

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KANOLA (*Brassica napus ssp. oleifera L.*)' DA SELENYUMUN BOR STRESİNİ
AZALTMADAKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Melahat Özge ÖZEN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KANOLA (*Brassica napus ssp. oleifera L.*)' DA SELENYUMUN BOR STRESİNİ
AZALTMADAKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Melahat Özge ÖZEN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEMMUZ 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANOLA (*Brassica napus ssp. oleifera L.*)' DA SELENYUMUN BOR
STRESİNİ AZALTMADAKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Melahat Özge ÖZEN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından FYL-2018-3029 nolu
proje ile desteklenmiştir.)**

TEMMUZ 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANOLA (*Brassica napus ssp. oleifera L.*)' DA SELENYUMUN BOR STRESİNİ
AZALTMADAKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Melahat Özge ÖZEN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 27/06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET AYDIN AKBUDAK (Danışman)

DR. ÖĞR. ÜYESİ ERSİN AKINCI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ALİ TEVFİK UNCU

The image shows three handwritten signatures in blue ink. The top signature is a simple, stylized line. The middle signature is more complex and cursive. The bottom signature is also cursive and appears to be the name 'Ali Tefik Uncu'.

ÖZET

KANOLA (*Brassica napus ssp. oleifera L.*)' DA SELENYUMUN BOR STRESİNİ AZALTMADAKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Melahat Özge ÖZEN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Aydın AKBUDAK

Temmuz 2019; 39 sayfa

Bu çalışma, bor stresi uygulanmış kanola (*Brassica napus ssp. oleifera L.*) bitkilerinde selenyumun iyileştirici etkisini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Abiyotik stres koşulları altındaki bitkilerde selenyumun koruyucu ve iyileştirici etkide bulunduğu bildirilse de bu kapsamda literatürde pek çok boşluk bulunmaktadır.

Tezimizde kanola (*Brassica napus ssp. oleifera L.*) bitkileri 12 gün boyunca bitki büyütme kabininde büyütüldükten sonra 12 saat boyunca sadece bor ve selenyum dozlarının yanı sıra bunların farklı oranlarda karışımları ile strese maruz bırakılmıştır. Bu uygulamalar sırasıyla 1.5 g B, 3 g B, 3 mg Se ve 6 mg Se'yi içerirken, kombine uygulamalar 1.5 g B + 3 mg Se, 1.5 g B + 6 mg Se, 3g B + 3 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se içermektedir. Kanola bitkilerinin uygulamalar sonucu stres düzeyi morfolojik gözlemlerinin yanı sıra savunma enzimlerinin yapraklardaki gen ekspresyonu, protein miktarları ve hücrel MDA düzeyleri de araştırılmıştır. Bor stresine maruz bırakılmış kanola bitkilerinden alınan yaprak örnekleri incelendiğinde askorbat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz genleri çoğunlukla down-regüle olurken, askorbat peroksidaz (1,5 g B + 6 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se), süperoksit dismutaz (1.5 g B + 3 mg Se), katalaz (3 g B, 3 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se) ve peroksidaz (1.5 g B) gibi bazıları da up-regülasyon göstermektedir. Ayrıca morfolojik gözlemler 3 g/L Bor uygulamasında bariz sonuçlar verse de diğer uygulamalarda da bitkilerin bor stres semptomları gözlemlenmiştir. Stres mekanizmasının hücrel markerı olan lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde MDA içeriği ölçülmüş ve dikkate değer bir artış sadece 1,5g/L B uygulamasında gözlenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında dünyada ve ülkemizde verimi sınırlandıran bor stresi altında uygulanan selenyumun bitki defans mekanizmasında stres etkenlerini azaltabileceğini ortaya koymuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Abiyotik stres, Antioksidan enzim, Faydalı etki, Kanola, Lipid peroksidasyonu, ROS

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Aydın AKBUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Dr. Öğr. Üyesi ALİ TEVFIK UNCU

ABSTRACT

Expression patterns of ROS responsive genes on boron-stressed canola (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) following selenium treatment

Melahat Özge ÖZEN

MSc Thesis in Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Asit. Dr. Mehmet Aydın AKBUDAK

June 2019; 39 pages

This study was carried out to reveal the healing effect of selenium in boron stressed canola (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.). Although there is a protective and curative effect of selenium in plants under abiotic stress conditions, there are many gaps in the literature.

In our study, the plants of canola (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) were grown in the plant growth cabinet for 12 days and were subjected to stress for 12 hours with only boron and selenium doses as well as their mixtures in different ratios. These applications included 1.5 g B, 3 g B, 3 mg Se and 6 mg Se respectively, combined applications 1.5 g B + 3 mg Se, 1.5 g B + 6 mg Se, 3g B + 3 mg Se and 3 g B + 6 mg Se contains. In addition to the morphological observations of stress level morphological observations of canola plants, gene expression, protein content and cellular MDA levels of defence enzymes were also investigated. Ascorbate peroxidase, catalase, superoxide dismutase, peroxidase, and glutathione reductase genes are mostly down-regulated while ascorbic leaf samples taken from boron stressed canola plants, ascorbate peroxidase (1.5 g B + 6 mg Se and 3 g B + 6 mg Se) Some of them show up-regulation, such as superoxide dismutase (1.5 g B + 3 mg Se), catalase (3 g B, 3 mg Se and 3 g B + 6 mg Se) and peroxidase (1.5 g B). In addition, morphological observations showed obvious results in 3 g / L boron application, but boron stress symptoms of plants were observed in other applications. In the evaluation of lipid peroxidation, which is the cellular marker of the stress mechanism, the MDA content was measured, and a notable increase was observed only in 1.5g / L B administration.

In the light of the data obtained, selenium applied under boron stress, which limits yield in the world and in our country, has shown that it can reduce stress factors in plant defence mechanism.

KEYWORDS: Abiotic stress, Boron, Selenium, Canola, ROS, Expression profile

COMMITTEE: Asit. Prof. Dr. Mehmet Aydın AKBUDAK

Asit. Prof. Dr. Ersin AKINCI

Asit. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan ve beni hep destekleyen danışmanım, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Aydın AKBUDAK 'a her türlü destek ve yardımından dolayı şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca sabrını, zamanını esirgemediğim yanımda yer alarak beni destekleyen bilgi, deneyim ve önerileri ile yanımda olan sevgili dostlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tezimin her aşamasında laboratuvar çalışmalarımda benden desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma, desteğini her zaman hissettiğim anneme teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmanın gerçekleşmesine maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	2
3. MATERYAL VE METOT	3
3.1. Deneme Düzeni	8
3.2. RNA İzolasyonu	9
3.3. RT-qPCR.....	10
3.4. Enzim ekstraktlarının hazırlanması	11
3.4.1. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	12
3.4.2. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	12
3.4.3. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	12
3.4.4. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	12
3.4.5. Glutasyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	14
5. SONUÇLAR	19
6. KAYNAKLAR	20
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kanola (*Brassica Napus Ssp. Oleifera L.*)’ da Selenyumun Bor Stresini Azaltmadaki Etkisinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

27/06/2019

Melahat Özge ÖZEN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

dH ₂ O	: Distile su
EtOH	: Etil Alkol
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
L	: Litre
mM	: Milimolar
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
O ₂	: Oksijen
OH	: Hidroksil
OH [·]	: Hidroksil radikali
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
POD	: Peroksidaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
µl	: Mikrolitre
UV	: Ultra Viyole

Kısaltmalar

AA	: Askorbik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
BSA	: Bovin serum albümin
CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
MDA	: Malondialdehit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitro blue tetrazolium
mRNA	: Haberci RNA
qPCR	: Kantitatif PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
POD	: Peroksidaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
Y.A.	: Yaş ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye kanola ekiminin yıllara göre dağılımı	2
Şekil 2.1. Türkiye’de kanola üretim miktarı.....	2
Şekil 3.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	5
Şekil 4.1. Reaktif oksijen türlerini uzaklaştırma yolları	6
Şekil 5.1. Ortamlara ait bitkilerin yaprak ve kök örnekleri	9
Şekil 6.1. RNA örneklerinin agaroz jel görünütüsü.....	10
Şekil 7.1. RT- qPCR amplifikasyon koşulları	11
Şekil 8.1. <i>B. napus</i> bitkilerinde 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamalarının etkileri.	15
Şekil 9.1. <i>B. napus</i> bitkilerinde APX, CAT, SOD, POD ve GR genlerinin 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamalarında ekspresyon seviyeleri.	16
Şekil 10.1. <i>B. napus</i> bitkilerinde 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamaları sonrası APX (A), SOD (B), POD (C) ve MDA (D) yapraktaki konsantrasyonları	18

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Borun bitkiler üzerindeki etkileri	3
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan ortamlar	8
Çizelge 3.1. RT-qPCR için kullanılan primerler	11

1. GİRİŞ

Ülkemizde kolza, rapiska adıyla bilinen kanola *Brassica napus ssp. oleifera L.*, bitkisel yağ, taze tüketimde besin değeri ve muhteviyatı bakımından zengindir. Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliği için devlet destekleri ile önemi gittikçe artan kanola bitkisi sadece yağ üretimi için değil biyoyakıt, hayvan yemi, arıcılık vb. alanlarda da kullanılmaktadır.

Dünya genelinde kıtlığı bulunan bor elementi ülkemiz topraklarınca zengin bir şekilde bulunmakta hatta topraktaki fazlalığı nedeniyle yetişen bitkilerde önemli yetiştiricilik sorunları görülmektedir.

Bor minerali açısından dünyanın en zengini olan ülkemiz topraklarının %75' inde bor fazlalığı söz konusudur. Bor, bitkiler için gerekli bir mikronutrient olmakla beraber fazlalığı tarım alanlarında bitki gelişimini sınırlayan önemli sorunlara yol açmaktadır. Selenyumun ağır metal toksitesine karşı koruyucu etkileri bilinmekle beraber bu etkinin bor toksitesi ve kanola bitkisi üzerindeki moleküler etkileri araştırılmamıştır.

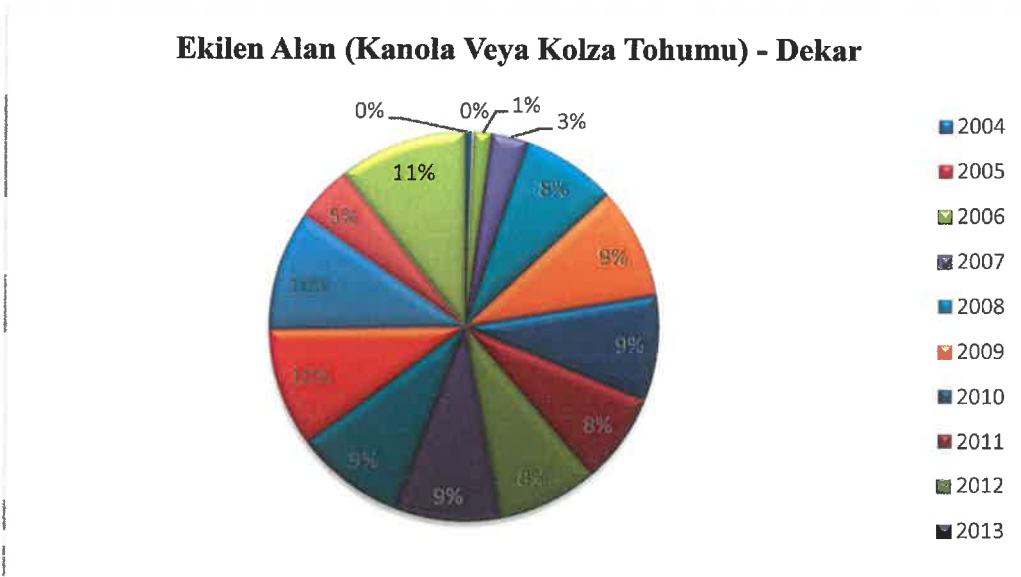
Selenyum bitkiye düşük konsantrasyonlarda uygulandığında bitkiye zarar vermeden birçok ağır metal stresine, kuraklık stresine karşı bitkide koruyucu etki (antioksidan görevi) gösterdiği çalışmalarla ortaya konulsa da bu etkinin moleküler mekanizması ise henüz yeterince anlaşılamamıştır (Xue ve Hartikainen 2000; Seppanen vd. 2003). Selenyumun bir antioksidan olarak bitkideki rolü araştırılmış olmasına rağmen bu gözlemlerin altında yer alan mekanizmanın açıklanması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma kapsamında yetiştiriciliği artan ve kullanım alanı oldukça fazla olan kanola bitkisinde B uygulamalarıyla stres oluşturularak selenyumun bu stres azaltması beklendi. Ancak bu etki, stres genlerinin ifade edilme seviyelerinin yanı sıra bitkilerdeki fenotipik gözlemlerle de ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

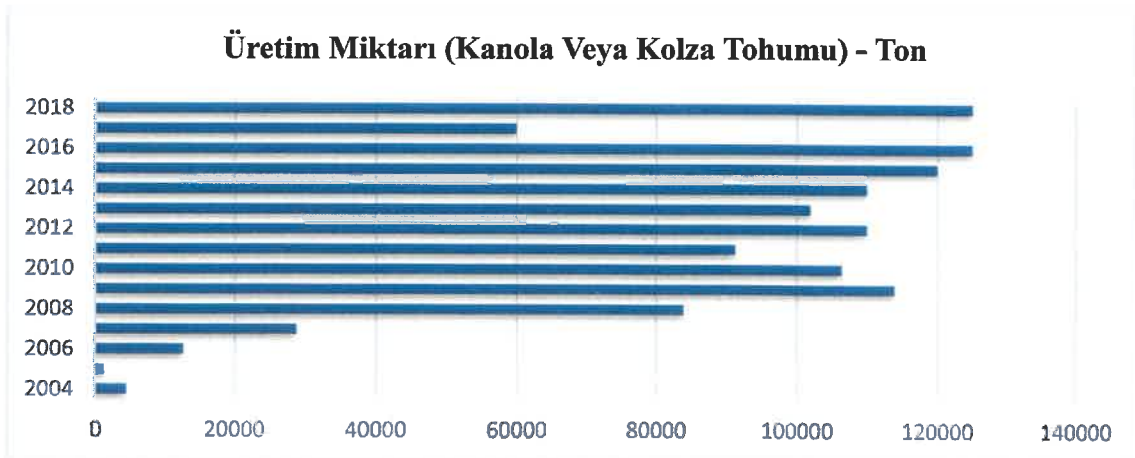
Ülkemizde kolza, rapiska adıyla bilinen kanola Rhoedales takımından Crucifera familyası Brassica cinsinden *Brassica napus ssp. oleifera L.*, türler arası melezlemeler (yağ şalgamı x lahanası) ve kromozom sayılarının katlanmasıyla doğada kendiliğinden ortaya çıkmıştır. Elde edilen kanola yağının besin muhtevası ve değeri zeytinyağının kalitesine çok yakın olmakla beraber çoğu yağlık bitkinin üretiminde yeterli ihtiyaç karşılanmadığında alternatif olarak kullanılan tek yıllık otsu bir bitkidir (Stevenson 1994). Son zamanlarda önemi gittikçe artan kolza yetiştiriciliğinde, yağı çıkarıldıktan sonra hayvan yemi olarak ve yağının akaryakıt olarak kullanılabilmesiyle de avantaj sağlamaktadır.

Şekil 1.1. Türkiye kanola ekiminin yıllara göre dağılımı



Ülkemizde 2002 yılından itibaren kanola yetiştiriciliğine destekler sağlanması ile yıllar içinde ekilen alan (Şekil 1.1) ve üretim miktarları (Şekil 2.1) artış göstermiştir (TÜİK).

Şekil 2.1. Türkiye' de kanola üretim miktarı



Kanola yazlık ve kışlık sezonda üretilebilen tek yıllık yağ bitkisidir. Bu bitkinin gen anavatanı Kuzey Avrupa olmakla beraber yağ içeriğinin insan sağlığı açısından zararlı etkilerinin Kanadalı ıslahçılar tarafından bu zararlı etkilerin azaltıldığı düşünülmektedir (Anonim).

Kanola, Dünya üzerinde yağ içeriği kıymetli olan soya bitkisinden sonra en fazla üretilerek Dünya bitkisel yağ içeriğinin büyük bir kısmını karşılamaktadır. Kullanım alanı sadece yağ ihtiyacını karşılamak olmayan bu bitkinin pazarlanmasının kolay olması ve yüksek verim sağlaması bunlara ek olarak da yetiştirilen alanlarda yabancı ot gelişimine izin vermediği için kimyasal ilaç kullanımını azaltıcı etkisi ile ürün münavebesinde kullanılmaktadır (Tıraş 2009). Kâğıt, boya, balmumu, deterjanlarda vb. sanayi alanında geniş kullanım alanına sahiptir (Çubukel vd. 2009).

Bor, canlıların büyümesi ve gelişmesi için gerekli bir mikro element olmasının yanı sıra noksanlık ve toksite aralığı sınırlı olan bu elemente tarımsal yetiştiricilikte dikkat edilmesi gerekmektedir. Dünya üzerinde ılıman ve kurak bölgelerinde genellikle kıtlığı gözlenen bor elementinin, Türkiye tarım arazilerinde ise bolluğu gözlenmektedir (Atalay vd. 2003). Ancak, topraklarda istenilen miktardan fazla bulunan borun, toksik etki göstermesi nedeni ile bitkisel yetiştiricilikte olumsuz etki gösterdiği bilinmektedir (Nable vd. 1997).

Çizelge 1.1. Borun bitkiler üzerindeki etkileri (Lukaszewski ve Blevins 1996)

METABOLİK	ENZİMATİK	HÜCRE MEMBRAN
<input type="checkbox"/> Lignifikasyon olgusunda	<input type="checkbox"/> RNA metabolizmasında	<input type="checkbox"/> Şekerlerin taşınmasında
<input type="checkbox"/> Indol asetik asit (IAA) metabolizmasında	<input type="checkbox"/> Protein sentezinde	<input type="checkbox"/> Hücre duvarı sentezinde
<input type="checkbox"/> Tüm hücre düzeyinde veya hüresel boyutta iyonların dağılımı	<input type="checkbox"/> Glukan sentezinde	<input type="checkbox"/> Biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel özellikleri
<input type="checkbox"/> Fenol metabolizmasında		<input type="checkbox"/> Fotosentetik yolunun değişmesi
		<input type="checkbox"/> Fosfat metabolizmasında
		<input type="checkbox"/> Solunumda
		<input type="checkbox"/> Hücre duvarı strüktürünün oluşumunda

Borun bitkide büyüme ve gelişmeyi düzenleyen, özellikle karbonhidrat ve protein metabolizmasına katılan, hücre duvarının sentezi ve hücre zar geçirgenliğinde rol oynayan, polen çimlenmesinde etkileri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Marschner vd. 1995). Özellikle bitki metabolizmasında verim ve kaliteyi ilgilendiren çok önemli noktalarda görev alan bor elementinin etkileri Çizelge 1.1'deki gibidir.

Bitkilerin ihtiyaç duydukları bor miktarı oldukça az olmakla beraber, gerek duyulan bu miktarın çok az da olsa altı ya da üstü bitkinin gelişimi üzerine olumsuz etki

yapmakta ve gelişim çoğu zaman durmaktadır (Keren ve Bingham 1985; Vitosh ve ark., 1994; Marschner 1995; Goldberg 1997; Chapman vd. 1997).

Bitkilerin bu elementin oluşturduğu stres sonucunda kök ve yeşil aksam büyümesini engelleyerek verimi ciddi bir şekilde sınırlamakta, meyvelerde şekil bozuklukları ile çatlama, patates, pancar ve kerevizde yumruların içinde kahverengileşme raf ömrünün kısaltıcı etkiler görülmektedir. (Gupta vd. 1985; Yau ve Erskine 2000; Furlani vd. 2003; Hobson vd. 2006; Kaçar vd. 2009).

Bitkilerde ise bor toksitesi altında yaprak uçlarında yanıklık ve/veya kuruma, yaprakta sararma ile başlayıp şiddetine göre yanma, yaprak ayasında bulunan damarlarda nekrozis fizyolojik etkiler gözlemlenir (Kaur vd. 2006; Schnurbusch vd.2008; Ochiai vd. 2011).

Bor bitkide mobil olarak taşınmakla beraber özellikle (*Gramineae*) buğdaygillerde ihtiyaç diğer türlere göre daha fazla olmaktadır (Jefferies vd. 2000; Yau 2002; Wimmer vd. 2005). Bor bitkilerde hücre duvarının sentezinde önemli bir rol oynadığı için bor toksitesi altında bitkilerde, gövdenin kolay kırılabilen bir hal almasına neden olabilmektedir (Dobermann ve Fairhurst 2000).

Bunun yanı sıra bor toksitesine toleransta genetiğin etkisi *Medicago sp.* (Howie 2012), *Pisum sativum* (Bagheri vd.1994), *Hordeum vulgare* (Emebiri vd. 2009), *Triticum aestivum*' da (Chantachume vd.1995; Yau ve Ryan 2008) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Mahboobi vd. 2002 buğday ve arpa bitkilerinde bor toksitesi altında bitkilerin yeni proteinler sentezlediğini bildirmişlerdir. Hassas domates bitkilerinde ise bor toksitesinin nitrat alınımını azalttığı belirlenmiştir (Cervilla vd. 2012; Princi vd. 2013).

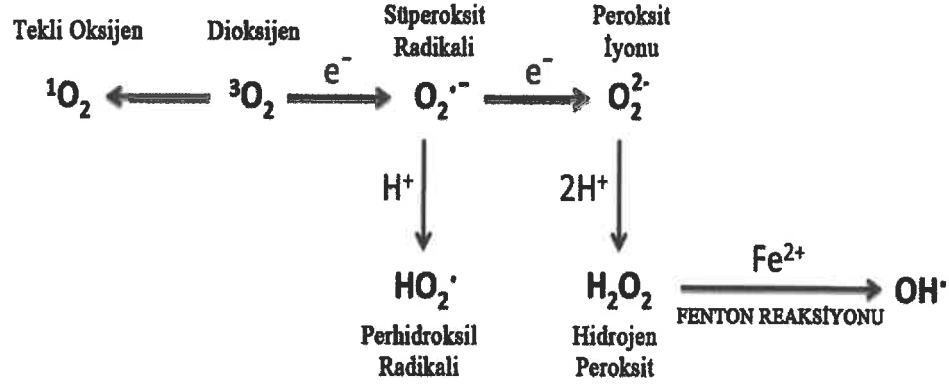
Bitkilerde stres pek araştırmada farklı şekillerde yorumlansa da bitkinin tüm gücünü gösterememesidir. Tüm gücünü kalite, verim, gelişim açısından gösteremediği gibi sonu bitkilerin ölümüne kadar gidebilmektedir. Bitkilerin abiyotik stres koşullarına (kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, virüs, bakteri, zararlı vb.) uygulanan stres faktörüne karşı savunması bitki türüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organının yapısına bağlı olarak değişmektedir (Gür ve ark. 2004). Bu nedenle bitkilerin bu stres koşullarına karşı savaşımını ve/veya uyum mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir (Paschke ve ark. 2005).

Stres koşulları altında bitkiler bu antioksidan savunma sistemlerinin bazılarının ya da tamamının devreye girmesi ile oksidatif stresin yıkıcı etkisinin üstesinden gelebilecekleri bildirilmiştir (Sherwin ve Farrant 1998, Srivalli ve ark. 2003, Jung 2004, Pinheiro ve ark. 2004, Türkan ve ark. 2005).

ROS detoksifikasyon mekanizmaları, enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz ve monodehidroaskorbat redüktaz) ve enzimatik olmayan (flavanoidler, antosiyaninler, karotenoidler, α -tokoferol ve askorbat) savunma mekanizmalar şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat

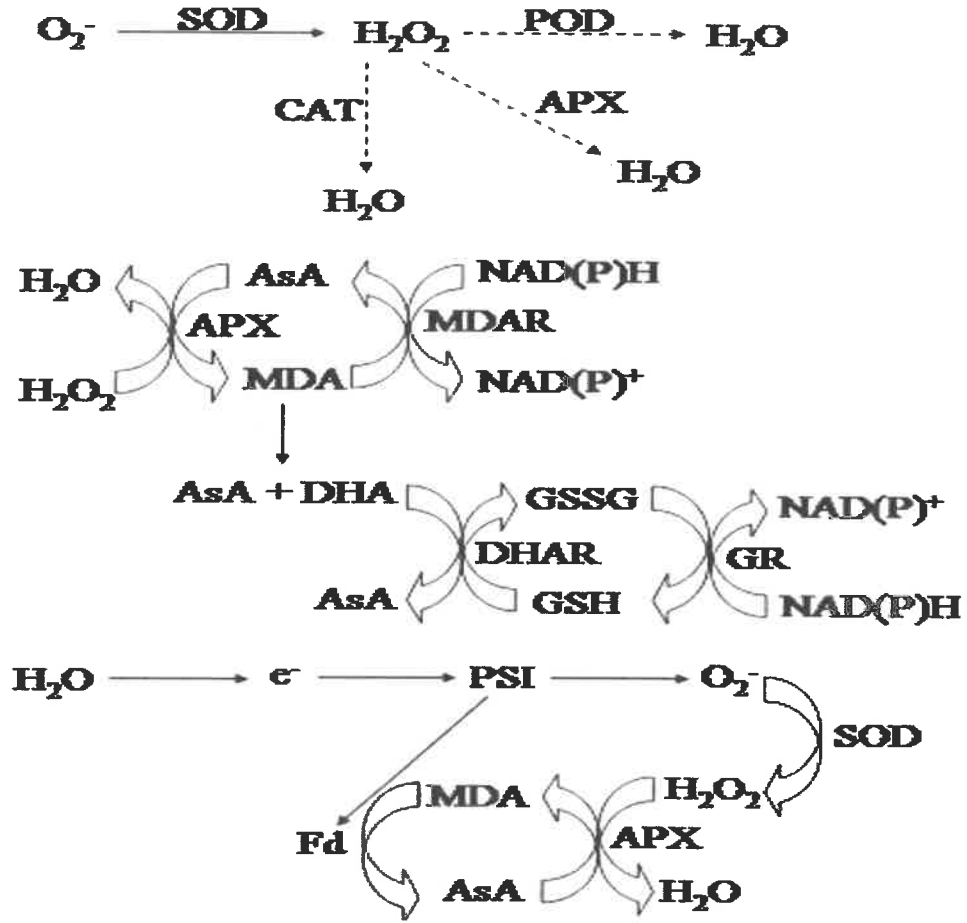
peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR) ve diğer askorbat-glutasyon döngüsü enzimleri (monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)'i içeren antioksidatif enzimler; antioksidant moleküllerin çevrimini, sentezini ya da serbest radikallerin hücreden doğrudan atılmasını sağlamaktadırlar (Raychaudhuri 2000; Molassiotis vd. 2006).



Şekil 3.1. Reaktif oksijen türleri oluşumu (Gill ve Tuteja 2010)

Bitkilerin gelişimini engelleyen her türlü çevresel faktör sonucunda singlet oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinde artış meydana gelmektedir (Şekil 3.1). Bu radikallerin etkisini kırmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar görev almaktadır. Antioksidanlar içerisinde ilk basamak metallo protein olan SOD süperoksit dismutazdır. Bu enzim iki süper oksit radikalının, H₂O₂ ve O₂ sentezlenmesinde görev almaktadır. Süper oksitin sentezlediği hidrojen peroksiti peroksidazlarda katalaz O₂ ve H₂O ya dönüştürmektedir. Bu enzimin bulunmadığı kloroplastlarda POD enzimi H₂O₂' i katalizlemektedir. Süperoksitin sentezlediği hidrojen peroksit eğer kloroplastlarda oluştuysa askorbatı (AsA) elektron paylaşımında kullanarak ROS'un en yüksek yıkım gücüne sahip APX enzimi ile detoksifiye etmektedir (Shigeoka vd. 2002). Bunların dışında oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında GR, prokaryotik ve ökaryotik canlılarda kloroplast, mitokondri, sitoplazma ve peroksidazlarında glutasyon döngüsünde rol almaktadır (Edwards vd. 1983). Hidrojen peroksitin ortadan kaldırılmasında askorbat-glutasyon döngüsünün yenilenmesinde GR önemli bir rolü bulunmaktadır.

Şekil 4.1. Reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırma yolları (Mittler 2002)



Oksidatif strese karşı savunmanın moleküler mekanizması ise genlerin stres koşullarındaki artış ya da azalışıyla ilgilidir. Bu genlerin görev dağılımlarına göre sinyal düzenleyici, stresi baskılayan proteinleri kodlayan ve metabolitlerin sentezinde rol oynadıkları bildirilmiştir (Wang vd. 2003). Savunma mekanizmasında genlerin ilk olarak stresin ortadan kaldırılmasında etkili proteinlerin (LEA proteinleri, Hsps şaperonları, proteazlar), ikinci olarak sinyal mekanizması ve transkripsiyon faktörlerinin (MYC/MYB, WRKY, ABF) son olarak metabolitlerin sentezinde rol aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Vinocur vd. 2005).

Karabal vd. (2003) antioksidan enzimler ile B toksisitesinin hassas Hamidiye arpa çeşidi ve dayanıklı arpa Anadolu üzerindeki etkileri ile ilgili yaptıkları çalışmada, dayanıklı arpa çeşidi Anadolu'nun köklerinde; katalaz seviyesi artmış, askorbat peroksidaz enzim seviyesi azalmış, süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz enzim seviyelerinde değişim olmadığını bildirmektedirler.

Asma bitkisinde yapılan bir çalışmada da benzer şekilde Kontrolle karşılaştırıldığında SOD ve CAT seviyelerinde artış gözlenirken APX seviyesi azalmıştır (Gunes vd. 2006).

Nohut bitkisine ait iki çeşide 3 farklı bor konsantrasyonlarının antioksidant enzim içeriklerine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada SOD ve POX seviyelerinde artış gözlemlenirken CAT aktivitesinin de çeşitlere bağlı olarak değiştiği ortaya konmuştur (Ardıç vd. 2009).

Oluk vd. (2012), iki farklı domates çeşidine toksik bor dozunda uygulama yaparak çimlenmede azalmanın yanı sıra köklerde CAT artarken APX dışında antioksidant enzim aktivitesinin azaldığını belirlemiştir.

Brassica napus cv. Hyola bitkisinde yapılan bir çalışmada kadmiyum ve çinko stresi için belirlenen 8 adet doz uygulanarak, H₂O₂ içeriğini arttırmanın katalaz dahil olmak üzere askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferazları önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, H₂O₂ içeriği malondialdehit içeriği ile olumlu bir ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Sadeghi vd. 2015).

Selenyum elementi insanlar ve hayvanlar için esansiyel bir element olmakla birlikte bitki için normal şartlarda esansiyel bir element değildir ve genelde bitkilerde insan ve hayvanlar için yetecek kadar bulunmaz. Bunun sebebi toprakta da yeterli düzeyde bulunmamasıdır. Yapılan deneyler ağır metal stresi altındaki bitkilere az miktarda selenyum verildiğinde stres etkilerinin büyük ölçüde azaldığını göstermiştir (Şimşek ve ark., 2004). Fakat bitkiye selenyum uygulanmasının etkilerinin uzun vadeli olarak kestirilememesi, yaygın kullanıma geçilmesini önlemektedir. Selenyumun bitkide koruyucu etkisi moleküler düzeyde aydınlatılarak, oluşabilecek bütün sonuçlar kesin şekilde ortaya konulmalıdır. İnsan sağlığı üzerinde önemli bir rolü bulunan selenyumun ülkemiz topraklarındaki seviyesi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Selenyum gübrelemesi altında yetiştirilen çay bitkilerinde yapılan çalışmalarda, çay yapraklarında Se konsantrasyonunun artmasıyla yaprakların antioksidatif kapasitesinin arttığı ve bu etkinin vitamin E'nin sağladığı etkiden bile fazla olduğu bulunmuştur (Xu ve ark., 2003). Çeltik bitkisi ile yapılan benzer bir çalışmada, Se beslenmesindeki artışla birlikte çeltik tanelerinin toksik O₂ radikallerini yok etme ve lipid peroksidasyonunu engellediği saptanmıştır (Xu ve ark., 2004).

Kuraklık stresi altında selenyum uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde TFs, DREB2A, NAC5 gen bölgelerinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu bölgeler bitkinin gelişimi için önemli genlerdir (Khatab vd. 2014).

Kuraklık stresi uygulanan arpa bitkilerinde kontrole göre antioksidan enzimlerden SOD, POX, CAT, APX de artış gözlemlenirken, bitkiler stres altındayken MDA ve H₂O₂ içeriklerinin arttığı ancak selenyum uygulamasında bu içeriklerin değişmediği bildirilmiştir (Habibi 2013).










3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada bitki materyali olarak **DEO12-1471192** çeşidine ait kolza (*Brassica napus ssp. oleifera L.*) tohumları ticari bir firmadan temin edilmiştir.

3.1. Deneme Düzeni

Bütün kanola tohumları sterilize edildikten sonra %75 torf ve %25 perlit karışımı hazırlanmış saksılara 9' ar adet 3 tekrarlı olarak ekildi ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim dolabında büyütüldü. Ortamlar aşağıdaki sıralanmaya göre etiketlendi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan ortamlar

 1.Ortam	 2.Ortam	 3.Ortam	 4.Ortam	 5.Ortam
Kontrol	1,5 g/L Borik asit	3 mg/L Sodyum selenit	3 mg/L Sodyum selenit	6 mg/L Sodyum selenit
 6.Ortam	 7.Ortam	 8.Ortam	 9.Ortam	
1,5 g/L Borik asit + 3 mg/L Sodyum selenit	1,5 g/L Borik asit + 6 mg/L Sodyum selenit	3 g/L Borik asit + 3 mg/L Sodyum selenit	3 g/L Borik asit + 6 mg/L Sodyum selenit	

12. günde bitkilere stres uygulanmış, 12 saat sonrasında kolza (*Brassica napus ssp. oleifera L.*) bitkilerinin yaprakları hasat edilerek RNA izolasyonu yapıldı.



Şekil 5.1. Ortamlara ait bitkilerin yaprak örnekleri

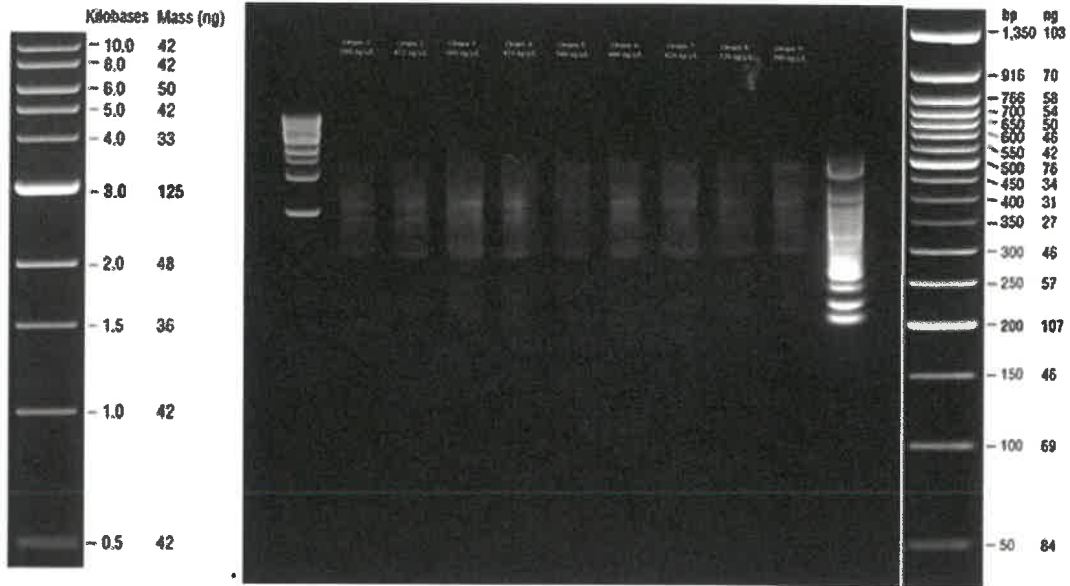
3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak, üretici firmanın aşağıda verilen protokolüne göre gerçekleştirildi.

- Hasat edilen bitki örnekleri sıvı azot kullanılarak havanlarda toz haline getirildi.
- Ezilen örnek, steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine β -Mercaptoethanol eklendikten sonra Buffer RLT solüsyonundan 450 μ l ilave edilip, kuvvetli bir şekilde vortekslendi.
- Bu işlemin solüsyon Qiashredder kolonu içerisine aktarılıp 2 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi.
- Tüpün içinde oluşan pelete dokunmadan süpernatant çekilerek üzerine 0,5 hacimde ethanol (%96-100) eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı.
- Karışım çökelti meydana gelmeden kitin içinde bulunan RNeasy spin kolon tüplerine aktarılarak 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Daha sonra alttaki sıvı dökülerek üzerine 700 μ l Buffer RW1 eklenerek 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Ardından tüpte biriken sıvı dökülerek Buffer RPE 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra tekrar eklenip 10.000 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edildi.
- RNeasy kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpleri içerisine yerleştirildikten sonra 1 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 40 μ l ddH₂O eklendi. 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilecek ve kolonlar atıldı. Örnekler -20 °C'de saklandı.

RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre (BioDrop DUO UV/VIS ile belirlenmiştir. Daha sonra örneklere Dnase I (RQ1, Promega Corp., Madison) uygulanarak kalite ve miktar tayini ile agaroz jel görüntüsü alınmıştır. Kalite ve miktar tayini A260/A230 oranının 2,0–2,2 ve A260/A280 oranının 1,8–2,1 arasında olması, saf RNA izole edildiği anlamına gelmektedir. A260/A280 oranı 2' nin üzerinde olan örnekler saf olarak kabul edildi (Şekil 6.1).

Şekil 6.1. RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

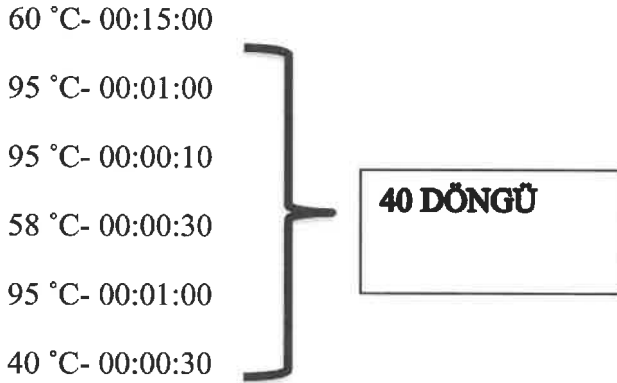


3.3. RT- qPCR

Çalışmamızda gen ifadeleri, EvoScript RNA SYBR Green I Master kiti kullanılarak gerçekleştirildi. EvoScript Green I Master optimize edilmiş bir PCR tampon içinde dNTP'leri ve Taq DNA Polimeraz enzimini içermektedir. Örnekler; PCR saflığında su (Vial 2) 10 µl, Master 5x konsantrasyonuyla (Vial 1) 4 µl, ekspresyonuna bakılacak primer çiftinden 1 µl, 5 ng/µl saf RNA örneğinden 2 µl karışım hazırlandı. Karışım her bir ortamın yaprak ve kök örneklerinden Çizelge 3.1'de yer alan primer çiftleri ile 3 tekrarlı olarak test edilmiştir. RT-qPCR, Şekil 7.1' de belirtildiği amplifikasyon koşullarında kuruldu.

Çizelge 3.1. RT-qPCR için kullanılan primerler (Yang vd. 2014; Ali vd. 2015)

Primerler	Dizilimi
BnPPR_F	5'TGGTGTGCGATAAGTGTGAGA 3'
BnPPR_R	5'GGTGTCCATCTGTTCTTCTTGG 3'
BnSOD_F	5' ACGGTGTGACCACTGTGACT 3'
BnSOD_R	5' GCACCGTGTGTTTACCATC 3'
BnPOD_F	5'ATGTTTCGTGCGTCTCTGTC 3'
BnPOD_R	5' TACGAGGGTCCGATCTTAGC 3'
BnCAT_F	5' TCGCCATGCTGAGAAGTATC 3'
BnCAT_R	5' TCTCCAGGCTCCTGAAGTT 3'
BnAPX_F	5' ATGAGGTTTGACGGTGAGC 3'
BnAPX_R	5' CAGCATGGGAGATGGTAGG 3'
BnGR_F	5' AAGCTGGAGCTGTGAAGTT 3'
BnGR_R	5' AGACAGTGTTCGCAAAGCAG 3'

Şekil 7.1. RT-qPCR amplifikasyon koşulları

3.4. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Bütün ekstraksiyon adımları buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. -80 °C' de saklanan 0,5 g bitki yaprakları 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 0,2% Triton X-100 ve 0,1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) içeren 1 ml potasyum fosfat tamponunda (pH 7,5) ekstrakte edilip homojenat 14000 rpm de 4 °C' de 20 dakika santrifüj edilerek, süpernatant APX, SOD, CAT, GR, POD aktivite tayinlerinde doğrudan kullanılmak üzere buza alınarak işlemler hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Enzim aktivitelerinin tayininden önce süpernatanttaki protein miktarları Bradford yöntemi yardımı ile belirlendi. Bu nedenle Pierce™

Coomassie (Bradford) Protein Assay kiti kullanıldı.

3.4.1. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz aktivitesi Nitro Blue Tetrazolyumun (NBT) fotokimyasal redüksiyonunu engelleme özelliğine dayanan yöntemle ölçülecektir. Buna göre; 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0.1 mM EDTA, 13 mM L-metionin, 75 µM NBT çözeltilerinden oluşan analiz karışımı (185 µL) 96 kuyucuklu plakanın her bir gözüne dağıtılıp kuyucuklara 10 µl toplam protein izolatu eklenmiştir. Son olarak her bir kuyucuğa 1mM riboflavin (5µl) eklenerek reaksiyon başlatılacaktır. Tepkime karışımı pipetleme ile karıştırılarak 15 dakika boyunca 5000Lx ışık kaynağı altında 25 °C' de tutulmuştur, ardından absorbans 560 nm'de mikropate spektrofotometre ile belirlenmiştir. Tüm örnekler 3 kat analiz edilmiştir. Aynı şartlarda hazırlanan fakat karanlıkta bırakılan karışım blank olarak, enzim ekstraktı içermeyen karışım ise kontrol olarak kullanıldı. Bir ünite enzim aktivitesi (U), NBT indirgememesinin %50 inhibisyonu için gereken enzim miktarıdır (Yıldırım ve Kaya 2017).

3.4.2. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, Bergmeyer (1970)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir. H₂O₂'in miktarında oluşan azalma, 240 nm'de gösterdiği maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir. CAT aktivitesi, dakikada harcanan µmol H₂O₂ olarak ifade edilmiştir.

3.4.3. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

POD aktivitesi için guaiacol oksidasyonu 470 nm de 1 dakika da absorbanstaki artışa göre ölçülecektir. Bu amaçla 50 µl enzim ekstraktı küvete alınacak ve ardından %0,2 guaiacol, %0,57 H₂O₂ içeren 100 mM posfat tamponunun (pH:7,0) 1ml sinin küvete eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Bir ünite enzim 470 nm de dakikada absorbansta 0,01 artışa sebep olan enzim miktarıdır (Chen vd. 2015).

3.4.4. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

APX miktarını belirlemek için 50 mM potasyum fosfat tampon ve 0,25 mM askorbik asit içeren reaksiyon çözeltisinden 185 µl örnek Costar marka UV-geçiren 96 kuyucuklu plaka (Costar UV-Transparent 96 well Microplates) içine alınmıştır. Ardından 10 µl bitki lizatu kuyucuklara eklenerek, APX reaksiyonu her kuyucuğa 5 µl 200 mM H₂O₂ eklenmesiyle başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki düşüş 290 nm'de 25 °C'de 5 dakika boyunca 49 saniye aralıklarla kinetik okuma yapılarak kaydedilmiştir. H₂O₂ eklenmeden önce reaksiyon karışımı için aynı koşullarda yapılan spektrofotometrik ölçüm referans olarak kullanıldı (Murshed vd. 2008).

3.4.5. Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi

GR aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976)'in yöntemine göre, 340 nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak belirlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol okside glutasyon (GSSG) miktarı olarak ifade edilmektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bor bitkilerin sağlıklı gelişimi ve büyümesi için gerekli bir mikro elementtir. Bununla birlikte tarımsal üretimlerde veya sulama sularında yetersiz ve toksik konsantrasyonları, üretimdeki verimini ve kalitesini sınırlandırmaktadır (Yoshinari ve Takano 2017; Shireen vd. 2018). Çoğu abiyotik stres koşulunda olduğu gibi bor toksitesinde de reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır (Foyer ve Shigeoka 2011). Bitkide strese neden olan bor toksitesinin etkisinin azaltılması için enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar devreye girmektedir. Bu çalışmada reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde önemli bir yeri olan savunma enzimlerinin APX, GR, POD, SOD ve CAT seviyeleri incelenmiştir.

Yapılan pek çok çalışmada selenyumun çok az miktarda dahi savunma mekanizmasında reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında abiyotik stres koşullarından kuraklık, tuz stresi, su, ağır metal, UV ışığı, düşük sıcaklık ve yüksek sıcaklık uygulamaları altında olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Feng vd. 2013; El-Ramady vd. 2016). Ancak bu konuda yapılan çalışmalar abiyotik stres koşullarındaki etki mekanizmasını belirlemede yetersiz kalmakta yine de literatürde bor stresini azaltmada selenyumun iyileştirici etkisinin bulunduğu azda olsa çalışma bulunmaktadır. Bu kapsamdaki literatür azlığı göz önüne alındığında, bu çalışma Se'nin *B. napus* bitkilerinde B-stresi üzerindeki iyileştirici etkisini araştırmaya çalışmıştır.

Bu kapsamda 12 gün boyunca bitki büyütme kabiniinde büyütülmüş *B. napus ssp. oleifera* (kanola) bitkileri 12 saat boyunca B ve / veya Se uygulamaları ile muamele edildi. Uygulamalar sonucunda yaprak örnekleri gen ekspresyonu (APX, CAT, SOD, POD ve GR), protein seviyeleri (APX, SOD ve POD) ve hücresel düzeyde oksidatif zararın belirtisi olarak da MDA konsantrasyonlarının ölçümleri için alındı. Her antioksidan genin ekspresyon seviyeleri, bireysel (B veya Se) veya kombine (B + Se) uygulamaları altında incelenmiştir. Bireysel uygulamalar (L başına) 1.5 g B, 3 g B, 3 mg Se ve 6 mg Se, kombine uygulamalarda ise 1.5 g B + 3 mg Se, 1.5 g B + 6 mg Se, 3 g B + 3 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se içermektedir. Ali vd. (2015) antioksidan genlerinin ifadesinde başarılı sonuç aldıkları primer dizaynları kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda *B. napus*' da referans genlerden biri olarak bildirilen PPR geni RT-qPCR' da kontrol olarak kullanıldı (Yang vd. 2014).

B. napus bitkilerine yapılan bor uygulamaları (1.5 g B, 3 g B) sonucu oluşan stres semptomları gözlemlenmiştir (Şekil 8.1). Gelişimin ilk aşamalarında bor toksitesi semptomlarının ayırt edilebilmesi zor olmaktadır. Ancak yaprak B içeriği ile toksitesinin şiddeti arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bu nedenle, B toksitesinin teşhisi esas olarak bitki yapraklarından yapılır (Reid 2013; Princi vd. 2015). Yaprak uçlarında yanma ve nekroz görülmesi bor toksitesinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Roessner vd. 2006; Sutton vd. 2007; Reid ve Fitzpatrick 2009; Reid 2013; Princi vd. 2015). Bu çalışmada gözlenen morfolojik değişiklikler (Şekil 8.1), literatürdeki kurutma yaprak uçlarında kuruma ve yaprak yanması B toksite semptomlarına benzemektedir. Özellikle, 3 g L⁻¹ B uygulaması açıkça bir yaprağın aşağıya doğru çekilmesine neden olmuştur ve yapraklarının uçlarında kuruma gözlemlenmemiz literatür bilgileriyle eşleşmektedir.

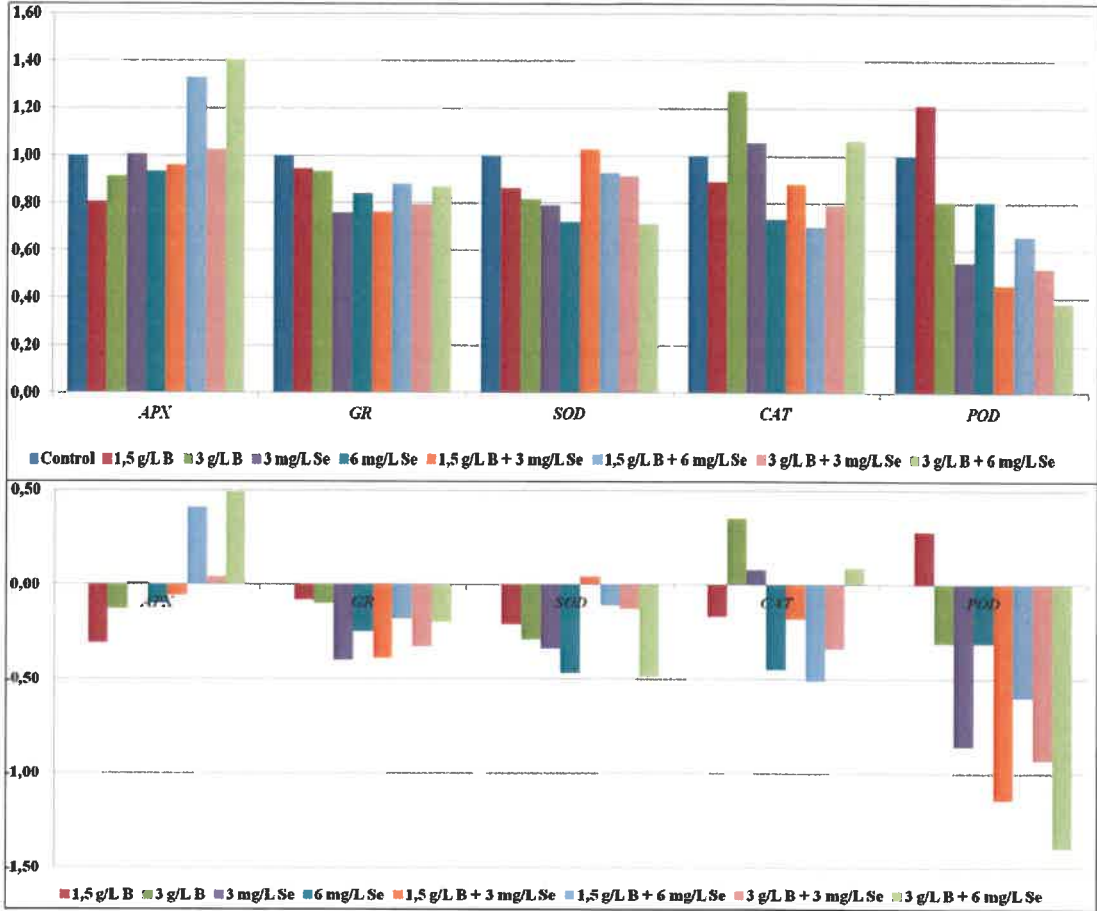


Şekil 8.1. *B. napus* bitkilerinde 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamalarının etkileri

Stres koşulları altında, bitkilerde meydana gelen ana değişikliklerden bir diğeri antioksidan enzim genlerinin seviyesinde yukarı veya aşağı regülasyonu vardır. Çeşitli stres koşulları altındaki bitkilere Se destekli uygulamalar sonucunda antioksidan enzim seviyelerine bakıldığında farklılıklar bildirilmiştir.

Bu çalışmada, APX, CAT, SOD, POD ve GR antioksidan genlerinin verilen uygulamalar altında esas olarak aşağı doğru regüle edildiği bulunmuştur (Şekil 9.1). APX gen ekspresyonunda, kombine uygulamalardan 1.5 g B + 6 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se uygulamalarında sırasıyla %33 ve %40 artış gösterdi. Sadece B veya Se uygulaması ya da 3 mg Se içeren diğer kombine uygulamalar, APX gen ifadesinde bir artışa neden olmamıştır. Kolza bitkisinde kuraklık stresine, Se uygulamaları sonucunda APX, DHAR,

MDHAR, GR, GST, GPX ve CAT gibi antioksidan enzim seviyelerinde artış gösterdiği (Hasanuzzaman ve Fujita 2011), buğday bitkisine 1 ve 5 μM sodyum selenit ya da sodyum selanat uygulamalarında APX seviyelerinde artışa yol açtığı ayrıca düşük dozlarda selenyumun bitkide gelişimini arttırdığı bildirmişlerdir (Boldrin vd. 2016). Bu nedenle çalışmamızda Se konsantrasyonunun en fazla olduğu 6 mg /L Se, APX indüksiyonu için optimal bir konsantrasyon olabilir.



Şekil 9.1. *B. napus* bitkilerinde APX, CAT, SOD, POD ve GR genlerinin 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamalarında yaprakattan ifade profilleri. Kantifikasyon RT-qPCR ile yapıldı. Veriler, daha iyi sunum için hem kat değişim (yukarıda) hem de log₂ (aşağıda) ifadesi değerleri olarak temsil edilir

Ayrıca tüm uygulamalarda GR geninin aşağı regüle edildiği kaydedilmiştir. Bu noktada bizim çalışmamızdan farklı olarak, buğday ve arpa bitkilerine farklı dozlarda selenyum uygulaması sonucu SOD, GR, CAT, APX seviyelerinde artış gözlemlenmelerini selenyum dozunun yüksekliği nedeniyle toksik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (Çakır 2007; Gökbulut 2010). Kuraklık stresi altında dayanıklı ve hassas iki pamuk çeşidinde yapılan bir çalışmada dayanıksız çeşitte MDA seviyelerinde değişim gözlemlenmezken dayanıklı çeşidin MDA seviyelerinde değişim olmadığı halde GR ve prolin içeriğindeki artış olduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2013). Bahsi geçen çalışmaya göre bizim verilerimiz bitkilerin stres altında reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmaya çalıştığını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada 1,5 g B + 3 mg Se uygulaması sonucunda SOD hafif

arttırılmış ekspresyon seviyesi göstermiştir. Bununla birlikte hem GR hem de SOD genleri ifadelerinde, bireysel 3 mg ve 6 mg Se uygulamaları, 1.5 g ve 3 g B uygulamalarına göre daha fazla regüle edilmesine yol açmıştır. Se uygulaması sonucu bu azaltılmış gen ifadeleri, baskılanmış ROS aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Böylece Se'nin stres üzerindeki etkisini hafiflettiğini düşünmekteyiz. Örneğin kolza tohumundaki kuraklık stresine selenyum uygulamalarında APX, CAT ve POD (Duan vd. 2014), sorgumda tuzluluk stresini azaltılmasında Se uygulamasında CAT, SOD ve POX enzim seviyelerinde artış gözlemlenmesi (Djanaguiraman vd. 2010), bir başka çalışmada gene kuraklık stresinde farklı buğday çeşitlerinde POD, SOD ve CAT enzim seviyelerinde artış gözlemlendiği bunun gibi pek çok çalışmada bildirilmiştir (Wang 2011).

CAT geninin 3 g B, 3 mg Se ve 3 g B + 6 mg Se uygulamalarında, diğerlerinde ise aşağı regüle edildiği bulunmuştur. Özellikle, 1.5 g'den 3 g'ye kadar olan bor artışı, CAT ifadesini (~%43) önemli ölçüde arttırdı, bu, uygulanan oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir. Selenyumun diğer bir abiyotik stres koşullarında (kuraklık) etkisini belirlemek için yapılan bir diğer çalışmada yüksek selenyum doz uygulamalarında CAT, POD, MDA içeriklerini azaltıldığı ancak düşük konsantrasyonlardaki uygulamaların tam tersi etki gösterdiği bildirilmiştir (Yao vd. 2009). Ayrıca en farklı ifade POD geninde gözlemlendi; 1.5 g B uygulaması, POD ifadesinde %21 artışa neden olurken, 3 g B + 6 mg Se uygulaması ifadesinde %62 düşüğe neden oldu. Bunun dışında limon otunda tuzluluk stresine 10 µM Se uygulayarak bitkinin gelişimi üzerindeki inhibisyonun kalktığı ayrıca POD ve GPX enzim seviyelerinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Habibi vd. 2015).

Öte yandan, ölçülen toplam yaprak APX, SOD ve POD proteinlerinin miktarları, mRNA seviyeleri ile daha az korelasyon göstermiştir (Şekil 10.1). Bu ekspresyon seviyeleri sadece verilen genin tek bir üyesi için ölçüldü, ancak protein miktarları, belirtilen şartlar altında ifade edilen tüm üyelerin konsantrasyonları dahil olarak test edildi.

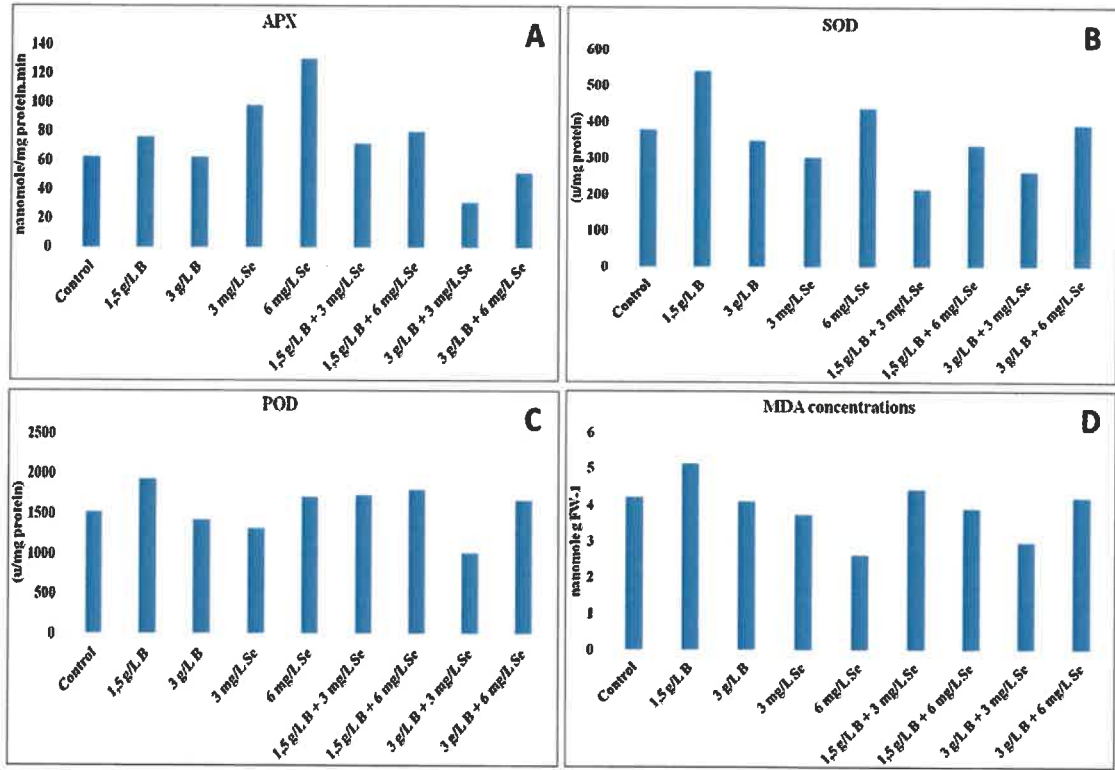
Diğer birçok çalışma, mRNA ve protein seviyelerindeki değişikliklerin, farklı aşamalarda regülasyon kontrolleri nedeniyle her zaman iyi korelasyon göstermediğini göstermiştir (Vogel ve Marcotte 2012; Silva ve Vogel 2016). Burada, bireysel 6 mg⁻¹Se Se uygulaması, en yüksek APX enzim aktivitesini ve ardından 3 mg⁻¹ Se'yi göstermiştir (Şekil 10.1a). Bu, Se'nin kendisinin başka stres faktörlerinin yokluğunda strese neden olabileceği anlamına gelir.

Bununla birlikte, kombine olduğu gibi diğer stres faktörleri ile birlikte uygulandığında Se, APX aktivitesinin azaltılmasını, daha az ROS aktivitesi ve dolayısıyla Se'nin pozitif etkisiyle ilişkili olabilir. Bunun yanı sıra, SOD proteini için, sırasıyla en yüksek enzim aktiviteleri ile bireysel 1.5 g L⁻¹ B ve 6 mg L⁻¹ Se uygulamaları kaydedilmiştir (Şekil 10.1b).

POD aktivitesinde de benzer sonuçlar gözlemlendi (Şekil 10.1c). Tüm bunlar Se'nin hafifletici etkisinin bir şekilde stres faktörünün varlığına bağlı olabileceğini ve aksi halde Se'nin kendisinin bir stres etkeni olarak antioksidan mekanizmayı tetikleyebileceğini göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu, bir stres faktörü tarafından uygulanan hücresel membranlardaki oksidatif hasarın kapsamından kaynaklanmaktadır. Lipid

peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA, bitki stres seviyeleri ile ilişkilendirilmektedir (Chen ve Zhang 2015; Sheoran vd. 2015; Wang vd. 2015).



Şekil 10.1. *B. napus* bitkilerinde 12 saatlik bireysel (B veya Se) ve kombine (B + Se) uygulamaları sonrası APX (A), SOD (B), POD (C) ve MDA (D) yapraktaki konsantrasyonları

Bu çalışmada, MDA miktarları sadece 1.5 g L⁻¹ B uygulamasında önemli ölçüde artırılırken, diğer uygulamalardaki miktarları kontrol gruplarına benzer ya da daha düşüktü (Şekil 10.1d). Kavunda tuzluluk stresi uygulamasında selenyumun etkisini belirlemek için yapılan çalışmada POD ve SOD seviyelerindeki artmasıyla birlikte MDA seviyelerinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (Habibi 2013). Aynı ekibin yaptığı kuraklık stresi uygulaması sonucunda elde ettiği verilere göre POD, CAT, APX seviyelerindeki artışa rağmen MDA seviyelerinde kontrole göre değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar ayrıca, Se varlığında stres faktörlerine karşı antioksidan enzimin tepkilerinin, stres düzeylerine (i), uygulanan Se konsantrasyonlarına (ii) ve enzim varyantlarına (iii) bağlı olduğunu göstermiştir. İlk olarak, bitkiler düşük stres düzeyleriyle başa çıkabilir; bununla birlikte, yüksek dozlarda ROS'a karşı enzim aktivitelerinin artması gerekir. İkinci olarak, antioksidan enzim aktiviteleri, düşük Se konsantrasyonlarında faydalı olmasına rağmen, yüksek Se uygulaması enzim aktivitesini artırır. Üçüncüsü, enzim varyantı veya kofaktör tipi, regülasyonun nasıl değiştirildiği konusunda çok önemli bir rol oynamaktadır.

Genel olarak stres toleransı, farklı antioksidan enzimlerin sinerjistik koordinasyonu ile sağlanmaktadır. Bununla birlikte, bu çalışmada antioksidan enzimler çoğunlukla aşağı regülasyon göstermiştir ve daha ilginç olarak, bireysel B uygulamalarının, çoğu uygulamada antioksidan genlerin ekspresyonunu arttırmadığı da

gözenmiştir.

Gen ifadelerindeki aşğı regölasyonlar, verilen B dozları süresinin kısaca yeterli ROS uyarmak veya ROS, ifadelerin ölçüldüğü zaman noktasından önce çoktan temizlendiğini düşünmekteyiz. Bu açıklama, morfolojik gözlemlerinde B-toksisitesi semptomların ortaya çıktığını ortaya çıkarmasından dolayı daha uygun görünmektedir.

6. SONUÇLAR

Bor temel bir mikro besin maddesidir, ancak toksisitesi bitki verimliliğini olumsuz yönde etkiler. Bununla başa çıkarken, bitkilere sinerjik koordinasyonu stres toleransı ile sonuçlanan çeşitli etkili antioksidan enzimler verilir. Ek olarak, stres koşulları altında optimal Se takviyesinin, bu enzimlerin temizleyici rollerini daha fazla desteklediği de gösterilmiştir. Bu çalışma, Se'nin B stresi altındaki iyileştirici etkisini ortaya çıkarmak için yapılmıştır.

Bu noktada tezimizde antioksidan enzim genlerinin çoğu esasen aşağı regülasyon göstermiştir, ancak protein seviyeleri ve mRNA seviyelerinin tamamen eşleşmediğini düşünüyoruz. Bunu açıklamak için farklı senaryolar önerilebilir, ancak bunun arkasındaki gerçek nedeni anlamak için farklı bireysel ve kombine stres konsantrasyonları altında daha fazla moleküler düzeyde çalışma yapılması gerekir. Denememizde bitkilere uygulanan stres koşulu ve miktarı bitkide toksite semptomlarını göstermiş olsada metabolik sürecin anlaşılmasında anahtar, antioksidan enzim ifadelerinin yerine MDA ölçümlerindeki artış ya da azalmanın olduğunu bildirmekteyiz.

Elde edilen veriler literatür bulgularıyla hem çelişmekte hemde doğrulamaktadır. Farklı bitki türlerinde yapılmış stres çalışmalarında Se uygulamalarının koruyucu etki gösterdiği ancak antioksidan enzim seviyelerinde değişiklik olmadığı bilinmektedir. Tezimizde, uygulamaların antioksidan genleri ifadelerine bakarak abiyotik stres koşullarında Se doğrudan koruyucu etkisinin olduğunu söyleyememekteyiz. Ancak uygulanan Se konsantrasyonlarının Se hiperakümülatörü olarak bilinen Brassica türleri için temel olacağını düşünmekteyiz. Bu bağlamda, bu çalışma, Se'nin B-stres koşullarında iyileştirici rolünü incelemeyi amaçlayan gelecekteki çalışmalar için bir ön temel bilgi sağlamıştır.

7. KAYNAKLAR

- Ali B, Gill RA, Yang S, Gill MB, Farooq MA, Liu D, Daud MK, Ali S, Zhou W (2015) Regulation of Cadmium-Induced Proteomic and Metabolic Changes by 5-Aminolevulinic Acid in Leaves of *Brassica napus*. L *PLoS One* doi: 10.1371/journal.pone.0123328.
- Ardıç, M., Sekmen, A.H., Türkan, İ., Tokur, S., Özdemir, F. 2009. The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plant Soil*, 314: 99-108.
- Atalay, E., Gezgin, S., & Babaoglu, M. (2003). Boron uptake of in vitro seedlings of wheat (*Triticum durum* Desf.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) as determined by ICP-AES. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 17(32), 47-52.
- Bagheri, A., Paull, J.G., Rathjen, A.J., (1994). The response of *Pisum sativum* L. germplasm to high concentrations of soil boron. *Euphytica* 75 (1-2), 9–17.
- Boldrin, P. F., de Figueiredo, M. A., Yang, Y., Luo, H., Giri, S., Hart, J. J., ... & Li, L. (2016). Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, 158(1), 80-91.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 7; 72(1-2): 248-54.
- Cakmak, Ismail, Hannes Kurz, and Horst Marschner. "Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower." *Physiologia Plantarum*, 95.1 (1995): 11-18.
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Romero, L., Ruiz, J.M., 2012. Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *J. Bot.* 1–17.
- Chantachume, Y., (1995). Genetic studies on the tolerance of wheat to high concentrations of boron. Ph.D. thesis, Department of Plant Science, Waite Agricultural Research Institute, University of Adelaide, Australia.
- Chapman, V. J., et al. "Challenging the dogma of a narrow supply range between deficiency and toxicity of boron." Boron in soils and plants: proceedings of the International Symposium on Boron in Soils and Plants held at Chiang Mai, Thailand, 7-11 September, 1997. Dordrecht; London: Kluwer Academic, c1997., 1997.
- Chen T, Zhang B (2015) Measurements of Proline and Malondialdehyde Content and Antioxidant Enzyme Activities in Leaves of Drought Stressed Cotton. *Plant Cell Physiol.*
- Çakır, S., 2007, Selenyum Toksisitesinin İki Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşidinde (Tarm 92, Bülbül 89) Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kayseri, 64s.
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front.*

Environ. Sci 2: 53.

- Demiray, H., Dereboylu, A.E., Altan, F., Zeytunluoglu, A. 2011. Identification of proteins involved in excess boron stress in roots of carrot (*Daucus carota* L.) and role of niacin in the protein profiles. *African Journal Of Biotechnology*, 10: 15545-15551.
- Djanaguiraman M, Prasad PV, Seppanen M (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 999-1007. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.009.
- Dobermann, A., Fairhurst, T., 2000. Rice. Nutrient Disorders and Nutrient Management. Handbook Series. Potash and Phosphate Institute. Atlanta, GA, Potash and Phosphate Institute of Canada, and International Rice Research Institute, Los Banos, the Philippines, p. 191.
- Duan BH, Liu XW, Jiao W, Zhao ZQ, Hu CX (2014) Alleviation of Boron Toxicity on Rape Seedlings by Selenium. *Sci. Agric. Sin.* 47: 2126-2134.
- Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1973. İstatistik Metodları. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 861, Ders Kitabı, Ankara, 229 s. (Buradaki girinti 1.25 cm'dir).
- Edwards G. and Walker D., 1983, C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- El-Ramady H, Abdalla N, Taha HS, Alshaal T, El-Henawy A, Salah EDF, Elhawat N (2016) Selenium and nano-selenium in plant nutrition. *Environ. Chem. Lett.* 14: 123-147.
- Emebiri, L., Michael, P., Moody, D., 2009. Enhanced tolerance to boron toxicity in two-rowed barley by marker-assisted introgression of favorable alleles derived from Sahara 3771. *Plant Soil* 314, 77–85.
- Feng R, Wei C, Tu S (2013) The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ Exp Bot* 87.
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155: 93-100. doi:10.1104/pp.110.166181.
- Furlani, A.M.C., Carvalho, C.P., De Freitas, J.G., Verdial, M.F., 2003. Wheat cultivar tolerance to boron deficiency and toxicity in nutrient solution. *Sci. Agric.* 60, 359–370.
- Gill, J.B. 1981. Orogenic Andesites and Plate Tectonics. Springer-Verlag, Berlin, 390 p.
- Düzgüneş, O. 1963. İstatistik Prensipleri ve Metotları. Ege Üniv. Matbaası, İzmir, 364 s.
- Gill, Sarvajeet Singh. Tuteja, Narendra. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (2010): 909-930.
- Goldberg, Sabine. "Reactions of boron with soils." *Plant and soil* 193.1 (1997): 35-48.
- Gökbulut, T., 2010, Bazı Buğday Çeşitlerinde Selenyum Birikimi ve Selenyum

- Toksisitesinin Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 112s.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E. G., Coban, S. and Sahin, O. 2006. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Scientia Horticulturae*.110, 279-284.
- Gupta, Umesh C., et al. "Boron toxicity and deficiency: a review." *Canadian Journal of Soil Science* 65.3 (1985): 381-409.
- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö. ve Çobanoğlu, D., 2004. Ağır metal iyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia sp.* bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri. F.Ü. Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi, 16(2), 177-182.
- Habibi, G., 2013, Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley / Ucinék susnega stresa in skropljenja s selenom na fotosintezo in antioksidativno aktivnost jarega jecmena, *Acta agriculturae Slovenica*, 101 (1), 31.
- Habibi, G., & Sarvary, S. (2015). The roles of selenium in protecting lemon balm against salt stress. *Stress*, 5(3), 1425-1433.
- Hartikainen, H, Xue, T., Piironen, V., Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass, *Plant and Soil*, 225, 193-200 (2000).
- Hasanuzzaman M, Fujita M (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 143: 1758-1776. doi:10.1007/s12011-011-8998-9.
- Hobson, K., Armstrong, R., Nicolas, M., Connor, D., Materne, M., 2006. Response of lentil (*Lens culinaris*) germplasm to high concentrations of soil boron. *Euphytica* 151, 371–382.
- Howie, J.H., 2012. Boron tolerance in annual medics (*Medicago* spp.). *Crop and Pasture Sci.* 63, 886–892.
- Jefferies, S.P., Pallotta, M.A., Paull, J.G., Karakousis, A., Kretschmer, J.M., Manning, S., Islam, A.K.M.R., Langridge, P., Chalmers, K.J., 2000. Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoret. Appl. Genet.* 101, 767–777.
- Kaçar B, katkat AV, Öztürk Ş, (2009). Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Yayın No: 848, Fen Bilimleri:28, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:46, ISBN 978-975-591-833-4, 171-172.
- Karabal, E., Yücel, M. and Öktem, H. A. 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity, *Plant Science*, 164, 925-933 p.
- Kaur, S., Nicolas, M.E., Ford, R., Norton, R.M., Taylor, P.W.J., 2006. Selection of *Brassica rapa* genotypes for tolerance to boron toxicity. *Plant Soil* 285, 115–123.
- Keren, R., and F. T. Bingham. "Boron in water, soils, and plants." *Advances in soil science.* Springer New York, 1958. 229-276.
- Khattab, H. I., Emam M. A., Emam M. M., Helal N. M., Mohamed M. R., 2014. Effect

- of selenium and silicon on transcription factors NAC5 and DREB2A involved in drought-responsive gene expression in rice, *Biologia Plantarum*, June 2014, Volume 58, Issue 2, pp 265-273(2014).
- Lyons, G. H., Genc, Y., Soole, K., Stangoulis, J. C. R., Liu, F., Graham, R. D., Selenium increases seed production in Brassica, *Plant Soil*, 318,73-80, (2009).
- Mahboobi, H., Yucel, M., Oktem, H.A., 2002. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and barley under boron toxicity. *J. Plant Nutr.* 25, 1829–1837.
- Malik JA, Goel S, Kaur N, Sharma S, Singh I, Nayyar H (2012) Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus Roxb.*) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 77: 242-248.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal. Biochem.* 383: 320-322. doi:10.1016/j.ab.2008.07.020.
- Nable, Ross O., Gary S. Bañuelos ve Jeffrey G. Paull. "Bor toksisitesi." *Bitki ve Toprak* 193.1-2 (1997): 181- 198.
- Ochiai, K., Shimizu, A., Okumoto, Y., Fujiwara, T., Match, T., 2011. Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Physiol.* 156, 1457–1463.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Oluk, E.A., Acar, O., Demirbaş, S., Duran, H., Atik, E., Gorkem, H.N. 2012. Alterations in antioxidative enzyme activities caused by boron toxicity in two tomato culture varieties. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21: 290-294.
- Ozturk, M., Sakcali, S., Gucl, S., Tombuloglu, H., 2010. Boron and plants. In: Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M.S.A. (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer, The Netherlands, pp. 275–312.
- Paschke, M.W., Valdecantos, A. and Redente E.F., 2005. Manganese toxicity thresholds for restoration grass species. *Environmental Pollution*, 135:313-322.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. and Loureiro, M.E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* 167, 1307-1314.
- Princi MP, Lupini A, Araniti F, Longo C, Mauceri A, Sunseri F, Abenavoli MR (2015) Boron Toxicity and Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives. *Plant Met. Interact.* 115- 147.
- Princi, M.P., Lupini, A., Araniti, F., Sunseri, F., Abenavoli, M.R., 2013. Short-term effects of boron excess on root morphological and functional traits in tomato. In: XVII International Plant Nutrition Colloquium- Boron Satellite Meeting- Proceedings Book-17–18 August 2013–Istanbul, Turkey, pp. 1150 1151.

- <http://www.plantnutrition.org/files/downloads/2013ipnc-b-proceedings.pdf>.
- Raychaudhuri, S. S. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Bot.Rev.*, 66(1), 89-98.
- Reid R, Fitzpatrick K (2009) Influence of leaf tolerance mechanisms and rain on boron toxicity in barley and wheat. *Plant Physiol.* 151: 413-420. doi:10.1104/pp.109.141069.
- Reid RJ (2013) Boron toxicity and tolerance in crop plants. In *Crop Improvement Under Adverse Conditions*. Springer, New York, NY.
- Roessner U, Patterson JH, Forbes MG, Fincher GB, Langridge P, Bacic A (2006) An investigation of boron toxicity in barley using metabolomics. *Plant Physiol.* 142: 1087-1101 doi:10.1104/pp.106.084053.
- Sadeghi, S., Oustan, S., Najafi, N., Valizadeh, M., & Monirifar, H. (2015). The impact of cadmium-zinc interactions on phytochemical responses in *Brassica napus cv. Hyola*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 9(6), 207-215.
- Schnurbusch, T., Langridge, P., Sutton, T., 2008. The Bo1-specific PCR marker AWW5L7 is predictive of boron tolerance status in a range of exotic durum and bread wheats. *Genome* 51, 963–971.
- Seppanen, M., Turakainen, M., Hartikainen, H., Selenium effects on oxidative stress in potato, *Plant Science*, 165(2), 311-319, (2003).
- Seyis F., Yurteri E., "Türler arası melez kolza formlarının hibrit ıslahındaki önemi", *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, cilt.6, ss.109-117, 2013.Çabukel, B., Gönül, K., Yalçınkaya, T., & Mısır, E. (2009). Türkiye’de bitkisel yağ sektörü ve alternatif bir çözüm, kanola yağı. Yıldız Teknik Üniversitesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü Ders Notları.
- Sheoran S, Thakur V, Narwal S, Turan R, Mamrutha HM, Singh V, Sharma I (2015) Differential activity and expression profile of antioxidant enzymes and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum L.*) under drought. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177: 1282-1298.
- Sherwin, H.W. and Farrant J.M. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul.*, 24, 202-210.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. And Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.*, 53, 1305-1319.
- Shireen F et al. (2018) Boron: Functions and Approaches to Enhance Its Availability in Plants for Sustainable Agriculture *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19071856.
- Shireen F et al. (2018) Boron: Functions and Approaches to Enhance Its Availability in Plants for Sustainable Agriculture *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19071856.
- Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R. 2003. Antioxidative defence system in upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiol. Plant.*, 119, 503-512.

- Stevenson, F.J., Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions,. Vol. 2nd edition. 1994: John Wiley and Sons.
- Sutton T et al. (2007) Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Sci.* 318: 1446-1449. doi:10.1126/science.1146853.
- Şimşek, Atilla, Ferda Sarı, Nevzat Artık. (2004). "Selenyumun insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi." *Anadolu Üniv. Bilim ve Tek. Der.* 5(2): 245-251.
- Tıraş, M. (2009). TÜRKİYE'DE KANOLA TARIMI. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 14(21), 159-172.
- Türkan. I., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.*, 168, 223-231.
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- Vinocur, Basia. Altman, Arie. "Recent Advances in Engineering Plant Tolerance To Abiotic Stress: Achievements and Limitations." *Current Opinion in Biotechnology* 26 (2005): 123-132.
- Vitosh ML, Warncke DD, Lucas RE (1994). Secondary and Micronutrients for Vegetables and Field Crops.
- Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13: 227-232. doi:10.1038/nrg3185.
- Wang CQ (2011) Water- stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174: 276-282.
- Wang M, Wu C, Cheng Z, Meng H (2015) Growth and physiological changes in continuously cropped eggplant (*Solanum melongena* L.) upon relay intercropping with garlic (*Allium sativum* L.). *Front. Plant Sci.* 6: 262. doi:10.3389/fpls.2015.00262.
- Wang, W., Vinocur, B. ve Altman, A., 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: towards Genetic Engineering for Stress Tolerance, *Planta*, 218, 1-14.
- Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Brown, P.H., La"uchli, A., 2005. Boron response in wheat is genotype dependent and related to boron uptake, translocation, allocation, plant phenological development and growth rate. *Funct. Plant Biol.* 32, 507–515.
- Xu, J., Hu Q., 2004. Effect of foliar application on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium-enriched rice, *J. Agric. Food Chem.*, 52(6), 1759-1763, (2004).
- Yang, H., Liu, J., Huang, S., Guo, T., Deng, L., & Hua, W. (2014). Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in *Brassica napus* L. *Gene*, 538(1), 113-122.

- Yao, X., Chu, J. ve Wang, G., 2009, Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress, *Biol Trace Elem Res*, 130 (3), 283-290.
- Yau, S.K., Erskine, W., 2000. Diversity of boron-toxicity tolerance in lentil. *Genet. Resour. Crop Evol.* 47, 55–61.
- Yau, S.K., 2002. Comparison of European with West Asian and North African winter barleys in tolerance to boron toxicity. *Euphytica* 123, 307–314.
- Yıldırım K, Kaya Z (2017) Gene regulation network behind drought escape, avoidance and tolerance strategies in black poplar (*Populus nigra L.*). *Plant Physiol. Biochem.* 115: 183-199. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.03.020.
- Yoshinari A, Takano J (2017) Insights into the Mechanisms Underlying Boron Homeostasis in Plants. *Front Plant Sci.* 8: 1951 doi:10.3389/fpls.2017.01951.
- Zhang, L., Peng, J., Chen, T. T., Zhao, X. H., Zhang, S. P., Liu, S. D., ... & Yu, S. X. (2014). Effect of drought stress on lipid peroxidation and proline content in cotton roots. *J Anim Plant Sci*, 24, 1729-173.

ÖZGEÇMİŞ

Melahat Özge ÖZEN

melahatozgeozen@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2015- 2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2011-2015	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi 2017- Devam Ediyor	Multi Tohum, Antalya
--	----------------------

ESERLER

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makale

1-Yılmaz E., Özen M. Ö., Özen N., "Determination of changes in yield and quality of tomato seedlings (*Solanum lycopersicon* cv. Sedef F1) in different soilless growing media", Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt.30, ss.163-168, 2017.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiri

1- Yılmaz E., Özen M. Ö., Özen N., "Determination of Changes in Yield and Quality of Tomato Seedlings (*Solanum Lycopersicon* Cv. Sedef F1) in Different Growing Media", 2nd International Conference on Science Ecology and Technology, BARCELONA, İSPANYA, 14-16 Ekim 2016, pp.243-243.