükten yüksek doza doğru sırayla okunmuştur. Su örnekleri ise yakma işlemi yapılmadan direkt olarak cihazda aynı şekilde okunmuştur.



Şekil 3.15. ICP-AES cihazı (S.Ü. Ziraat Fakültesi Toprak, Bitki ve Gübre Analiz Laboratuarı)

3.2.7. Denemelerin düzenlenmesi ve bulguların değerlendirilmesi

Denemelerde değişken olarak seçilen parametreler Çizelge 3.5'te olduğu gibi gruplandırılmıştır.

Çizelge 3.5. Denemelerin yürütülmesi

İşlem sırası		**Süre (gün)**	**B Dozu (mg B kg^{-1})**
1	Çimlendirme	7	0
2	Hoagland çözeltisi (H)	10	0.49
3	B'suz ortam (B_0)	7	0
4a	Yeterli seviyede B ortamı (B_1)	3	1.08
4b	Toksik seviyede B ortamı (B_{100})		108

Uygulanan farklı B dozları sonucu her iki çeşitte de belirlenen *bor1* geni ekspresyon düzeyleri ile bitkide biriken B miktarları şekil ve çizelgeler halinde verilmiştir. Tespit edilen gen ekspresyon düzeyleri ve B birikimleri mukayeseli olarak değerlendirilmiştir. Çeşitlerin farklı B ortamlarında, farklı zamanlarda alınan gövde ve kök B konsantrasyonlarına ait değerler tesadüf parseller deneme desenine varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi bilgisayarda MSTATC istatistik programı ile yapılmış ve istatistiki açıdan önemli bulunan karekterlerde çoklu karşılaştırma testi olan LSD uygulanmıştır (MSTAT-C. 1980).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Orta Anadolu bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen makarnalık buğday çeşitlerinden Kızıltan-91 ve Çakmak-79'un farklı B uygulamalarına verdikleri tepkilerin moleküler düzeyde araştırıldığı bu çalışmada denemeler sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1. Moleküler Genetik Çalışmalarının Sonuçları

Su kültürü çalışmasında Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerine ait tek başaktan elde edilmiş 45'er adet tohum çimlendirme kaplarına ekilmiş ve ekilen danelerin %100'ü çimlenmiştir. Çizelge 4.5'e bakıldığında çeşitlerin danelerindeki B miktarlarının farklı olduğu görülmektedir. Ancak Paull ve ark. (1988) yüksek B dozunun (150 mg B kg^{-1}) dahi çimlenmeyi etkilemediğini, sadece çimlenmeyi geciktirici bir etki yaptığını belirtmektedir. Bizim çalışmamızda danedeki düşük miktardaki B'un çimlenmeyi etkilemediği görülmüştür.

Su kültürü çalışması esnasında alınarak -80 ^{o}C'de saklanan kök ve gövde örneklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Çakmak-79 çeşidinin izole edilen kök RNA konsantrasyonları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde A_{260}/A_{280} oranlarının 1.65-1.88 arasında değiştiği görülmektedir. Yüksek saflıktaki RNA izolasyonunda A_{260}/A_{280} oranı 1.8-2.1 arasında değişmektedir. Ayrıca izole edilen RNA miktarı, PCR işlemleri ve klonlama çalışmaları için gerekli toplam RNA miktarı olan 1 mg'ın üzerinde olduğundan analizler için yeterli seviyededir.

Çizelge 4.1. Çakmak-79 çeşidinin kök RNA konsantrasyonları

Örnek adı	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA Konsantrasyonu (µg/ml)	Toplam RNA (mg)
*H son saat	0.043	0.052	0.032	0.005	1.65	1.23	104.5	3.12
B_0 24.saat	0.064	0.115	0.065	0.009	1.78	1.79	240.0	6.90
B_1 3.saat	0.136	0.313	0.170	0.005	1.84	2.29	622.0	18.78
B_1 6.saat	0.053	0.108	0.059	0.000	1.81	2.02	215.1	6.48
B_1 12.saat	0.195	0.455	0.246	0.002	1.85	2.34	903.0	27.30
B_1 24.saat	0.158	0.337	0.179	0.000	1.88	2.13	674.0	20.22
B_{100} 3.saat	0.113	0.234	0.128	0.004	1.83	2.06	460.0	14.04
B_{100} 6.saat	0.080	0.177	0.094	0.000	1.88	2.20	340.0	10.62
B_{100} 12.saat	0.097	0.186	0.101	0.003	1.84	1.92	380.0	11.16
B_{100} 24.saat	0.166	0.378	0.201	0.003	1.88	2.28	745.0	22.68

*H: Hoagland B ortamı

Çakmak-79 çeşidinin izole edilen gövde RNA konsantrasyonları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çakmak-79 çeşidinin gövde RNA konsantrasyonları

Örnek adı	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA Konsantrasyonu (µg/ml)	Toplam RNA (mg)
H son saat	0.369	0.918	0.489	0.002	1.88	2.49	1820	55.08
B_0 24.saat	0.249	0.590	0.315	0.002	1.87	2.37	1180	35.40
B_1 3.saat	0.185	0.431	0.232	0.000	1.86	2.33	855	25.86
B_1 6.saat	0.304	0.654	0.340	0.003	1.93	2.15	1308	39.24
B_1 12.saat	0.183	0.441	0.237	0.000	1.86	2.41	860	26.46
B_1 24.saat	0.281	0.702	0.365	0.000	1.93	2.50	1404	42.12
B_{100} 3.saat	0.172	0.416	0.217	0.001	1.92	2.42	832	24.96
B_{100} 6.saat	0.134	0.289	0.151	0.001	1.91	2.16	577	17.34
B_{100} 12.saat	0.335	0.788	0.408	0.001	1.93	2.35	1576	47.28
B_{100} 24.saat	0.179	0.412	0.219	0.000	1.88	2.31	835	24.72

*H: Hoagland B ortamı

Çizelge 4.2 incelendiğinde A_{260}/A_{280} oranlarının yeterli düzeyde olduğu, 1.86-1.93 arasında değiştiği görülmektedir. Ayrıca toplam RNA miktarlarının da yeterli seviyede olduğu anlaşılmaktadır.

Kızıltan-91 çeşidinin izole edilen kök RNA konsantrasyonları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kızıltan-91 çeşidinin kök RNA konsantrasyonları

Örnek adı	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA Konsantrasyonu (µg/ml)	Toplam RNA (mg)
H son saat	0.123	0.276	0.151	0.003	1.83	2.25	590.0	16.56
B_0 24.saat	0.086	0.190	0.104	0.000	1.84	2.22	390.0	11.40
B_1 3.saat	0.144	0.319	0.173	0.005	1.85	2.22	650.0	19.14
B_1 6.saat	0.078	0.170	0.094	0.000	1.81	2.18	340.2	10.20
B_1 12.saat	0.170	0.385	0.207	0.004	1.86	2.27	760.0	23.10
B_1 24.saat	0.260	0.625	0.332	0.011	1.88	2.40	1247.0	37.50
B_{100} 3.saat	0.082	0.172	0.094	0.001	1.83	2.10	350.0	10.32
B_{100} 6.saat	0.053	0.103	0.055	0.001	1.87	1.94	205.3	6.18
B_{100} 12.saat	0.070	0.144	0.079	0.002	1.83	2.05	290.0	8.64
B_{100} 24.saat	0.136	0.313	0.170	0.001	1.84	2.28	632.0	18.78

*H: Hoagland B ortamı

Çizelge 4.3 incelendiğinde A_{260}/A_{280} ve toplam RNA miktarlarının yeterli düzeyde olduğu görülmektedir.

Kızıltan-91 çeşidinin izole edilen kök RNA konsantrasyonları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kızıltan-91 çeşidinin gövde RNA konsantrasyonları

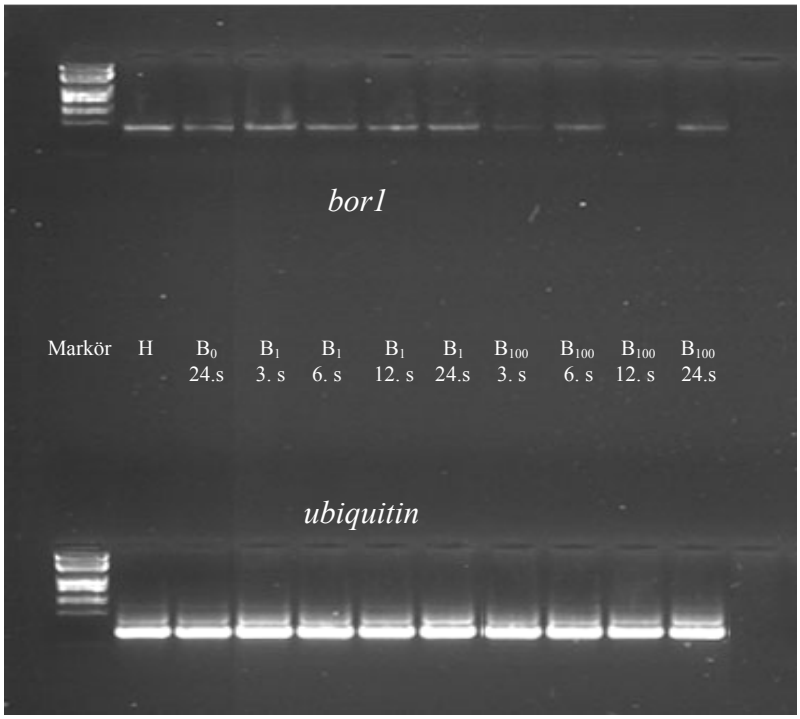
Örnek adı	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA Konsantrasyonu (µg/ml)	Toplam RNA (mg)
H son saat	0.194	0.477	0.249	0.000	1.92	2.46	954.9	28.62
B_0 24.saat	0.244	0.570	0.294	0.001	1.94	2.34	1139.1	34.20
B_1 3.saat	0.262	0.648	0.338	0.001	1.92	2.48	1296.6	38.88
B_1 6.saat	0.271	0.658	0.342	0.000	1.92	2.43	1316.3	39.48
B_1 12.saat	0.328	0.809	0.419	0.001	1.93	2.46	1600.0	48.54
B_1 24.saat	0.269	0.637	0.333	0.000	1.91	2.37	1265.0	38.22
B_{100} 3.saat	0.156	0.386	0.210	0.000	1.84	2.47	774.0	23.16
B_{100} 6.saat	0.196	0.486	0.262	0.001	1.86	2.49	972.6	29.16
B_{100} 12.saat	0.148	0.366	0.196	0.001	1.87	2.47	732.1	21.96
B_{100} 24.saat	0.258	0.633	0.338	0.000	1.87	2.45	1266.9	37.98

*H: Hoagland B ortamı

Çizelge 4.4 incelendiğinde de, A_{260}/A_{280} ve toplam RNA miktarlarının yeterli düzeyde olduğu görülmektedir.

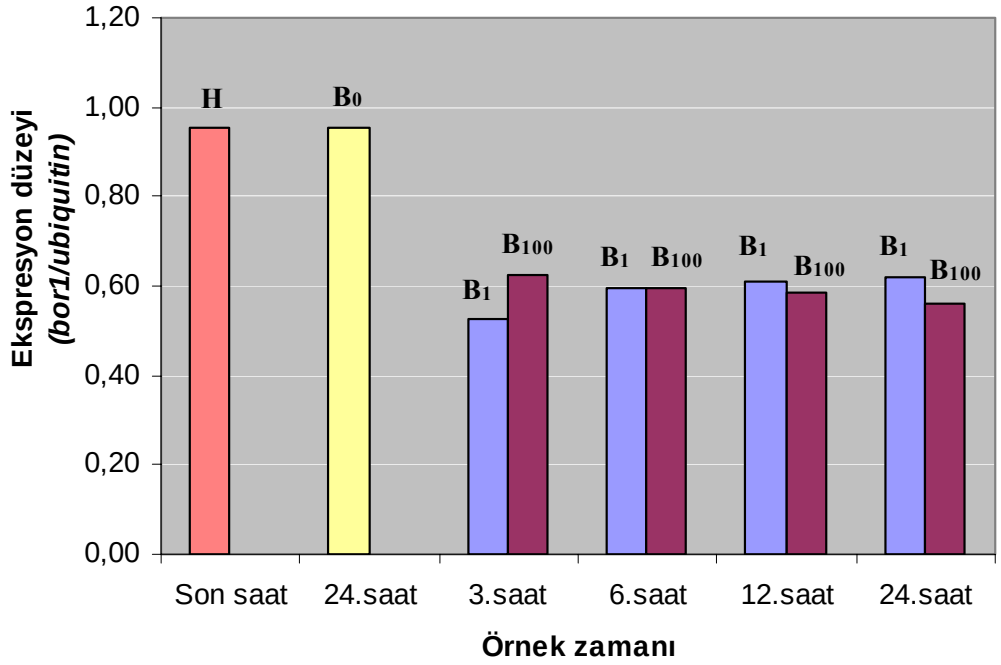
Kızıltan-91 ve Çakmak-79 genotiplerinin kök ve gövde örneklerinden izole edilen RNA ürünlerinden cDNA sentezi yapılarak örnekler PCR işlemleri için uygun duruma getirilmiştir. İlgilendiğimiz B taşıyıcı geni olan *bor1*'in farklı B dozlarındaki ekspresyonunu izlemek için Bor1F1-R1 ve ekspresyonun güvenirliğini kontrol etmek için WubiquitinF-R primerleri kullanılarak RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III uzunluk markörü ile birlikte yürütülmüştür.

Kızıltan-91 çeşidine ait kök cDNA örneklerinde *bor1* ve *ubiquitin* genlerine ait RT-PCR görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Kızıltan-91 kök örneklerinde *bor1* ve *ubiquitin* genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi

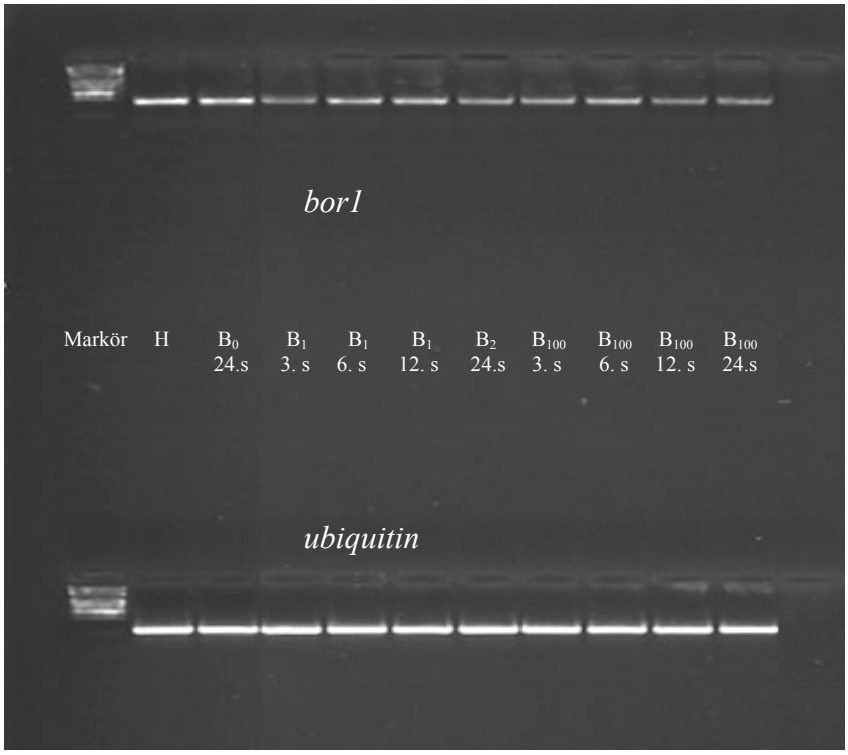
Kızıltan-91'in kökteki *bor1* geninin *ubiquitin* ile normalize edilmiş halleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Kızıltan-91 kök örneklerinde *bor1* geninin ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.2 incelendiğinde Kızıltan-91 kök örneklerinde genotipin ihtiyaç duyduğu fazla B'un karşılanabilmesi için, gerek kritik B içeriğine sahip H ortamındaki örneklerde gerekse B içermeyen B_0 ortamındaki örneklerde *bor1* geninin ekspresyonu maksimum seviyede görülmektedir. Gen ekpresyonunun yüksek olması, B noksanlığına hassas olarak bilinen Kızıltan-91 çeşidinde düşük B içeren ortamlarda pasif taşımanın yeterli olmadığı ve aktif taşımanın daha fazla önem kazandığı şeklinde açıklanabilir. B_1 ortamındaki örneklerin gen ekspreyonu, örneklerin ortama alındığı andan itibaren ortamdaki B'un pasif taşımayla bitkiye geçmesinden dolayı azalmış, ancak ortamın 3. saatinden itibaren pasif taşınmanın yetersiz oluşundan gen ekpresyonu aktif taşımayı hızlandıracak şekilde tekrar bir artış eğilimi içine girmiştir. Buna karşılık B_{100} örneklerinde tanklara alınmasından itibaren tersine bir trend izlenmekte ve ekspresyon düzeyinde bir azalma görülmektedir. Burada yüksek B içeren ortamda, B'un köke pasif bir şekilde, yeterli miktarda alınmasının etkisi gözlenmektedir.

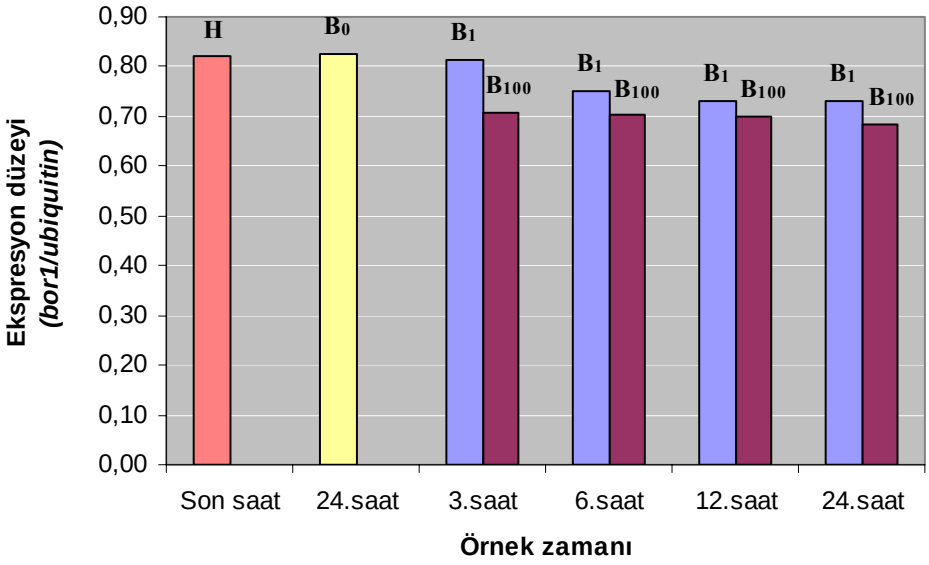
Kızıltan 91'in gövde cDNA örneklerinde Bor1F1-R1 ve WubiquitinF-R ile yapılan RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Kızıltan-91 gövde örneklerinde *bor1* ve *ubiquitin* genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi

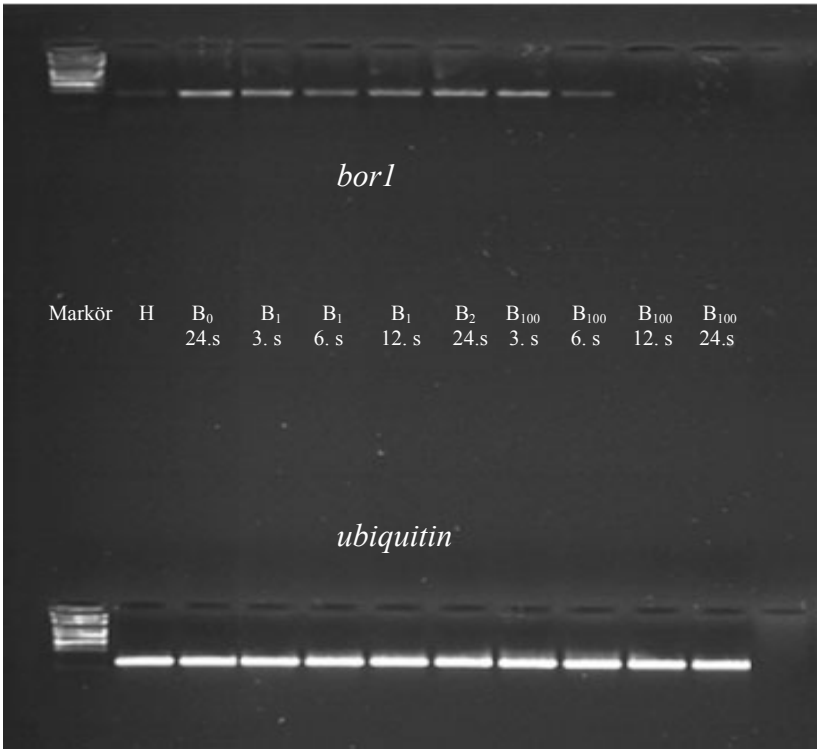
Kızıltan 91'in gövde cDNA örneklerinde *bor1*'e ait net ekspresyon değerleri Şekil 4.4'de verilmiştir.

Kızıltan 91'in gövde örneklerinde hem H, hemde B_0 ortamında bu genotipin B'a olan ihtiyacının daha fazla olmasıyla uyumlu bir şekilde gövdedeki *bor1* geni ekspresyon düzeyi maksimum seviyede bulunmuştur. Bitkilerin B_1 ortamına alınmasıyla birlikte *bor1* geni ekspresyonu gövdede yüksek miktarda olmasıyla birlikte ekspresyon düzeyinin giderek azaldığı görülmektedir. B_{100} ortamındaki gen ekspresyonunda da 24 saat boyunca nispi bir azalma görülmüş ancak bu azalma B_1 seviyesine göre daha fazla olmuştur.



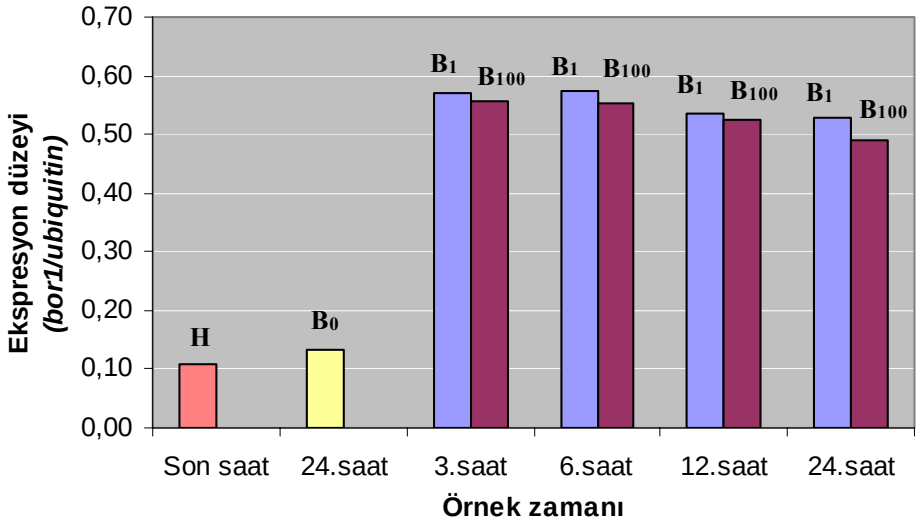
Şekil 4.4. Kızıltan-91 gövde örneklerinde *bor1* geninin ekspresyon düzeyleri

Çakmak-79'un kök cDNA örneklerinde Bor1F1-R1 ve WubiquitinF-R ile yapılan RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Çakmak-79 kök örneklerinde *bor1* ve *ubiquitin* genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi

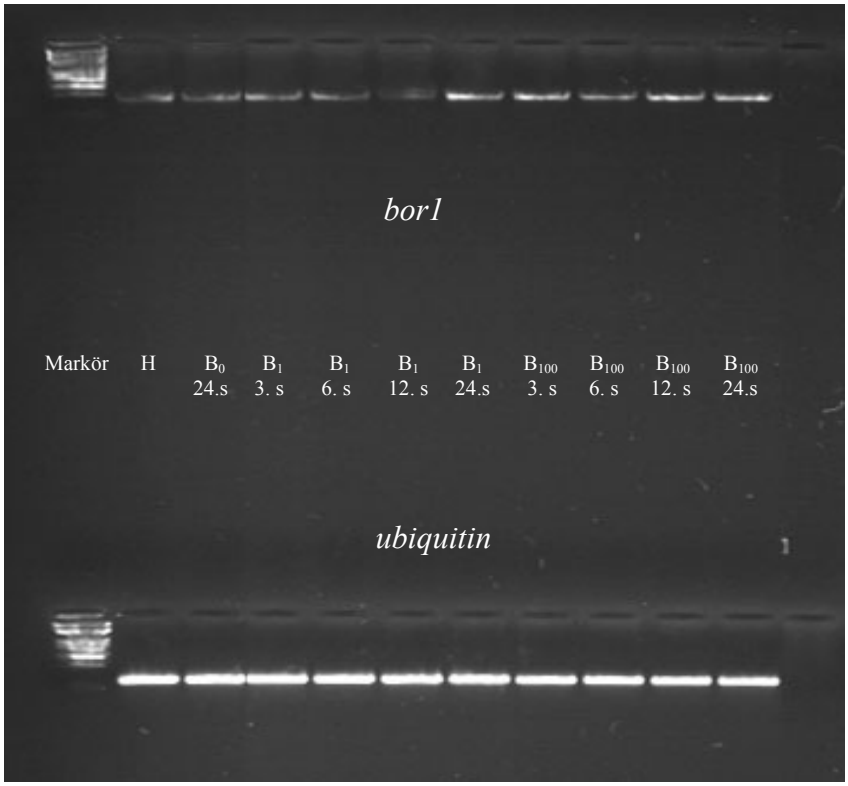
Çakmak-79'un kök cDNA örneklerinde *bor1*'e ait net ekspresyon değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Çakmak-79 kök örneklerinde *bor1* geninin ekspresyon düzeyleri

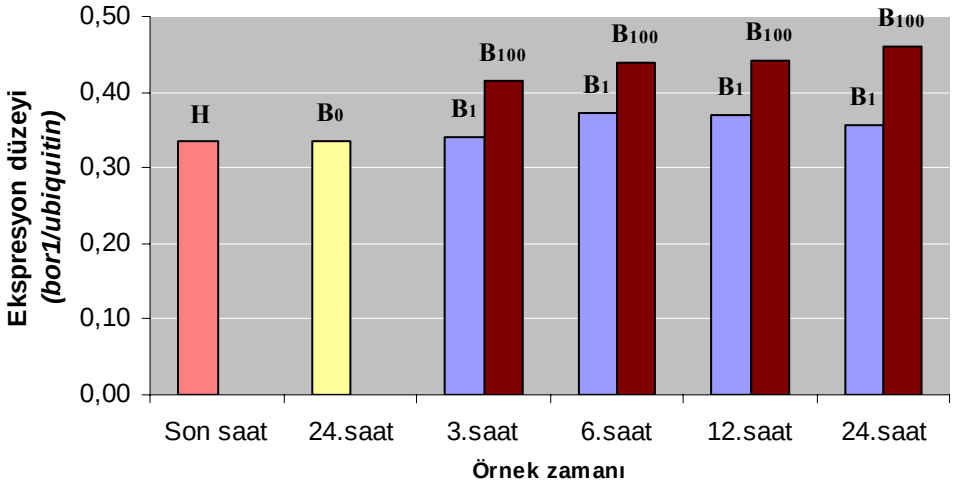
Şekil 4.6 incelendiğinde genotipin fazla B'a ihtiyaç duymamasından gerek kritik seviyede B içeren H ortamında gerekse hiç B içermeyen B_0 ortamındaki örneklerde Kızıltan-91 çeşidinin aksine genin ekspresyon düzeyleri çok düşük seviyededir. Özellikle H ortamında pasif taşımanın genotipin ihtiyaç duyduğu B miktarını büyük bir oranda karşılamasından dolayı gen ekpresyon düzeyi oldukça düşük seviyededir. Örnekler B_0 ortamına alındıktan sonra ortamda hiç B bulunmamasından gen ekspresyonu bir miktar artış göstermektedir. Bitkinin B_1 ve B_{100} ortamına alınmasıyla genin ekspresyonu, bitkinin B'suz ortamdan gelmesinden dolayı başlangıçta ani bir şekilde hızlanmış ancak hem B_1 ortamında hem de B_{100} ortamında giderek bir azalma göstermiştir. Bu azalma B_{100} ortamında B_1 ortamına göre ortamdaki B'un aşırı yüksek olmasından dolayı daha yüksek seviyede olmuştur.

Çakmak-79'un gövde cDNA örneklerinde Bor1F1-R1 ve WubiquitinF-R ile yapılan RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Çakmak-79 gövde örneklerinde *bor1* ve *ubiquitin* genlerinin ekspresyonlarının RT-PCR ile izlenmesi

Çakmak-79'un gövde cDNA örneklerinde *bor1*'e ait net ekspresyon değerleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Çakmak-79 gövde örneklerinde *bor1* geninin ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.8 incelendiği zaman, Çakmak-79'un H ve B_0 örneklerinde *bor1* gen ekspresyonunda köktekine benzer bir şekilde belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Bitkilerin B_0 ortamına alınmasıyla birlikte gen ekspresyonunda düşük düzeyde bir artış gözlenmektedir. Buna karşılık B_{100} örneklerinde, kökteki gerek aktif gerekse pasif taşınmayla, *bor1* gen ekspresyonunda 3. saatten itibaren 24 saat boyunca bir artış gözlenmektedir. Ancak Çakmak-79'un gövde örneklerinin gen ekpresyonu bütün aşamalarda Kızıltan-91'den daha düşüktür. Bu durum dayanıklı çeşitlerin fazla B'a ihtiyaç duymamasından kaynaklanmaktadır. Transjenik bitkilerde B noksanlığında Bor1-GFP füzyon proteinin kök ve gövdede yüksek seviyede biriktiği tespit edilmiştir. Bitkiler yüksek B ortamından düşük B ortamına transfer edildiğinde Bor1-GFP seviyesinin 24 saat içinde arttığı ve düşük B ortamından tekrar yüksek B ortamına transfer edildiğinde ise 24 saat içinde azaldığı gözlenmiştir. Buna göre *bor1* geninin birikiminin düzenlenmesinde post transkripsiyonal mekanizmalar büyük rol oynamaktadır (Takano ve ark. 2005).

Kızıltan-91 ile Çakmak-79 kıyaslandığı zaman, düşük B içeren H ve hiç B içermeyen B_0 ortamlarında Kızıltan-91 genotipinin, B'a duyduğu ihtiyacın fazla olmasından, gövde örneklerinde *bor1* gen ekspresyonu Çakmak-79'dan yaklaşık %143 oranında daha yüksek düzeydedir.

Kızıltan-91 ile Çakmak-79 genotiplerinin H ortamına ait kök örnekleri gen ekspresyon düzeyleri bakımından kıyaslandığında, aynı ortamda Kızıltan-91'in Çakmak-79'dan yaklaşık %775 oranında daha yüksek gen ekspresyonuna sahip olduğu görülmektedir.

Nable ve ark. (1997) bitkilerin yüksek B konsantrasyonlarına gösterdikleri tepkide çok geniş genetik varyasyonun bulunduğunu, bu genetik varyasyonun bitki türlerinin çoğunda benzer tolerans mekanizmasına sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Tolerans mekanizmasının birkaç baskın eklemeli gen ile idare edildiği, bazı türlerde belirli kromozom bölgelerinin toleransla ilgisinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın B analizleri kısmına bakıdığında da (Çizelge 4.7 ve 4.9)görüleceği üzere genotiplerin kök ve gövdedeki B konsantrasyonlarının farklı oluşu ve gen ekspresyon düzeyleri benzer sonuçları ortaya koymaktadır.

Takano ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde B'un bitki içerisindeki taşınımı ile ilgili ilk defa bir taşıyıcı protein

kodlayan *bor1* geni tespit edilmiştir. Elde edilen sekans verileri analiz edildiğinde bu genin memelilerdeki borat taşıyıcı protein ailesine benzerlik göstediğini belirlenmiştir. Bu gen kökte periskl hücrelerinde sentezlenerek B'un ksileme taşınmasında görev aldığı ve gövdeyi B noksanlığından koruduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan hassas ve dayanıklı genotipler arasında genin ekspresyonuna bağlı olarak noksan ve toksik düzeydeki ortamlarda sentezlenme düzeyleri her iki çeşit arasında da farklı olmuştur. Gen sentezlenme düzeylerine bağlı olarak genotipler hassas veya dayanıklı olarak sınıflandırılabilmektedir.

B toksitesi bakımından genotipler arasında topraktaki B toksitesine karşı, toksite belirtilerinin şiddeti ve büyümedeki azalma bakımından büyük bir genotipik varyasyon olmaktadır. Genotipler arasında görülen B toleransının, B'un köklerce alınmayarak dışarıda tutulma mekanizması ile ilişkili olmadığı, B'un hücre duvarında tutulması gibi içsel tolerans mekanizmalarının daha kabul edilebilir olduğunu gösterdiği düşünülmektedir (Torun ve ark. 2006). Bizim sonuçlarımıza bakıldığında da dayanıklı olarak bilinen bitkinin toksik ortamda B'u bünyesine hiç almaması değil gen sentezi düzeyinde tolerans mekanizmasının olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışmaya paralel olarak, Miwa ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada da *bor1* geninin aktarıldığı transjenik *Arabidopsis* bitkisinin düşük B ortamında kökten gövdeye B taşınması artarak, bitki B noksanlığından kendini korumuştur.

Hu ve Brown (1997) ye göre Wilders ve Neales (1971), havuç ve şeker pancarından disk şeklinde kesilmiş bitki kök dokularında 0,1 μM borik asit çözeltisi kullanarak absorbsiyon ve desorbsiyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışma sonucunda hücre içi B konsantrasyonu dış ortamdan daha yüksek bulunmuştur. Burada aktif alımın gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Halbuki B'un bitki bünyesine alınmasının, sadece pasif taşınmayla olduğu bilinmekteydi. Bowen ve Nissen (1977), 5-7 günlük arpa fidelerinden alınmış kök parçalarında kısa süreli B alım çalışmaları yapmışlardır. Farklı B konsantrasyonlarında (0,5- 13 μM B) aktif B alımının gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Hu ve Brown 1997). Takano ve ark.'nın 2002 yılında *bor1* genini belirlemesiyle, B'un bitki bünyesine taşınmasında aktif taşınmanın önemli olduğu görülmüştür. Özellikle B konsantrasyonunun düşük, bitkinin B

ihtiyacının ise çok yüksek olduğu durumlarda aktif taşımanın önemli hale geldiği anlaşılmıştır.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında Kızıltan-91'in daha fazla B'a ihtiyacı olduğu görülmektedir. Aktif taşıma Kızıltan-91'de Çakmak-79'a göre daha fazla önem kazanmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda aktif taşımanın önemi azalmaktadır. Takano ve ark. (2002) mutant *Arabidopsis* bitkisi ile yaptıkları çalışma sonuçları ile bizim sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Kızıltan-91'de hem kök hem de gövdede Çakmak-79'un yaklaşık 2 katından fazla bir ekspresyon izlenmektedir. Çakmak-79 B noksanlığına daha dayanıklı olduğu için bu genin ekspresyonu Çakmak-79'da daha az olmaktadır.

Kök ve gövdedeki B konsantrasyonunun en düşük seviyelerde olduğu H ve B_0 ortamlarında Kızıltan-91 genotipinin en yüksek gen ekspresyon düzeyine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bugünkü anlayışla B'un bitkiye kazandırılmasındaki hâkim görüşle paralellik arz etmektedir.

Takano ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışma transjenik *Arabidopsis* bitkisinde BOR1 proteininin hücre zarından endozomlar vasıtasıyla kofula taşınarak parçalandığını göstermiştir. Bitkiler B_{100} ortamından $B_{0,1}$ ortamına transfer edildiğinde Bor1-GFP seviyesinin 24 saat içinde arttığı ve $B_{0,1}$ ortamından tekrar B_{100} ortamına transfer edildiğinde ise 24 saat içinde azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar yüksek B seviyesinde gövdeyi toksik B birikiminden ve düşük B seviyesinde ise B noksanlığından korumak için BOR1 proteininin endositozis ve parçalanma sürecinin ortamdaki B miktarı tarafından belirlendiğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada gen ekspresyonlarının izlenmesinde kullanılmış olan metod kullanılabilecek en hassas metod değildir. Daha yüksek hassasiyette bu ekspresyonlar, *bor1* geninde veya B'suz ve yüksek B'lu ortamda etkinlik gösteren stres genlerindeki etkinliğin daha hassas bir şekilde izlenebilmesi için, tek genle ilgili çalışmalarda Northern Blot analizi ve çoklu genlerle yapılacak çalışmalarda ise hassas yöntemlerden Real Time RT-PCR çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

4.2. Bitkilerdeki B Konsantrasyonları

Denemede kullanılan çeşitlerin, çimlenme için ekim yapılmadan önce tek başağa ait danelerindeki B konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla ICP-AES analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Denemede kullanılan çeşitlerin çimlenme öncesine ait ortalama dane B konsantrasyonları

Çeşit	B konsantrasyonu (mg kg^{-1})
Kızıltan-91	1.42
Çakmak-79	3.05

Çizelge 4.5 incelendiğinde dane B konsantrasyonlarının bitki gövde B içeriklerine göre düşük olduğu gözlenmektedir. Kızılgöz ve Özberk'e (2005) göre makarnalık buğday çeşitlerinde danedeki B toksite sınırının 11.3-14.4 mg kg^{-1} arasında olduğu bildirilmektedir. Bu sınır dikkate alındığında, denemede kullanılan çeşitlere ait danelerdeki B miktarının düşük olması bitkinin uygulanan B dozlarına tepkisini daha belirgin hale getirmektedir. Denemede kullanılan danelerin elde edildiği toprak ortamının B içeriğinin düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Kızıltan-91 ile Çakmak-79 genotipleri arasındaki önemli farklılıklardan birisi danedeki B içerikleridir. Kızıltan-91 çeşidinin danedeki B içeriği Çakmak-79 çeşidinin danedeki B içeriğinin yarısından azdır.

Su kültüründe farklı B konsantrasyonlarında büyütülmüş Çakmak-79 ve Kızıltan-91 fidelerinin gövde ve kök örneklerinin B konsantrasyonları ICP-AES cihazı ile belirlenmiştir. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerine ait gövde B birikimleri üzerine yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin gövde örneklerinin B birikimlerine yapılan varyans analizi sonucu çeşit, örnek zamanı ve çeşit x örnek zamanı arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak %1 seviyesinde önemli olduğu görülmektedir. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerine ait gövde B birikimleri ve LSD testi sonuçları çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin farklı B dozları ve farklı zamanlarda gövde B konsantrasyonlarına ait varyans analiz sonuçları

V.K.	S.D.	K.O.	F
Çeşit	1	2717	272**
Örnek Zamanı	9	58452	5857**
Çeşit x Örnek Zamanı	9	4463	447**
Hata	20	10	
Genel	39		

**P<0,01

Çizelge 4.7. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin gövde B konsantrasyonları

Örnek Zamanı	B Konsantrasyonları (mg kg^{-1})		Ortalama
	Kızıltan-91	Çakmak-79	
H son s	56.07 **jkl***	53.79 **jklm**	54.93 **g**
B_0 24.s	57.97 **jk**	52.12 **klm**	55.05 **g**
B_1 3.s	40.74 **n**	48.83 **lmn**	44.79 **h**
B_1 6.s	45.96 **mn**	62.57 **j**	54.27 **g**
B_1 12.s	173.84 **g**	74.24 **i**	124.04 **f**
B_1 24.s	179.09 **g**	214.69 **e**	196.89 **c**
B_{100} 3.s	134.84 **h**	177.74 **g**	156.29 **e**
B_{100} 6.s	139.19 **h**	203.49 **f**	171.34 **d**
B_{100} 12.s	399.46 **b**	296.82 **d**	348.14 **b**
B_{100} 24.s	437.09 **a**	315.31 **c**	376.20 **a**
Ortalama	166.43 **a**	149.96 **b**	

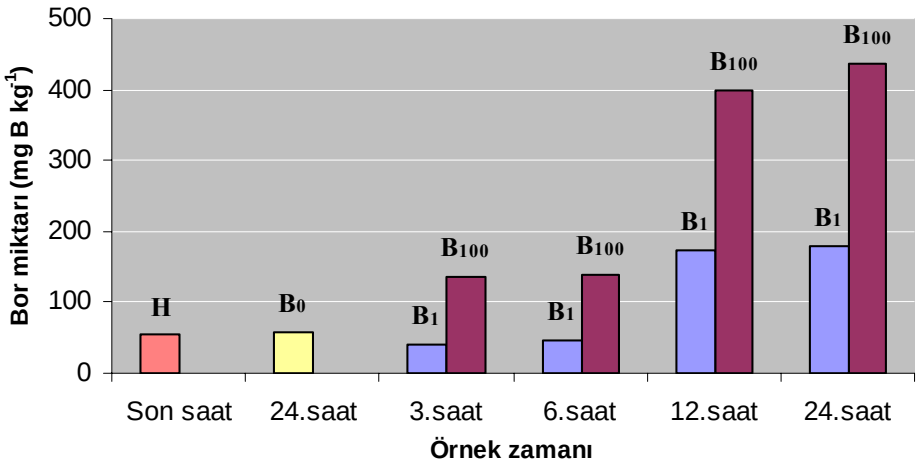
$LSD_{\%1}$ Çeşit: 2.845, $LSD_{\%1}$ Örnek zamanı: 6.362, $LSD_{\%1}$ ÇeşitxÖrnek zamanı: 8.998
* Aynı harflegösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir

Çizelge 4.7'nin incelenmesinden görüleceği üzere genel olarak B dozunun artmasıyla çeşitlerin gövde B birikimlerinin de arttığı görülmektedir. Bu artış en fazla B_{100} dozunda meydana gelmektedir. Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde Kızıltan-91'in gövde B birikimi Çakmak-79'dan daha yüksek olmuştur. B dozuna bağlı zaman dikkate alındığında iki çeşitte de en yüksek B birikimi B_{100} dozu 24. saatte (437.09 mg kg^{-1} ve 315.31 mg kg^{-1}) meydana gelmiştir.

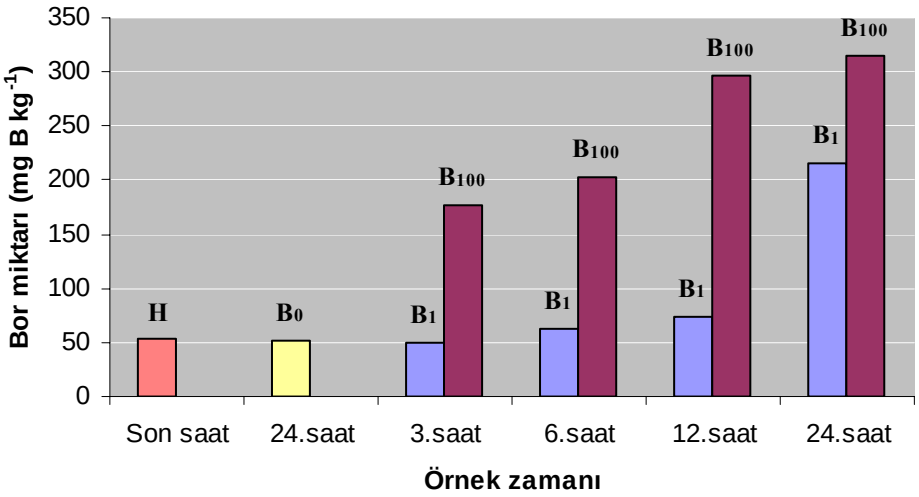
Çeşit x örnek x zamanı interaksiyonu incelendiğinde gövde B birikimi 40.74 mg kg^{-1} ile 437.09 mg kg^{-1} arasında değişim göstermiştir. En yüksek B konsantrasyonu Kızıltan-91 çeşidinin B_{100} dozu 24. saat örneklerinde tespit edilirken,

en düşük B konsantrasyonu yine Kızıltan-91 çeşidinin B_1 dozu 3. saat örneklerinde belirlenmiştir. Ortam B konsantrasyonunun ve örnek zamanının ilerlemesiyle B alımının arttığı görülmektedir. Nable ve ark. (1990a), Schooner (B toksitesine çok duyarlı), Sahara 3771 (toleranslı) ve WI-276 (kısmen toleranslı) arpa çeşitleriyle yaptıkları uzun süreli deneylerde, 0.618-395 mg l^{-1} borik asit aralığında B konsantrasyonu arttıkça B alımının lineer olarak arttığını bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da ortaya çıkmıştır.

Fidelerin B dozları ve zamana bağlı gövde B konsantrasyonlarının değişimi grafiksel olarak Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Kızıltan-91 çeşidine ait gövde B konsantrasyonları



Şekil 4.10. Çakmak-79 çeşidine ait gövde B konsantrasyonları

Kızıltan-91'in, H ortamında gövdesine aldığı B, B_0 ortamında kökten gövdeye taşınarak artmış ancak B_1 ortamına alınmasının ilk saatlerinde ise kökteki B eksilmesinden dolayı azalmıştır. Bu durum bitkinin tekrar bünyesine B alabilmesi için geçen süre olarak 6. saat sonuna kadar devam etmiştir. Bitki B_{100} ortamına alınmasından sonra ise ortamda aşırı miktarda B bulunmasından dolayı gövdeye daha kısa sürede B'u alabilmiştir (Şekil 4.9). Benzer sonuçlara Çakmak-79'da da rastlanmaktadır. Ancak Çakmak-79'un gövdede B birikim miktarı Kızıltan-91'den daha az olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.10).

Bitki türleri arasında olduğu gibi, aynı türün çeşitleri arasında da B'a duyarlılıkta büyük farklılıkların olduğu ve bu farklılıkların nedeninin de bitkilerin B toksitesinden fizyolojik olarak aynı derecede etkilenmemesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Paul ve ark. 1988, Nable 1991). B toksitesine direnç gösteren buğday çeşitleri 150 mg B kg^{-1} uygulanan toprakta yetiştirildiklerinde üründe önemli bir azalma göstermezlerken, aynı konsantrasyonda yetiştirilen B'a duyarlı çeşitlerde ise şiddetli ürün kayıpları olmakta ve hatta bu çeşitler 25 mg B kg^{-1} uygulamasında dahi verim azalması göstermektedir (Paul ve ark. 1988). Bizim çalışmamızda fideler henüz çok küçük olduğu için toksite belirtileri görülmemiştir.

Nable (1988), Nable ve ark. (1990b), Güneş ve ark. (2000), dayanıklı genotiplerin gövdede daha az B biriktirdiğini ifade ederken, bazı araştırıcılar da bunun aksine (Subedi ve ark., 1999), buğday çeşitlerinin toleranslılığı ya da hassaslığının bayrak yaprak B içeriği ve konsantrasyonu ile ilgili olmadığını belirtmiştir. Yine benzer şekilde Yau ve ark. (1995) yüksek B uygulamasında çeşitler arasında sürgün B konsantrasyon farklılıklarının önemli olmadığını belirtmişlerdir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin kök B konsantrasyonlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8'de ve ve bunlara ait ortalama değerler Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin kök örneklerinin B birikimlerine yapılan varyans analizi sonucu çeşit, örnek zamanı ve çeşit x örnek zamanı arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak %1 seviyesinde önemli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.8. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin farklı B dozları ve farklı zamanlarda kök B konsantrasyonlarına ait varyans analiz sonuçları

V.K.	S.D.	K.O.	F
Çeşit	1	27009	2936**
Örnek Zamanı	9	647420	70000**
Çeşit x Örnek Zamanı	9	87479	9510**
Hata	20	9	
Genel	39		

**P<0,01

Çizelge 4.9. Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin kök B konsantrasyonları

Örnek Zamanı	B Konsantrasyonları (mg kg^{-1})		Ortalama
	Kızıltan-91	Çakmak-79	
H son saat	233.72 **j***	120.38 **o**	177.05 **g**
B_0 24.saat	130.25 **n**	107.06 **p**	118.66 **i**
B_1 3.saat	163.13 **m**	186.52 **l**	174.83 **gh**
B_1 6.saat	127.79 **no**	211.97 **k**	169.88 **h**
B_1 12.saat	122.23 **o**	283.03 **i**	202.63 **f**
B_1 24.saat	89.36 **q**	427.11 **h**	258.24 **e**
B_{100} 3.saat	1094.22 **c**	709.20 **f**	901.71 **d**
B_{100} 6.saat	1111.63 **b**	767.43 **e**	939.53 **c**
B_{100} 12.saat	910.33 **d**	1091.03 **c**	1000.68 **a**
B_{100} 24.saat	691.46 **g**	1285.79 **a**	988.63 **b**
Ortalama	467.41 **b**	518.96 **a**	

$LSD_{\%1}$ Çeşit: 2.699, $LSD_{\%1}$ Örnek zamanı: 6.036, $LSD_{\%1}$ ÇeşitxÖrnek zamanı: 8.536
* Aynı harflegösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitleri ile bu çeşitlerin kök B konsantrasyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak %1 seviyesinde önemlidir. Çizelge 4.9'da çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde Çakmak-79'un kök B konsantrasyonunun Kızıltan-91'den daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı konsantrasyonlarda B içeren topraklarda yetiştirilen bitkilerin B alım kapasiteleri çeşitler arasında karakteristik olarak farklılık göstermektedir (Taban ve Erdal 2000).

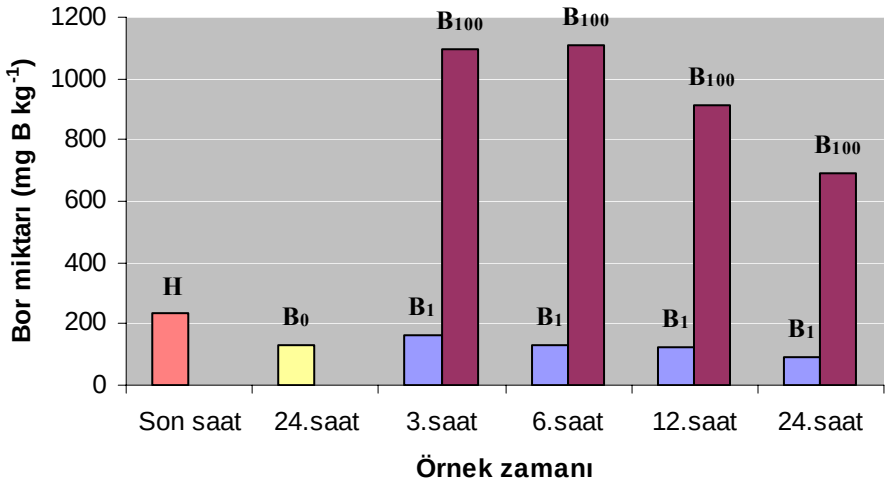
Çeşit x örnek zamanı interaksiyonu incelendiğinde B alımı 89.36 mg kg^{-1} (Kızıltan-91, B_1 uygulaması 24. saat) ile 1285.79 mg kg^{-1} (Çakmak-79, B_{100} uygulaması 24. saat) arasında değişim göstermiştir. Burada dikkat çekici bir nokta

özellikle aşırı toksik B dozu ve ilerleyen saatlerde Çakmak-79'un Kızıltan-91'e kıyasla kök'te daha fazla B biriktirdiği ve aynı çeşidin aynı doz ve saatlerdeki gövde B konsantrasyonunun ise Kızıltan-91'e göre çok daha düşük olduğudur. Örnek zamanları genel olarak değerlendirildiğinde en yüksek B konsantrasyonu B_{100} dozu 12. saatte tespit edilirken, en düşük B konsantrasyonu ise B_0 dozu 24. saatte belirlenmiştir.

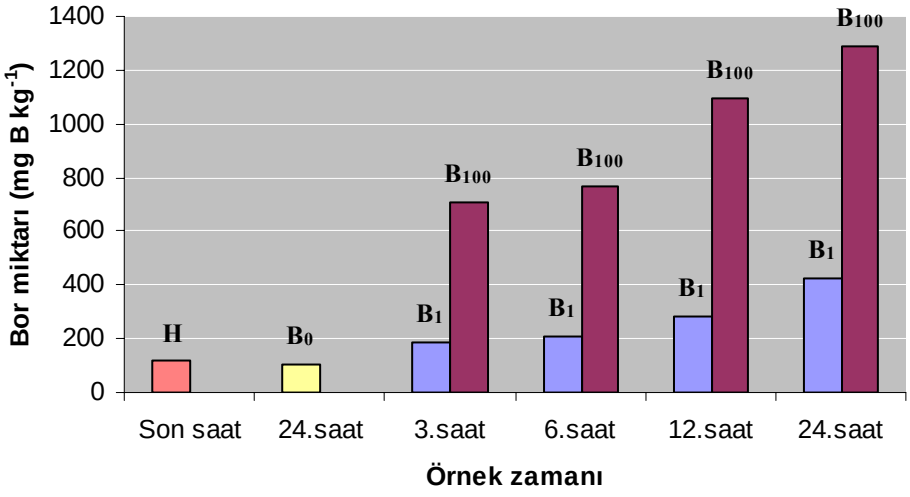
Paull ve ark. (1992), Cartwright ve ark. (1987), bazı bitkilerin kök sistemlerinde yer alan fiziksel bir bariyer vasıtasıyla veya kök sisteminden B'u uzaklaştırmaya yarayan pompa benzeri mekanizmalar ile kimi bitkilerin kök sistemlerinde bir takım kimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla rizosfer pH'sını değiştirerek B'un yarayışlılığı azaltılmak suretiyle B'a dayanıklılıklarını artırabildiklerini ifade etmişlerdir. Bazı bitkilerin de köklerinden gövdeye B'un taşınmasını engelleyerek yüksek B konsantrasyonlarına dayanabildiklerini belirtmişlerdir. Buradan hareketle dayanıklı olarak bilinen genotipin köklerinde B oranının yüksek olması B'a hassas olarak bilinen genotipe göre daha fazla köklerinde tutarak gövdeye taşınmasını azaltma mekanizması olarak değerlendirilebilirdi. Ancak Nable ve ark. (1990b), arpada toksite tepkilerini belirlemek için çalışmışlar ve her genotipin uygulamalardan farklı etkilendiğini tespit etmişlerdir. Toksiteye daha dayanıklı olan genotiplerin kök ve yeşil aksamda daha az B biriktirdiğini ifade etmişlerdir. Bu nedenle kök B içeriklerindeki durum tam olarak ortaya konulamamıştır. Bazı araştırıcılar da; Yau ve ark. (1995); Subedi ve ark. (1999); Torun ve ark. (1999), bitki B konsantrasyonu ile dayanıklılık mekanizması arasında ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, moleküler kısma bakıldığında, Çakmak-79 çeşidinde B taşıyıcı gen olarak bilinen *bor1* geninin ekspresyon düzeyinin Kızıltan-91 çeşidinden daha düşük düzeylerde olduğu, bir başka ifadeyle genin aktivitesinin düşük olduğu görülmektedir. Gen aktivitesindeki bu düşüklük yüksek B dozlarında ve ilerleyen saatlerde daha da artmaktadır. Bu durum sonucu da B kökten gövdeye daha az taşınmaktadır şeklinde ifade edilebirlir. Nable ve ark. (1997) bitkilerin yüksek B konsantrasyonlarına gösterdikleri tepkide çok geniş genetik varyasyonun bulunduğunu, bu genetik varyasyonun bitki türlerinin çoğunda benzer tolerans mekanizmasına (sürgün ve köklerdeki düşük B alımına) sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Tolerans mekanizmasının birkaç baskın eklemeli

gen ile idare edildiği, bazı türlerde belirli kromozom bölgelerinin toleransla ilgisinin olduğu tespit edilmiştir.

Kızıltan-91 bitki köklerinin, bünyesine H ortamında, yüksek düzeyde (233.72 mg kg^{-1}) B aldığı görülmektedir. Bitkilerin hem B_1 hem de B_{100} ortamına alınmasıyla birlikte köklerdeki B konsantrasyonu ilk 3 saat içerisinde en yüksek seviyeye ulaşmış ve daha sonra düzenli olarak azalmaya başlamıştır. B_{100} ortamına alınan bitkilerde ortamdaki yüksek B konsantrasyonu ile bitki kök bünyesindeki B konsantrasyonu arasındaki farktan dolayı, bitkinin kök bünyesine yüksek seviyede B aldığı görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kızıltan-91 çeşidine ait kök B konsantrasyonları



Şekil 4.12. Çakmak-79 çeşidine ait kök B konsantrasyonları

Çakmak-79 H ortamından kök bünyesine aldığı B miktarı ile B_0 ortamından aldığı B miktarı arasında Kızıltan-91 kadar bir fark olmadığı anlaşılmaktadır. Bu durum Çakmak-79'un B'a fazla ihtiyaç duymadığını göstermektedir. Bitkinin B_1 ve B_{100} ortamına aktarılmasıyla birlikte, ortamın B konsantrasyonuna da bağlı olarak kök bünyesine alınan B miktarında düzenli bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.12).

Serbest bölgedeki, sitoplazmadaki, vakuoldeki ve hücre duvarındaki B konsantrasyonunun dış çözeltideki B konsantrasyonundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İçsel B konsantrasyonunun dış ortam B konsantrasyonundan yüksek olmasının B'un aktif alımına ilişkin kanıt olamayacağı, ancak bu durum boratın hücre içerisinde mono ya da diesterler oluşturmasından ve sonra da B izotoplarıyla yer değiştirmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Theiler ve ark. 1979).

Bu çalışmada yüksek B içeren ortamlarda yetiştirilen genotipler arasında B alımında çok fazla farklılık görülmemektedir. Ortamdaki yüksek B iki genotip tarafından da aktif ve pasif taşımayla yeteri kadar alınabilmektedir. Genotiplerin hassas veya dayanıklı olarak sınıflandırılması düşük konsantrasyonlu ortamlarda ortaya çıkmaktadır. Çalışmamıza paralel şekilde Takano ve ark. (2005), *bor1-1* mutantı, yabani tip ve transgenik Arabidopsis bitkileri kullanarak farklı B koşullarında bu bitkilerin gövde B konsantrasyonları ve *bor1* geninin ekspresyon düzeylerini araştırdıkları çalışmada bitkiler yüksek (100 µM borik asit, B_{100}) ve düşük (0,1 µM borik asit, $B_{0,1}$) B ortamlarında büyütüldükten sonra tekrar yüksek B ortamına alınmıştır. B_{100} ortamında B birikimi yabani ve mutant bitkide benzer olmuştur. $B_{0,1}$ ortamında yabani tip bitki, mutanta göre gövdede daha fazla B biriktirmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Su kültürü uygulamaları, kontrollü şartlarda gerçekleştirilen sera-saksı çalışmalarına göre, özellikle de tarla çalışmalarına göre, moleküler yöntemler açısından daha uygun çalışmalardır. Element alımı gibi içerikteki çok küçük farklılıkların dahi bitkideki metabolik faaliyetlere yansımasının çok yüksek olabileceği durumlarda, bitki büyütme ortamında yer alan elementlerin mevcut şartlarda en yüksek hassasiyetle ortama uygulanabileceği ve çevresel faktörlerin ortadan kaldırıldığı bir yöntem olması dolayısıyla su kültürünün önemini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması kapsamında B taşıyıcısı olarak bilinen *bor1* geninin sentezlenme düzeylerine bakıldığında, B'un bitkiler tarafından alınabilirliğini etkileyecek, toprağın yapısı, pH'sı, nemi, sıcaklığı, organik madde ve kil mineralleri içeriği gibi birçok faktör su kültürü yöntemiyle ortadan kaldırılmakta ve tepkiler net olarak ortaya konmaktadır.

Çalışma kapsamında kullanılan yöntem sayesinde bitkilerin element alım mekanizmaları açığa çıkarılmakta ve genotiplerin tolerans ve hassasiyetleri tespit edilerek istenilen yönde seçim yapılabilmektedir.

Yapılan araştırmalarda bitkilerin başakçık ve çiçek oluşturma sırasında B noksanlığına gösterdikleri tepkilere göre toleranslı hatlardan duyarlı hatlara geri melezleme ile tolerans özelliklerinin transfer edilebileceği ifade edilmiştir. Belirli türlerde B hareketinin bilinmesi, bitkideki B durumunu teşhis etmek için kullanılması gereken yaklaşımın belirlenmesinde kolaylık sağlayacağı, B eksikliğinin sebep ve sonuçlarını anlamaya yardımcı olacağı ve kullanılması gereken optimum gübre miktarının belirlenmesini de sağlayacağı bilinmektedir. Yaptığımız bu tez çalışması kapsamında da çeşitlerin özelliklerinin ve B hareketinin belirlenmesi ile özellikleri bilinen uygun bölgeler için uygun genotip seçimlerinin yapılması ön plana çıkarılmaktadır.

Makarnalık buğday çeşitlerinin (Kızıltan-91 ve Çakmak-79) B uygulamalarına verdiği tepkilerin moleküler seviyede incelenmesi ve bitkiler tarafından bu elementin alım mekanizmasının araştırılması amacıyla yapılan bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79'un izole edilen kök ve gövde RNA konsantrasyonlarının yeterli seviyede olduğu belirlenmiştir.

Kızıltan-91 hem kök hem de gövde örneklerinde genotipin ihtiyaç duyduğu fazla B'un karşılanabilmesi için, gerek kritik B içeriğine sahip H ortamındaki örneklerde gerekse B içermeyen B_0 ortamındaki örneklerde *bor1* geninin ekspresyonu maksimum seviyede olduğu belirlenmiştir. Aynı çeşidin normal seviyede B_1 ve yüksek B_{100} B içeren ortamlarda yine kök ve gövde örneklerinde *bor1* geninin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Gen ekpresyonunun yüksek olması ile B noksanlığına hassas olarak bilinen Kızıltan-91 çeşidinde düşük B içeren ortamlarda pasif taşımanın yeterli olmadığı ve aktif taşımanın daha önem kazandığı görülmüştür. Yüksek B içeren ortamda, B'un köke pasif bir şekilde, yeterli miktarda alınması sonucu gen ekspresyonunun azaldığı anlaşılmıştır.

Çakmak-79 çeşidinde hem kök hem de gövde örneklerinde genotipin fazla B'a ihtiyaç duymamasından gerek kritik seviyede B içeren H ortamında gerekse hiç B içermeyen B_0 ortamındaki örneklerde Kızıltan-91 çeşidinin aksine genin ekspresyon düzeyleri çok düşük seviyede olduğu görülmüştür. Yine aynı çeşidin kök ve gövde örneklerinde normal seviyede B_1 ve yüksek B_{100} B içeren ortamlarda gerek aktif gerekse pasif taşınmayla, *bor1* gen ekspresyonunda başlangıçta bir artış olduğu ancak ekspresyon düzeyinin ileriki saatlerde giderek azaldığı belirlenmiştir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin gövde örneklerinin B birikimleri ile çeşit, örnek zamanı ve çeşit x örnek zamanı arasındaki ilişkinin istatiksel olarak %1 seviyesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Genel olarak B dozunun artmasıyla çeşitlerin gövde B birikimleri artmaktadır. En az B birikimi 40.74 mg kg^{-1} ile B_1 ortamı 3. saatte Kızıltan-91 çeşidinde, en fazla B birikimi ise 437.09 mg kg^{-1} ile B_{100} dozu 24. saatte yine Kızıltan-91 çeşidinde meydana gelmiştir. Genel olarak Kızıltan-91'in gövde B birikimi Çakmak-79'dan daha yüksek olmuştur. B dozuna bağlı zaman dikkate alındığında iki çeşitte de en yüksek B birikiminin B_{100} dozu 24. saatte meydana geldiği tespit edilmiştir.

Kızıltan-91 ve Çakmak-79 çeşitlerinin kök örneklerinin B birikimleri ile çeşit, örnek zamanı ve çeşit x örnek zamanı arasındaki ilişkinin istatiksel olarak %1 seviyesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Genel olarak Çakmak-79'un kök B konsantrasyonunun Kızıltan-91'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. B alımı 89.36

mg kg^{-1} (Kızıltan-91, B_1 uygulaması 24. saat) ile 1285.79 mg kg^{-1} (Çakmak-79, B_{100} uygulaması 24. saat) arasında değişim göstermiştir. Toksik B dozunda Çakmak-79'un Kızıltan-91'e kıyasla kök'te daha fazla B biriktirdiği belirlenmiştir.

Son yıllara kadar hakim görüş olan B'un bitkilerdeki pasif taşınmasının, özellikle düşük B konsantrasyonlarında ve özellikle de B noksanlığına hassas olan bitkilerde, aktif taşımayla desteklendiğini görmekteyiz. Nitekim bu çalışmada kullanılan makarnalık buğday çeşitlerinden Kızıltan-91'in düşük seviyede B içeren ortamlardan B ihtiyacını yeterince karşılayabilmesi için, Çakmak-79'a göre B taşıyıcı genin ekspresyonunda belirgin bir şekilde artışlar olduğu görülmüştür.

Literatür bilgilerinin de paralelinde B'a toleranslılık özelliği bir seleksiyon kriteri olarak kullanılırsa B toksik ve noksan topraklardaki büyük ürün kayıpları engellenebilir. Bölge için önemli bir bitki olan makarnalık buğdayların ekiminin yapılacağı alanlardaki B içeriklerinin belirlenmesi ile bu ortamlara uygun çeşitlerin önerilmesi ve verim kayıplarının önlenmesi mümkün olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma ile henüz tam olarak aydınlatılamayan B'un bitkideki hareket mekanizmasına moleküler düzeyde ışık tutulmaya çalışılmış ve bilgimiz dahilinde ilk defa, ekonomik değeri çok yüksek bir bitki türü olan buğdayda, B taşınmasında faaliyet gösteren proteinle ilgili RNA düzeyleri belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, mRNA ekspresyonlarının izlendiği genin kısmi klonlanmasının yapılmış olması genin tamamının klonlanması yönünde atılmış önemli bir adımı oluşturmaktadır. Ancak araştırılan noktaların netleşmesi için konu üzerine çalışmaların devam etmesinin yararlı olacağı kanaatindeyim.

6. KAYNAKLAR

Alkan, A., 1998. Farklı Tahıl Ürünleri ile Buğday ve Arpa Çeşitlerinin Bor Toksisitesine Dayanıklılığının Araştırılması ve Dayanıklılıkta Rol Alan Faktörlerin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Adana.

Anonim, 2002. Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü Verileri, Ankara.

Anonim, 2005a. FAOSTAT Database.

Anonim, 2005b. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü Verileri, Ankara.

Anonim, 2005c, Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü Verileri, Ankara.

Atalay, E., Gezgin, S., Babaoğlu, M., 2003. Buğday (*Triticum durum* Desf.) ve Arpa (*Hordeum Vulgare* L.) *İn Vitro* Fidelerinin Bor Alımının ICP-AES ile Tespiti. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 17 (32), 47 -52.

Ayvaz, M., 2002. Bazı Arpa Çeşitlerinde Borun Büyüme ve Gelişme Üzerine Etkileri. Ege üniversitesi FBE Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Barut, H., 1997. Çinko Eksikliği ve Bor Toksitesi Gösteren Topraklarda Gyttja Uygulamasının Buğdayın Büyümesi ve Çinko ve Bor Konsantrasyonları Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Toprak Anabilim Dalı, Adana.

Bellaloi, N., Brown, P.H., Dandekar, A., 1999. Manipulation of Invivo Sorbitol Production Alters Boron Uptake and Transport in Tobacco. Plant Physiology, 119: 735 – 741.

Bergmann, W., 1992. Nutritional Disorders of Plants. Gutsal Fisher Verlag Jena, Stuttgart, Germany.

Brown, P.H., Hu, H., 1994. Boron Uptake by Sunflower. Squash and Cultured Tobacco Cells, Pfysiol, Plant, 91: 435 – 441.

Brown, P.H., Hu, H., 1996. Phloem Mobility of Boron is Species Dependent: Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol – rich Species. Annals of Botany, 77 (5): 497.

Brown, P.H., Hu, H., 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants. Plant and Soil, V: 196(2): 211-215.

Brown, P.H., Hu, H., 1998. Boron mobility and consequent management in different crops. Better Crops with Plant Food, 82:2, 28-31, 3 col. pl.

Brown, P.H., Shelp, B.J., 1997. Boron Mobility in Plants. Boron in Soils and Plants: Reviews. Kluwer Academic Publishers, Printed In The Netherlands, Plant and Soil, 193: 85-101.

Campbell, T.A., RRathjen, A.J., Paull, J.G., Islam, A.K.M.R., 1998. Method for screening bread wheat for tolerence to boron. Euphytica 100, Netherlands.

Carpita, N.C., 1987. The biochemistry of the Growing Plant Cell Wall. In Physiology of Cell Expansion During Plant Growth, Ed. DJ Cosgrove, DP Knievel, pp. 28-45, Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure with the Physical Porperties of the Walls During Growth. Plant J. 3: 1-30.

Cartwright, B., Zarcinas, B.A., Mayfield, A.H., 1984. Toxic Concentrations of B in a Red-Brown Earth at Gladstone. South Australia, Aust. J. Soil Res. 22: 261-272.

Cartwright, B., Zarcinas, B.A., Spouncer, L.A., 1986. Boron Toxicity in South Australian Barley Crops. Aust. J. Agric Res. 37: 351-359.

Cartwright, B., Rathjen, A.J., Sparrow, D.H.B., Paull, J.G., and Zarcinas, B.A., 1987. Boron tolerance in Australian varieties of Wheat and Barley. In Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. Eds. H.W. Gabelman and B.C. Loughman. pp 139-151. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Çakmak, İ., Kurz, H., Marshner, H., 1995. Short-Term Effect of Boron. Germanium and High Light Intensty on Membrane Permeability in Boron Deficient Leaves of Sunflower. Physiol. Plant. 95: 11-18.

Çakmak, İ., 2002. Plant Nutrition Research: Priorities to Meet Human Needs for Food in Sustainable Ways. Plant and Soil, (247). 3–24.

Dudal, R., 1976. Inventory of major soils of the world with special reference to mineral stress. Plant Adaption to Mineral Stress in Problem Soils, Ed. M. J Wright, Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Ithaca. N.Y., p. 3–23.

Fleischer, A., O'Neill, M.A., Ehwald, R., 1999. The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. Plant Physiol 121:829–838.

Frommer, W.B., von Wiren, N., 2002. Ping-Pong with Boron. Nature 410: 282–283.

Gamborg, OL., Wetter, LR., 1975. Plant Tissue Culture Methods. Saskatoon: Natl. Res. Council of Canada.

Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N., Yorgancılar, M., Ceyhan, E., Çiftçi, N., Acar, B., Gültekin, İ., Işık, Y., Şeker, C., Babaoğlu, M., 2002. Determination of B Contents of Soils in Central Anatolian Cultivated Lands and its Relations between Soil and Water Characteristics. Boron in Plant and Animal Nutrition, Edited by Goldbach et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Gezgin, S., Gökmen, F., Dursun, N., 2005. Tarımda Borun Önemi. I. Ulusal Bor Çalıştayı Bildiriler Kitabı, Ankara.

Gezgin, S., Hamurcu, M., Gökmen, F., Harmankaya, M., Babaoğlu, M., 2006. Orta Güney Anadolu Bölgesi Tarim Topraklarinin Besin Elementi İçeriği. Uluslararası Toprak Bilimi Derneği Kongresi, Urfa.

Glushka, J.N., Terrell, M., York, W.S., O'Neill, M.A., Gucwa, A., Darvill, A.G., Albersheim, P., Prestegard, J.H., 2003. Primary Structure of the 2-*O*-Methyl-a-Fucose-Containing Side-Chain of the Pectic Polysaccharide. Rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res*., 338, 341-352.

Goldbach, H., 1985. Influence of Boron Nutrition on Net Uptake and Efflux of ^{32}P and ^{14}C Glucose in *Heliannuus annus* and Cell Cultures of *Daucus corata*. J. Plant Physiol, 118: 431-438.

Goldberg, S., 1997. Reactions of Boron with Soils. Plant Soil, 193: 35–48.

Gomez, M.D.M., Brandt, R., Jakubowski, N., Andersson, J.T., 2004. Changes of the Metal Composition in German White Wines Through the Winemaking Process. A Study of 63 Elements by Inductively Coupled Plasma-Mass

Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (10): 2953-2961.

Gu, Z.M., Zhang, H.S., Huang, J., 2003. Molecular cloning of boron transporter gene OsBOR3 from *Oryza sativa*. ACCESSION AY339063. National Center for Biotechnology Information.

Gupta, U.C., 1978. Boron Nutrition of Crops. Adv. Argon, 31: 273 – 307.

Gupta, U.C., Jame, Y.W., Campbell, C.A., Leyshon, A.J., Micholaichuk, W., 1985. Boron Toxicity and Deficiency. A Review. Can. J. of Soil Sci. 65, 381-408.

Güneş, A., Alpaslan, M., Özcan, H., Çıkılı, Y., 2000b. Türkiye'de Yaygın Olarak Yetiştirilen Mısır (*Zea mays L.*) Çeşitlerinin Bor Toksitesine Duyarlılıkları. Turkish Agricultural and Foresty. 24: 277-282. TÜBİTAK. Ankara.

Hakkı, E. E., Babaoğlu, M., Soylu, S., 2005a. Bitkilerde Bor Alımı: Moleküler, Tarımsal ve Çevresel Değerlendirmeler. I. Ulusal Bor Çalıştayı Bildiriler Kitabı, Ankara.

Hakki, E.E., Ulku, Z., Hamurcu, M., Tamkoc, A., Babaoglu, M., Gezgin, S., 2005b. Genotypical Differences Affecting the Response of *Pisum sativum* to Differing Boron/Iron Applications. 12. European Congress on Biotechnology, Copenhagen, Denmark.

Hamurcu, M., Harmankaya, M., Soylu, S., Gökmen, F., Gezgin, S., 2006. Makarnalık Buğdayın (*Triticum durum* L.) Bazı Besin Elementleri Kapsamına Farklı Dozlarda Bor ve Demir Uygulamalarının Etkisi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 20 (38), 1 -8.

Hu, H., Brown, P.H., 1994. Localisation of Boron in Cell Wals of Squash and Tobacco and its Assocation with Pectin. Plant Physiol, 105: 681 – 689.

Hu, H., Brown, PH., Labavitch, JM., 1996. Species Variability in Boron Requirement is Correlated with Cell Wall Pectin. Journal of Experimenatl Botany, 47 (295), 227-232.

Hu, H., Brown, P.H., 1997. Absorbtion of Boron by Plant Roots. Boron in Soils and Plants: Reviews. Kluwer Academic Publishers, Plant and Soil, 193: 49–58.

Huang, C.Y., Graham, R.D., 1990. Resistance of Wheat Genotypes to Boron Toxicity is Expressed at Cellular Level. Plant and Soil, 126:2, 295-300.

Jamjod, S., Mann, C.E., Rerkasem, B., 1993. Combining ability of response to boron deficiency in wheat. Developments in Plant and Soil Science, 50, 359-361, 8 ref. Kluwer Academic Publishers.

Jefferies, S.P., Barr, A.R., Karakuosis, A., Kretschmer, J.M., Manning, S., Chalmers, K.J., Nelson, J.C., Islam, A.K.M.R., Langridge, P., 1999. Mapping of Chromosome Regions Conferring Boron Toxicity Tolerance in Barley(*Hordeum vulgareL.*). Theoretical and Applied Genetics, 98:8, 1293-1303.

Kaçar, B., 1984. Bitki Besleme ve Toprak Verimliliği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 899, Ders Kitabı: 250, Ankara.

Kaçar, B., Katkat, V., 1999. Bitki Besleme. Vipaş Yayınları, Yayın No: 3, 417 – 441, Bursa.

Kızılgöz, İ., Özberk, İ., 2005. Sulanan Koşullarda Makarnalık ve Ekmeklik Buğdayın Borla Beslenme Durumunun Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9-3, Isparta.

Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J., 1996. Two Chains of Rhamnogalacturonan II are Cross-linked by Borate-diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Wall. Plant Physiol, 110: 1017–1020.

Kün, E., 1996. Tahıllar –I. Ankara Ünivertesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1451, Ders Kitabı: 431, Ankara.

Loomis, W.D., Durst, R.W., 1992. Chemistry and Biology of Boron. BioFactors 3: 229 – 239.

Mahboobi, H., Yücel, M., Öktem, H.A., 2000. Changes in Total Protein Profiles of Barley Cultivars in Response to Toxic Boron Concentration. Journal of Biological Sciences, 23:3, 391-399.

Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. p 889 Academic Pres, New York.

Matoh, T., Ishigaki, K., Mizutani, M., Matsunaga, W., Takabe, K., 1992. Boron Nutrition of Cultured Tobacco BY-2 Cells. I. Requirement for and Intracellular Localization of Boron and Selection of Cells that Tolerate Low Levels of Boron, Plant Cell Physiol 33: 1135–1141.

Miwa, K., Takano, J., Fujiwara, T., 2006. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions trough overexpression of *BOR1*, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 46, 1084-1091.

MSTAT-C., 1980. MStat User's Quides Statistics (Version 5 ed.) Michigan State Universty. Michigan, USA.

Nable, R.O., 1988. Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars. A Preliminary Examination of the Resistance Mecanism. Plant and Soil, 112, 45-52.

Nable, O.R., Lance, R.C.H., Cartwright, B., 1990a. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. Annals of Botany. 66:1, 83-90; 15 ref.

Nable, R.O., Cartwright, B., Lance, R.C.M., 1990b. Genotypic differences in boron accumulation in barley: Relative susceptibilities to boron deficiency and toxicity. Genetic aspects of plant mineral nutrition. 243-251.

Nable, R.O., 1991. Distribution of Boron Within Barley Genotypes with Differing Susceptibilities to Boron Toxicity. Journal of Plant Nutrition, 14:5, 453-461.

Nable, R.O., Banuelos, G.S., Paull, J.G., 1997. Boron Toxicity. Boron in Soils and Plants: Reviews, Kluwer Academic Publishers, Plant and Soi1, l98: 181-198.

Noguchi, K., Yasumori, M., Imai, T., Naito, S., Matsunaga, T., Oda, H., Hayashi, H., Chino, M., Fujiwara, T., 1997. *bor1*-1. *Arabidopsis thaliana* Mutant that Requires a High Level of Boron. Plant Physiol, 115, 901–906.

O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., Darvill, A.G., 2001. Requirement of Borate Cross-Linking of Cell Wall Rhamnogalacturonan-II for *Arabidopsis* Growth, Science 294: 846–849.

Parr, A.J., Loughman, B.C., 1983. Boron and Membrane Function in Plants, in Metal and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants. Robb. D.A. and Pierpoint. W.S., Ed., Academic Pres. Toronto, 87.

Paull, J.G., Cartwright, B., Rathjen, A.J., 1988. Responses of Wheat and Barley Genotypes to Toxic Concentrations of Soil Boron. Euphytica, 39, 137-144.

Paull, J.G., Nable, R.O., Rathjen, A.J., 1992. Physiological and genetic control of the tolerance of wheat to high concentrations of boron and implications for plant breeding. Plant and Soil 146: 251-260.

Pollard, A.S., Parr, A.J., Loughman, B.C., 1977. Boron in Relation to Membrane Function in Higher Plants. J. Exp. Bot. 28: 831-841.

Rerkasem, B., Jamjod, S., 1997. Genotypic Variation in Plant Response to Low Boron and Implications for Plant Breeding. Plant and Soil, 193, 169-180.

Rerkasem, B., Jamjod, S., 2004. Boron deficiency in wheat: a review. Field crops research, Elsevier.

Scaife, A., Turner, M., 1983. Diagnosis of Mineral Disorders of Plants. Vegetables, vol.2, s.96, London.

Shelp, B.J., 1993. Physiology and Biochemistry of Boron in Plants. In Boron and its Role in Crop Production, Ed. U.C. Gupta. Pp 53 – 85, CRC Pres. Boca Raton. FL. USA.

Shelp, B.J., Marentes, E., Kitheka, A.M., Vivekanandan, P., 1995. Boron Mobility in Plants. Plant Physiol, 94: 356-361.

Soylu, S., Topal, A., Sade, B., Akgün, N., Gezgin, S., Babaoğlu, M., 2004. Yield and Yield Attributes of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Genotypes as Affected by Boron Application in Boron-DeficientCalcareous Soils: An Evaluation of Major Turkish Genotypes for B Efficiency. Journal of Plant Nutrition, (27) 6, 1077-1106.

Soylu, S., Sade, B., Topal, A., Akgün, N., Gezgin, S., Hakkı, E.E., Babaoğlu, M., 2005. Responses of Irrigated Durum and Bread Wheat Cultivars to Boron Application in a Low Boron Calcareous Soil. Turk Journal of Agricultural Foresty, 29, 275-286.

Subedi, KD., Gregory, P.J., Summerfield, R.J., Gooding, M.J., 1999. Boron accumulation and partitioning in wheat cultivars with contrasting tolerance to boron defiency. Plant and Soil, 214:1/2, 141-152.

Taban, S., Erdal, İ., 2000. Bor Uygulamasının Değişik Buğday Çeşitlerinde Gelişme ve Toprak Üstü Aksamda Bor Dağılımı Üzerine Etkisi. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24: 255 – 262.

Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. Nature, 420, 337–340.

Takano, J., Miwa, K., Yuang, L., von Wiren, N., Fujiwara, T., 2005. Endocytosis and Degradation of BOR1, a Boron Transporter of *Arabidopsis thaliana*, Regulated by Boron Availability. PNAS, Plant Biology, vol. 102, no. 34, 12276-12281.

Thellier, M., Duval, Y., Demarty, M., 1979. Borate Exchanhes of *Lemna minor* L. as Studied with the Help of the Enriched Stable Isotope and of a (n. α) Nuclear Reaction. Plant Physiol, 63: 283 – 288.

Topal, A., Gezgin, S., Akgün, N., Dursun, N., Babaoğlu, M., 2002. Yield and Yield Attribute of durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) as effected by Boron Application. Boron in Plant and Animal Nutrition, Edited by Goldbach et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.

Torun, A., Yılmaz, A., Kalaycı, M., Gültekin, İ., Torun, B., Eker, S., Çakmak, İ., 1999. Konya koşullarında yetiştirilen farklı buğday çeşitlerinin bor toksitesine duyarlılığının sera ve tarla koşullarında araştırılması. Hububat Sempozyumu, Altıncı oturum: Hububat Yetiştirme, 317-327 8-11 Haziran, Konya.

Torun, A.A., Yazıcı, A., Erdem, H., Çakmak, İ., 2006. Genotypic Variation in Tolerance to Boron Toxicity in 70 Durum Wheat Genotypes. Turk Journal of Agricultural Foresty, 30, 49-58.

Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pelerin, P., York, W.S., O'Neill, M.A., Glushka, J., Darvill, A.G., Albersheim, P., 2000. Structural Characterization of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II: Evidence for the Backbone Location of the Aceric Acid-Containing Oligoglycosyl Side Chain. *Carbohydr. Res*., 326, 277-294.

Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., Pelerin, P., 2003. The Polysaccharides of Red Wine: Total Fractionation and Characterization. Carbohydrate Polymers 54 (4): 439-447.

Yau, S.K., Nahcit, M.M., Ryan, J., Hamblin, J., 1995. Phenotypic variation in boron toxicity tolerance at seedling state in durum wheat (*Triticum durum* L.). Euphytica. 83:3, 185-191; 16 ref.

Yorgancılar, M., Babaoğlu, M., 2005. Buğday Çeşitlerinde Borun Çimlenme Üzerine Etkisinin *In Vitro* ve Saksı Şartlarında Araştırılması. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (35), 109 -114.

Yousif, S.K., Bingham, F.T., Yermanos, D.M., 1972. Soi. Am. Proc. 36: 923 – 926.

EKLER

Ek-1. *bor1* ve *Bor3* genlerinin karşılaştırılması

```
bor1            ATGGAAGAGACTTTTGTGCCGTTTGAAGGAATCAAGAATGATCTTAAAGGAAGATTGATG
bor3            ATGGAGGAGAGCTTCGTGCCCCTCCGTGGCATCAAGAACGACCTCCATGGGAGGCTCCAG
                ***** ****  ** *****  *    ** ******** ** **  * ** **  *   *

bor1            TGCTATAAGCAAGATTGGACTGGTGGATTCAAAGCTGGATTTAGGATTCTGGCTCCCACC
bor3            TGCTACAAGCAGGATTGGACCGGAGGATTCCGCGCCGGTATCAGGATCCTTGCGCCGACC
                ***** ***** ******** ** ******   ** **  * ***** ** ** ** ***

bor1            ACTTACATATTTTTCGCTTCTGCGATTCCTGTCATCTCATTTGGTGAACAACTCGAAAGA
bor3            ACCTACATATTCTTCGCTTCGGCCATACCGGTGATATCGTTCGGAGAGCAATTGGAGAGG
                ** ******** ******** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *** * ** **

bor1            AGCACCGATGGAGTTCTCACGGCTGTTCAAACCTTAGCATCTACAGCCATTTGCGGTATG
bor3            AACACTGATGGTGTTCTGACAGCAGTTCAGACATTGGCATCCACTGCACTTTGTGGCATA
                * *** ***** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** **  **** ** **

bor1            ATACATTCGATTATCGGAGGTCAGCCACTGCTTATTCTCGGTGTTGCAGAGCCTACTGTG
bor3            ATCCACTCCTTTCTTGGAGGGCAGCCTCTGCTGATCCTCGGTGTGGCCGAGCCGACGGTG
                ** ** **  ** * ***** ***** ***** ** ******** ** ***** ** ***

bor1            ATTATGTACACATTCATGTTTAACTTTGCAAAGGCCAGACCTGAATTGGGACGAGACCTG
bor3            CTCATGTACACATTCATGTTCAACTTTGCCAAGGACAGGCCTGATCTTGGAAGGAGGCTG
                 * ***************** ******** **** *** *****  * *** *    ***

bor1            TTCTTGGCGTGGTCTGGATGGGTTTGTGTTTGGACTGCTTTGATGCTGTTTGTGTTGGCA
bor3            TTCCTCGCATGGACCGGTTGGGTTTGTGTCTGGACAGCAATTTTGCTGTTCTTGCTGGCG
                *** * ** *** * ** *********** ***** **  *  *******  ** ****

bor1            ATATGTGGAGCTTGTTCTATCATCAATAGGTTTACTCGAGTAGCTGGAGAATTGTTTGGA
bor3            ATACTAGGCGCGTGCTCGATCATCAACCGGTTCACCCGCATCGCGGGTGAGCTGTTTGGG
                ***   ** ** ** ** ********  **** ** **  * ** ** **  *******

bor1            CTGCTTATTGCTATGCTTTTCATGCAGCAAGCCATCAAAGGGCTAGTTGATGAATTCCGC
bor3            CTCCTGATTGCAATGCTCTTCATGCAGCAGGCTATCAAGGGGCTTGTTGACGAGTTCCGC
                ** ** ***** ***** ********** ** ***** ***** ***** ** ******

bor1            ATTCCTGAACGAGAAAATCAGAAGCTGAAGGAGTTCTTACCTTCCTGGAGGTTTGCTAAT
bor3            ATCCCTGAGAGGGAGAACAGAAAGGCATTAGAGTTTGTTTCATCATGGAGGTTCGCCAAC
                ** *****  * ** **    ***      *****  *  * ** ******** ** **

bor1            GGGATGTTTGCTCTGGTTCTCTCCTTTGGCCTTCTTCTGACTGGACTTAGAAGCAGAAAA
bor3            GGAATGTTTGCTATCGTCTTGTCGTTTGGCCTTTTGCTCACTGCACTGCGGAGCAGGAAG
                ** ********* * **  * ** ********* * ** **** ***  * ***** **

bor1            GCCAGATCATGGCGGTACGGAACTGGCTGGCTCAGAAGCTTAATAGCTGACTATGGTGTA
bor3            GCTCGATCATGGCGCTATGGAACAGGTTGGCTCCGTGGCTTCATCGCCGACTATGGTGTC
                **  ********** ** ***** ** ****** *  **** ** ** ***********

bor1            CCACTCATGGTGCTCGTGTGGACCGGTGTCTCCTACATTCCAGCAGGAGATGTTCCAAAA
bor3            CCACTGATGGTGCTAGTATGGACAGGAGTTTCCTACATTCCATATGGTAGTGTTCCAAAA
                ***** ******** ** ***** ** ** ************   **   **********
bor1            GGAATTCCTCGGCGACTTTTTAGCCCAAATCCTTGGTCTCCTGGTGCTTATGGGAACTGG
```

```
bor3            GGAATTCCACGGCGCCTTTTCAGCCCCAACCCATGGTCCCCTGGTGCATATGATAATTGG
                ******** ***** ***** ***** ** ** ***** ******** ****  ** ***

bor1            ACCGTAGTAAAGGAGATGCTTGATGTTCCAATCGTCTACATAATTGGAGCTTTCATTCCA
bor3            ACAGTCATCAGGGACATGCCAAATGTGCCACTCCTCTACATTATTGGTGCCTTCATACCA
                ** **  * * *** ****   **** *** ** ******* ***** ** ***** ***

bor1            GCATCAATGATTGCTGTGCTTTACTACTTCGACCATAGTGTAGCTTCACAGCTCGCGCAG
bor3            GCAACGATGATAGCCGTCCTGTACTACTTCGATCACAGTGTTGCTTCTCAGCTTGCTCAG
                *** * ***** ** ** ** ********** ** ***** ***** ***** ** ***

bor1            CAGAAAGAATTCAATTTGAGAAAACCGTCTTCTTACCACTATGACTTGCTTCTTCTTGGG
bor3            CAGAAGGAGTTCAATTTGAGGAAGCCCCCATCTTTCCATTATGATTTGCTTCTCCTGGGT
                ***** ** ********** ** **  * **** *** ***** ******** ** **

bor1            TTTCTGACATTAATGTGTGGTCTACTTGGAGTCCCTCCATCAAACGGTGTCATTCCTCAA
bor3            TTCCTGACATTATTGTGTGGCCTTATTGGTATCCCTCCGGCGAATGGTGTCATTCCACAG
                ** ********* ******* **  **** *******  * ** ********** **

bor1            TCTCCAATGCATACCAAGAGCTTAGCAACTCTTAAATACCAGTTGCTTCGTAACAGACTG
bor3            TCTCCAATGCATACGAAGAGTTTGGCTACTCTCAAACATCAACTACTCCGTAACCGACTA
                ************** ***** ** ** ***** *** * **  * ** ****** ****

bor1            GTCGCAACAGCACGAAGAAGTATCAAAACAAATGCGAGTTTGGGTCAACTCTATGACAAT
bor3            GTAGCCACAGCCCGACAAAGCATGAGCCAGAATGCGAGCTTGAGCCAGCTGTATGGCAGC
                ** ** ***** ***  *** ** *     ******** *** * ** ** **** **

bor1            ATGCAAGAAGCTTACCATCACATGCAGACACCATTAGTATACCAGCAACCCCAAGGTCTA
bor3            ATGCAGGAAGCTTACCAGCAGATGCAGACACCACTGATTTACCAGCAACCGTCAGTCAAG
                ***** *********** ** ************ *  * ***********   **

bor1            AAAGAGCTCAAGGAATCGACAATCCAAGCTACTACATTCACCGGAAACCTCAATGCTCCA
bor3            GGATTGAATGAGCTCAAGGACTCAACAGTCCAAATGGCTTCAAGCATGGGCAACATCGAT
                  *  *    **     *         **     *      * * *    ***
                                                          FORWARD PRIMER

bor1            GTTGATGAAACTCTGTTCGACATAGAGAAAGAAATAGATGATTTACTACCAGTTGAAGTC
bor3            GCGCCAGTTGATGAGACAGTCTTTGACATCGAGAAAGAAATCGATGACCTGCTGCCTATC
                *     *    *  *   * * * ** *  ** * ***          *   *     **
                →

bor1            AAAGAACAACGGGTAAGCAACTTGCTTCAGTCTACAATGGTAGGAGGATGCGTTGCAGCT
bor3            GAGGTCAAGGAGCAGAGGTTGAGCAACTTGCTCCAGGCCTCAATGGTTGGGGGTTGTGTT
                 * *   *   *   **            *          *   *   * * *   * *

bor1            ATGCCTATCCTTAAAATGATCCCAACATCAGTCCTTTGGGGCTATTTTGCCTTCATGGCC
bor3            GCTGCTATGCCATTGCTCAAGAAGATCCCGACTTCTGTCCTCTGGGGCTACTTTGCCTTC
                    **** *      * *     *   *      *     **       ***      *

bor1            ATCGAAAGCTTACCCGGAAACCAATTCTGGGAAAGAATCTTACTTCTGTTCACCGCCCCA
bor3            ATGGCCATTGAGAGCTTGCCTGGTAACCAGTTCTGGGAGAGGATCTTGCTGCTCTTCACT
                ** *  *       *          *  *    *       *  ** *   *  * *

bor1            AGTCGCCGCTTCAAGGTTCTTGAAGATTACCACGCGACATTCGTGGAAACCGTTCCATTC
bor3            GCTCCCAGCAGAAGATACAAGGTGTTAGAAGAGTACCACACCACGTTTGTCGAGACCGTG
                  ** * **   *        *      *  *        *  *     **   *  *

bor1            AAGACGATTGCAATGTTTACTCTTTTCCAAACGACTTATCTCTTGATCTGCTTTGGTCTC
bor3            CCATTCAAGACGATAGCCATGTTCACACTCTTCCAGACAATGTATCTACTCGTCTGCTTC
                      *   * **    *   *    *          * *   *   * *  *  **
```

```
bor1            ACATGGATACCAATCGCAGGAGTCATGTTCCCTTTAATGATCATGTTCTTAATCCCCGTA
bor3            GGGATCACATGGATCCCGATTGCTGGGGTTCTTTTCCCCCTCATGATCATGCTGCTGGTT
                      * *   *** *    *    * * * ***     ***** ** *  * *  **

bor1            CGACAATATCTCCTCCCTAGATTCTTCAAAGGAGCTCATCTTCAGGACTTAGATGCAGCA
bor3            CCAGTCAGGCAGTACATCCTCCCAAAGCTCTTCAAAGGTGCACATCTGACTGATCTGGAT
                * *      *    *                  *   **       ***   *
                                  <-------------
                                  REVERSE PRIMER
bor1            GAGTATGAAGAAGCTCCAGCTTTACCCTTCAATCTCGCAGCGGAAACGGAGATTGGATCC
bor3            GCAGCAGAGTATGAGGAGTCACCAGCTATACCGTTCATTGCCGCGCAAGATATTGATGTT
                *     **  * *      *   * *  *     **   ** *     ** ****

bor1            ACAACATCGTATCCGGGAGATTTGGAGATTCTTGATGAGGTTATGACCCGAAGCAGAGGA
bor3            GCATTGGCGCGCACCCAGAGTGCAGAAATCCTTGATGACATTGTCACTAGAAGCCGTGGT
                 **    **    *      *   ** ** ********  ** * **  ***** * **

bor1            GAGTTTAGACACACGAGTAGTCCTAAGGTGACAAGTTCAAGTTCGACTCCAGTCAATAAT
bor3            GAAATCAAGCGCCTGAACAGTCCTAAGATCACCAGCTCCGGTGGCACACCAGTGGCAGAA
                **  * *  * *  **  ********* * ** ** **  **   ** *****     *

bor1            CGGAGTTTGTCACAAGTGTTTAGTCCAAGAGTGAGTGGAATCAGGTTGGGTCAGATGAGT
bor3            CTTAAAGGAATCCGCAGCCCTTGTATCTCTGAGAGGGCATACAGCCCTTGTATCACCGAG
                *  *        *       * **      * *** * *  ***     **   *

bor1            CCTCGAGTCGTCGGGAATAGTCCAAAGCCGGCGAGTTGTGGGAGGAGTCCCTTGAACCAG
bor3            TTGAGGCATGACCGCAGCCCTCTAGGAGGAAGAGGCAGCCCAAGGACCGGTGAGACCCGA
                    *    * * * *    ** *          *  *    ****       ** **

bor1            TCGTCATCGAACTGA--------------------
bor3            TCGTCCAAGTTGGGCGAAGGATCAACACCAAAGTGA
                *****   *    *  **  *  ** *        *
```

Ek-2. Çalışmalar Sırasında Kullanılan Çözelti İçerikleri

Ek-2.1. 2X Rapid ligation Buffer

60 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT, 2 mM ATP, %10 polietilen glikol (MW8000, ACS Grade)

Ek-2.2. LB ortamı

Bir litre için; 10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl, pH 7 olarak ayarlanır. Otoklav edilir.

Ek-2.3. LB agar ortamı

LB ortamı otoklav edilmeden önce 15 g agar eklenir. Çözelti yaklaşık 50 ^oC'ye soğuyunca 30-35 ml olacak şekilde 85 mm petri kaplarına dökülür.

Ek-2.4. LB agar + ampisilin ortamı

50 ^oC'ye soğuyan LB agar ortamı içine son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin ilave edilir.

Ek-2.5. LB ampisilin/IPTG/X-Gal seçici ortamı

Ampisilin eklenmiş LB agar ortamı içeren petri kabına 0.5 mM IPTG ve 80µg/ml X-Gal karışımı öze ile agarlı petri kabına dağıtılır. Bu işlem kullanmadan yarım saat önce yapılır ve oda sıcaklığında bekletilir.

Ek-2.6. SOB çözeltisi

2,5 g Bacto-tryptone, 0,625 g Bacto-yeast extract, 0,0625 g NaCl, 1,25 ml 250 mM KCl , pH 7'ye ayarlandıktan sonra hacim 125 ml'ye tamamlanır.

Ek-2.7. TB çözeltisi

10 mM PİPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, pH 6.7'ye ayarlandıktan sonra 55 mM $MnCl_2$, hacim 50 ml'ye tamamlanır.

Ek-2.8. SOC çözeltisi

2 g Bacto-tryptone, 0,5 g Bacto-yeast extract, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, otoklav edildikten sonra oda sıcaklığına gelince filtre ile steril edilmiş 1 ml 2M Mg^{+2} stok çözeltisi ve 1 ml 2M glıkoz ilave edilir. pH 7'ye ayarlandıktan sonra hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.