T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

EKSTREM TOLERANSLI *PUCCİNELLİA DİSTANS* BİTKİSİNDE PROTEOMİK ANALİZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tamer GÜMÜŞ

1102060039

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

AĞUSTOS 2020

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

EKSTREM TOLERANSLI *PUCCİNELLİA DİSTANS* BİTKİSİNDE PROTEOMİK ANALİZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tamer GÜMÜŞ

1102060039

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge ÇELİK

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Çimen ATAK

Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

AĞUSTOS 2020

ÖNSÖZ

Tez çalışmam, lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince değerli fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde emeği geçen Sayın Prof. Dr. Çimen ATAK'a ve bu süreçte bana bir anne şefkatiyle yaklaşan saygıdeğer tez danışman hocam Prof. Dr. Özge ÇELİK'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans, yüksek lisans eğitimim boyunca gerek derslerimde gerek laboratuvar çalışmalarımda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini bana aktaran ve desteklerini hiç esirgemeyen çok değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN, Sayın Prof. Dr. Seyhan ALTUN, Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Atok OLGUN'a,

Lisans eğitimimden itibaren laboratuvarda bana destek olan ve şu anda iş arkadaşlarım olan Araş. Gör. Sinan MERİÇ, Araş. Gör. Dr. Alp AYAN, Araş. Gör. Dr. Özge RENCÜZOĞULLARI, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan yetişemediğim her anda yardımıma koşan, mezun olan ve hala bizimle çalışmalarını sürdüren tüm Bitki Biyoteknolojisi Grubu üyelerine,

Hem eğitim hemde özel hayatımda en büyük motivasyonum, her daim manevi destekçim olan ve bu yolda ışığıyla yolumu aydınlatan sevgili MSc. Zeynep Elif APAYDIN'a

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olarak beni destekleyen babam Erhan GÜMÜŞ ve okuyarak kendimi geliştirmem için beni her daim teşvik ederek hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem Berrin GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1001 Projesi (Proje no: 116Z343, 2017-2020) tarafından desteklenmiştir. Bu proje kapsamında verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a ve projem için çalışma olanağı sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarına teşekkürü borç bilirim.

Ağustos, 2020 **Tamer Gümüş**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
KISALTMALAR v
ŞEKİL LİSTESİ vii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. BOR STRESİ 7
2.1.1. Bor Tolerans Mekanizmaları 13
2.2. TUZ STRESİ 18
2.2.1. Tuz Stresi Tolerans Mekanizmaları 21
2.3. Puccinellia distans 25
2.4. PROTEOMİK 28
3. MATERYAL VE METOD 34
3.1. KULLANILAN YÖNTEMLER 34
3.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi 34
3.1.2. Protein İzolasyonu 34
3.1.3. Proteinlerin Saflaştırılması 35
3.1.4. Bradford Protein Miktar Tayini Yöntemi 36
3.1.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi 37
3.1.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi 37
3.1.6. İki Boyutlu Jel Elektroforezi 38
3.1.6.1. Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları 38

3.1.6.2. Proteinlerin 2. Boyut Elektroforezinde Moleküler Ağırlığına Göre Ayırılması 38
3.1.6.3. 2-D Jellerin Analizi ve Spotların Kesilmesi 39
3.1.6.4. Zip-Tip 40
3.1.7. MALDI TOF-TOF Analizi 40
3.1.8. Lazer Kaynaklı Plazma Spektroskopisi (LIBS) 41
3.1.9. İstatistiksel Analiz 42
4. SONUÇLAR 43
4.1. BOR VE TUZ STRES DENEMELERİNDE BİTKİ GELİŞİMLERİNE AİT SONUÇLAR 43
4.2. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ ANALİZİNE AİT SONUÇLAR 43
4.3. LAZER KAYNAKLI PLAZMA SPEKTROSKOPİSİ (LIBS) ANALİZİNE AİT SONUÇLAR 48
4.4. SEÇİLEN PROTEİN SPOTLARININ PROTEOMİK ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR 48
4.4.1. Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14'e Ait Sonuçlar 52
4.4.2. F-Box Protein 6'ya Ait Sonuçlar 53
4.4.3. Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar 55
4.4.4. Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20'ye Ait Sonuçlar 56
4.4.5. Peroksiredoksin 2-F'e Ait Sonuçlar 57
4.4.6. Karotenoid 9-10 Oksijenaz'a Ait Sonuçlar 58
4.4.7. Triozfosfat İzomeraz'a Ait Sonuçlar 60
4.4.8. Oksijen Evolving Enhancer Protein 2'ye Ait Sonuçlar 61
4.4.9. TATA Bağlayıcı Protein 2'ye Ait Sonuçlar 62
4.4.10. Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi'ne Ait Sonuçlar 63
4.4.11. Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi'ne Ait Sonuçlar 64
4.4.12. Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz'a Ait Sonuçlar 65
4.4.13. Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar 66

4.4.14. Tiyoredoksin M'e Ait Sonuçlar 67
4.4.15. Trioz-fosfat izomeraz'a Ait Sonuçlar..... 68
4.4.16. Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar 69
4.4.17. Trioz-fosfat izomeraz'a Ait Sonuçlar..... 70
5. TARTIŞMA 72
KAYNAKÇA 83
EKLER 95
ÖZGEÇMİŞ 100

KISALTMALAR

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µA: Mikroamper

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

µM: Mikromolar

2DE: İki boyutlu jel elektroforezi

2ME: 2-Merkaptoetanol

ACN: Asetonitril

APS: Amonyum persülfat

BSA: Bovine Serum Albumin

Da: Dalton

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTT: Diklorodifeniltrikloroetan

g: Santrifüj kuvveti

H_2O_2: Hidrojen peroksit

IAA: İyodoasetamid

IEF: İzoelektrik odaklama

L: Litre

M: Molar

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

ng: Nanogram

nM: Nanomolar

PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi

pH: Hidrojen iyonu konsantrasyonu

PI: İzoelektrik noktası

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türevi

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

SDS: Sodyum dodesil sülfat

TEMED: Tetrametiletilendiamin

TFA: Trifloroasetik Acit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Ramnogalakturonan II ve Bor kompleksi 1

Şekil 2.1 A) Borik asidin kimyasal yapısı B) Boratın kimyasal yapısı..... 7

Şekil 2.2 Borun Hücre İçerisine Alımı..... 9

Şekil 2.3 Borun MIP kanalları ve BOR pompalarıyla topraktan alınıp ksileme aktarımı, EP: Epidermidis, CO: Korteks, EN: Endodermis, PC: Perisikl 16

Şekil 2.4 Floem'deki Sorbitol İçeren Bor Kompleksi..... 17

Şekil 2.5 Borun Organizma boyunca Taşınımı ve Bor Kanalllarının Bitki Dokularındaki Dağılımı 18

Şekil 2.6 Tuz Stresinin Tolerans Mekanizmaları 23

Şekil 2.7 Tuz stesi altında SOS Kanallarının Hücresel Dağılımı,Trans-Golgi ağı (TGN) ve prevakuolar bölme (PVC)..... 24

Şekil 2.8 *Puccinellia distans (Jacq.) Parl.*..... 26

Şekil 3.1 MALDI TOF-TOF Analizinin Şematik Olarak Gösterimi 41

Şekil 4.1 Bor Noksanlık Koşullarında Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B0T0, B. B0T1, C. B0T2)..... 45

Şekil 4.2 Optimum Bor İçeren Koşullarda Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B1T0, B. B1T1, C. B1T2)..... 46

Şekil 4.3 Yüksek Bor İçeren Koşullarda Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B2T0, B. B2T1, C. B2T2)..... 47

Şekil 4.4 Spot 1 olarak eşleşen Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14'ün ifade değişimleri..... 53

Şekil 4.5 Spot 2 olarak eşleşen F-Box Protein 6'nın ifade değişimleri 54

Şekil 4.6 Spot 3 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi'nin ifade değişimleri 56

Şekil 4.7 Spot 4 olarak eşleşen Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20'nin ifade değişimleri 57

Şekil 4.8 Spot 5 olarak eşleşen Peroksiredoksin 2-F'nin ifade değişimleri 58

Şekil 4.9 Spot 6 olarak eşleşen Karotenoid 9-10 Oksijenaz'ın ifade değişimleri 59

Şekil 4.10 Spot 7 olarak eşleşen sitozolik Triozfosfat İzomeraz'ın ifade değişimleri 61

Şekil 4.11 Spot 8 olarak eşleşen Oksijen Evolving Enhancer Protein 2'nin ifade değişimleri 62

Şekil 4.12 Spot 9 olarak eşleşen TATA Bağlayıcı Protein 2'nin ifade değişimleri 63

Şekil 4.13 Spot 10 olarak eşleşen Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi'nin ifade değişimleri 64

Şekil 4.14 Spot 11 olarak eşleşen Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi'nin ifade değişimleri 65

Şekil 4.15 Spot 12 olarak eşleşen Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz'ın ifade değişimleri 66

Şekil 4.16 Spot 13 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'nin ifade değişimleri 67

Şekil 4.17 Spot 14 olarak eşleşen Tiyoredoksin M'nin ifade değişimleri 68

Şekil 4.18 Spot 15 olarak eşleşen sitozolik Trioz-fosfat izomeraz'ın ifade değişimleri 69

Şekil 4.19 Spot 16 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'nin fade değişimleri 70

Şekil 4.20 Spot 17 olarak eşleşen sitozolik Trioz-fosfat izomerazın fade değişimleri 71

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Bor ve Tuz Uygulamalarının Konsantrasyonları 34

Tablo 4.1 Jellerde Elde Edilen Spot Sayıları 44

Tablo 4.2 LIBS Analizine Göre Seçilen Protein Spotlarının İfade Düzeylerindeki Değişimler ve Eşleştikleri Proteinler 49

Tablo 5.1 Kullanılan Cihazların Listesi 95

Tablo 5.2 Kullanılan Kimyasalların Listesi 96

Tablo 5.3 %12' Lik SDS-PAGE Jel İçeriği 98

Tablo 5.4 4X Laemmli İçeriği 98

Tablo 5.5 Fiksasyon Solüsyonu İçeriği 98

Tablo 5.6 Boyama Solüsyonu İçeriği 99

Tablo 5.7 Rehidrasyon/Protein Çözme Tamponu ve Dengeleme Tampon İçeriği 99

ÖZET

Bor (B) elementi, bitkiler için vejetatif ve generatif gelişme evrelerinde önemlidir. Bitkilerin gelişim süreci ve yaşamı için gerekli olan doğal metabolik aktivitelerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan bir mikro besleyici esansiyel elementtir. Bor elementinin eksikliğinde veya aşırı bor alımında bitkilerde metabolik rahatsızlıklar oluştuğu bilinmektedir. Son zamanlarda artan bor stresi önemli bir abiyotik bir stres olarak dikkat çekmektedir ve yüksek bor konsantrasyonlarının sıklıkla tuzlu topraklarda bulunması bor stresi ile kombine tuz stresinin araştırılmasının bitkiler için oldukça kritik yanıtlar vereceğini düşündürmektedir. Tuz akümülasyonu, iyon toksisitesi, mineral dengesindeki bozulmalar, membran geçirgenliğinin değişmesi ve kararsızlaşması, azalan fotosentez ve enerji metabolizmasındaki değişimler gibi bitkinin hayatta kalması için gerekli olan metabolik aktiviteleri etkilemektedir. Türkiye'de çorak çimi ismiyle adlandırılan *Puccinellia distans* türü hem tuzlu hem de yüksek konsantrasyonda bor içeren topraklarda rahatlıkla yaşayabilmektedir. *Puccinellia distans,* bor elementi için yüksek miktarda akülümülasyon kapasitesine sahip olan hiperakümülatör bir halofit bitkidir. Yüksek oranda bor ve tuz içeren topraklarda metabolik faaliyetlerini aksatmadan yaşayabilmektedirler.

Bu sebeple gerçekleştirilen bu tez çalışmasında amacımız, monokotiledon bitkiler için uygun bir model organizma olabileceği öne sürülen, yüksek tuz ve bor stresine direnç gösteren, hiperakümülatör bir bitki olan *Puccinallia distans* bitkisi kullanılarak bitkilerin tuz ve bor direncine katkı sağlayan moleküler yolaklarının aydınlatılmasıdır. *P. distans* bitkileri çimlenme aşamasının ardından 2 haftalık fideler noksanlık/B0 (0µM), kontrol/B1 (30µM) ve yüksek seviyede/B2 (4mM) olmak üzere 3 farklı bor dozu uygulanmıştır. Bor uygulamalarıyla eş zamanlı olarak NaCl uygulaması da başlatılmıştır. Noksanlık/T0 (0mM), kontrol/T1 (100mM), yüksek tuz/T2 (250mM) NaCl uygulamasına 30 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Stres uygulamasının sonrasında bitkilerden total protein izolasyonları yapılarak -80 ^{o}C'de saklanmışlardır.

Farklı konsantrasyonlarda bor ve tuz uygulanan *Puccinellia distans* bitkilerinden izole edilen proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi analizleri yürütülmüş olup elde edilen jeller PDQuest™ (Bio-rad ABD) yazılım aracıyla analiz edilmiş ve normalizasyon sonrasında 9 jel üzerinde toplam 2088 protein spotu saptanmıştır. En çok protein spotu, 282 spot ile Bor ve tuz noksanlık (B0T0) koşullarında yetiştirilen bitkilerden elde

edilen ait jellerde saptanmıştır. En az protein spotu ise B noksanlık ve yüksek tuz (B0T2) koşullarında yetişen bitkilerden izole edilen proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi örneklerinde saptanmıştır. Saptanan 2088 spot arasından bor konsantrasyonundaki değişimler baz alınarak PDQuest Advanced programı ile analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı artış veya azalış gösteren 28 spot belirlenmiştir. Jellerden kesilen spotların içerisinde bulunan proteinlerin metal iyonlarıyla olan etkileşimleri incelenmiştir. Bu incelemeler ışığında seçilen 28 spottan 17 tanesinin yüzeyinde Bor iyonlarına ait emisyonlar saptanmış ve analizlerde bu spotlar kullanılmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında *Puccinellia distans* bitkisinde bor ve tuz artışına bağlı olarak değişiklik gösteren proteinler gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kombine stres uygulamalarından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

ABSTRACT

Boron (B) element is important for plants in vegetative and generative development stages. It is a micronutrient essential element necessary for plants to maintain their natural metabolic activities necessary for their development process and life. It is known that metabolic disturbances occur in plants due to deficiency or excessive intake of boron element. Recently, increasing boron stress has attracted attention as an important abiotic stress, and the presence of high boron concentrations in salty soils suggests that investigation of salt stress combined with boron stress will give highly critical responses for plants. Salt accumulation affects metabolic activities necessary for plant survival, such as ion toxicity, disruptions in mineral balance, altered and destabilized membrane permeability, reduced photosynthesis, and changes in energy metabolism. *Puccinellia distans* species called the alkali grass in Turkey can live comfortably in both salinity and boron containing high concentrations. *Puccinellia distans* is a hyperacumulatory halophyte plant with high accumulation capacity for boron element. They can live in soils which include high boron and salt without disturbing their metabolic activities.

For this reason, our aim in this thesis study is to elucidate the molecular pathways of plants that contribute to salt and boron resistance by using the hyperacumulative plant *P. distans*, which is suggested to be a suitable model organism for monocotyledonous plants and is resistant to high salt and boron stress. After the germination stage of *P. distans* plants, 3 different boron doses were applied to the 2-week-old seedlings as deficiency / B0 (0µM), control / B1 (30µM) and high level / B2 (4mM). Simultaneously with boron applications, NaCl application has also been initiated. Deficiency / T0 (0mM), control / T1 (100mM), high salt / T2 (250mM) NaCl application for 30 days. After the stress application, total protein isolations were made from the plants and stored at -80 ^{o}C.

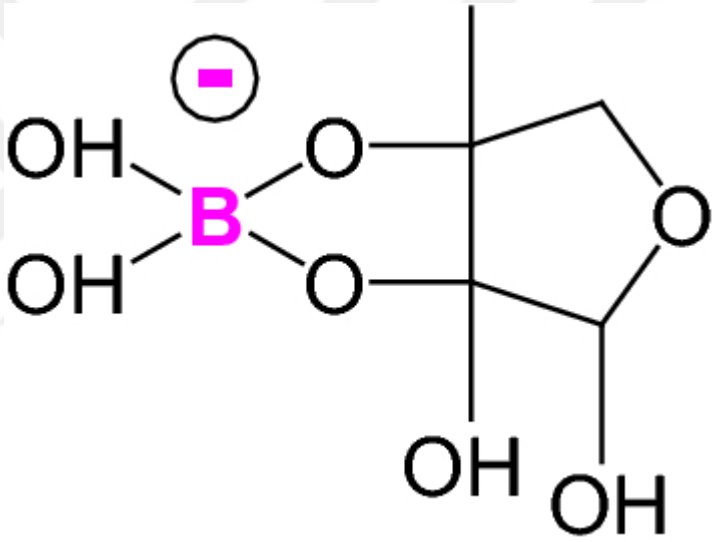
Two-dimensional gel electrophoresis analyzes of proteins isolated from *P. distans* plants treated with different concentrations of boron and salt were carried out, the gels obtained were analyzed with PDQuest ™ (Bio-rad USA) software and after normalization, a total of 2088 protein spots were detected on 9 gels. The most protein spots were detected in the gels obtained from plants grown under Boron and salt deficiency (B0T0) conditions with 282 spots. The least protein spot was detected in

two-dimensional gel electrophoresis samples of proteins isolated from plants grown under B deficiency and high salt (B0T2) conditions. Based on the changes in boron concentration among the detected 2088 spots, they were analyzed with PDQuest Advanced program and 28 spots that showed a statistically significant increase or decrease were determined. The interactions of the proteins in the spots cut from the gels with metal ions were investigated. Emissions of boron ions were detected on the surface of 17 of the 28 spots selected in the light of these investigations and these spots were used in the analysis.

As a result, in this thesis study, proteins showing changes due to the increase in boron and salt were shown in *Puccinellia distans*. The results obtained are compared with the results obtained from combined stress applications and discussed.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bor (B) elementi, tüm bitkiler için vejetatif ve generatif gelişme evrelerinde yüksek önem arz eden, gelişim sürecini etkileyen ve bitkilerin yaşamı için gerekli olan doğal metabolik aktivitelerini devam ettirebilmelerinde elzem olan bir mikro besleyici esansiyel elementtir. Henüz bor elementinin bitki metabolik aktiviteleri üzerindeki kesin ve net etkileri tam olarak bilinmemekle beraber, bor eksikliğinde veya aşırı bor alımında bitkilerde oldukça geniş yelpazede metabolik rahatsızlıklar oluştuğu bilinmektedir [1].



Şekil 1.1 Ramnogalakturonan II ve Bor kompleksi [2].

Bor elementinin bitkilerde en iyi karakterize edilmiş rolü, borat diester çapraz bağları ile plazmalemmada yer alan Ramnogalakturonan II (RGII) pektinlerini birbirine bağlamasıdır. Bor elementi bu yapısal rolünü hücre duvarlarındaki mono-, oligo- ve polisakaritler gibi bitişik cis-hidroksil içeren moleküller, dioller ve hidroksiasitler arasında diester köprüler oluşturarak gerçekleştirmektedir [3].

Bitkilerin bor alımında sulama suyunda ya da toprakta çözünmüş olarak bulunan bor bileşikleri kadar tarım arazilerindeki drenaj yetersizliği de etkili olmaktadır. Daha çok kurak veya yarı kurak topraklarda gözlemlenen yüksek bor miktarının neden olduğu

toksisite, tarımı yapılan bitkilerde önemli verimsel kayıplara ve kalitede istenilen seviyelerin yakalanamamasına neden olmaktadır. Günümüzde bor yoksunluğu dünyanın her yerinde yaygın bir sorun olarak karşımıza çıkmakta ve 80'in üzerinde ülkede 130'un üzerinde tarımsal bitki üzerinde önemli derecede etkilerde bulunmaktadır. Çin'in kolza tarımı yapılan güneydoğu bölgesinde bor yetersizliği sonucunda ürün veriminde yaklaşık olarak %40'lık bir verim düşüklüğü olduğu rapor edilmiştir [4-6].

Toprakta mevcut bulunan bor eksikliği borla zenginleştirilmiş çeşitli gübrelerin toprağa eklenmesi veya yaprağa uygulanması yoluyla giderilebilmektedir. Ancak bor toksisitesini gidermek özellikle de toprak yakma veya yıkama gibi geleneksel iyileştirme araçları kullanıldığında maliyet açısından çok daha masraflı ve meşakkatli süreçleri barındırmaktadır. Tuzlu topraklarla kıyaslanınca bor toksisitesini ıslah etmek çok çok daha yavaş bir süreçte gerçekleşmektedir. Topraklardaki pH değeri bor elementinin alımını yakından etkilemektedir. pH değerinin yükselmesi bor elementinin absorpsiyonunun artmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda da nötr ve alkali pH aralığındaki topraklarda bor elementinin yıkanarak uzaklaştırılması zorlaşmaktadır. Borun topraktan arındırılması sürecinde NaCl gibi stres etmenlerine göre yaklaşık 3 kat fazla su kullanımı gerekmesi; bor elementinin topraktan temizlenmesini pratikte olanaksız hale getirmektedir [7, 8].

Bor toksisitesine karşı tolerans, farklı bitki türleri arasında, hatta aynı tür içerisindeki genotipik farklılıklardan dolayı, aynı tür içerisinde bile farklılık göstermekte ve farklı yanıtların oluşmasına neden olmaktadır. Türlerin verdikleri yanıtlara göre, iyi tolerans gösterebilenlere tolerant, az tolerans gösterebilenlere ise duyarlı adı verilerek gruplandırmaları yapılmaktadır [6].

Çeşitli biyotik ya da abiyotik stres etmenlerinin, farklı doz ve kombinasyonlardaki varlığı, bitkiye her bir stres etmeninin ayrı ayrı verdiği zarardan daha yüksek sinerjistik bir zarar verebilmektedir. Abiyotik stresler arasında tuzluluk, mahsul verimliliğini önemli ölçüde düşüren en önemli faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bor stresi son zamanlarda yaygınlığı ve önemi giderek artan bir abiyotik stres etmeni olarak tanımlanmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonlarının sıklıkla tuzlu topraklarda bulunması bor stresi ile kombine tuz stresinin araştırılmasının bitkiler için oldukça kritik yanıtlar vereceğini düşündürmektedir. Dünyadaki tarım arazisi olarak kullanılan

geniş bir alan, her geçen gün, artan tuzluluktan etkilenmektedir. Tuzluluk sulu tarım yapılan topraklarda daha belirgin bir sorundur. Dünyada, ekili alanların yaklaşık %17'sinde sulu tarım yapılmaktadır. Toplam tarımsal üretimin yaklaşık %30'undan fazlası sulu tarım ile sağlanmaktadır. Bu topraklarda yapılan aşırı sulama ve gübreleme, toprakta oluşan tuzluluğun en büyük faktörlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünyadaki toplam tarım arazilerinin en az %20'sinin tuzdan etkilendiği tahmin edilmektedir. Önlem alınmadığı takdirde, gelecek 20 yıl içerisinde bu artışın hızla ilerleyeceği ve 1,5 katına çıkacağı öngörülmektedir. Ortaya çıkan tuzluluğa ek olarak, ortaya çıkabilecek diğer stres etmenlerinde düşünüldüğü zaman verim kaybı çok büyük boyutlara ulaşmaktadır [9, 10].

Söz konusu tuz ile kontamine topraklarda yetişen bitkiler, tuz stresiyle karşılaştıklarında verdikleri yanıtlara veya stresi tolere edip edememelerine göre iki şekilde isimlendirilmektedir. Tuz oranı toprak çözeltisinde dikotiledonlu türler için 100 ila 200 mM, monokotiledonlar için 50 ila 100 mM olan topraklarda yetişebilen bitkilere halofit, tuz oranı %0,01'nin altında topraklarda yetişen bitkilere ise glikofit adı verilmektedir. Halofitler, bitki türlerinin en fazla %2'sini temsil eden, evrimsel süreçte doğal olarak gelişmiş ya da ıslah çalışmalarıyla geliştirilmiş bitkileri kapsamaktadır. Tuza duyarlı türlerin neredeyse %99'unun NaCl toksisitesi nedeniyle yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştiremediği tuzlu topraklarda halofitler yaşam döngülerini tamamlama yeteneğine sahiptirler. Halofitler, sitotoksik Na' yı sekestre etme kabiliyetleri nedeniyle bu iyonları tolere edebilmektedirler [11, 12].

Toprakta akülüme olan tuz ve diğer mineraller, yüksek konsantrasyonlara ulaştığında bitkinin doğal fonksiyonlarının bozulmasını tetiklemesinin yanında, toprağın yapısının bozulmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Tuz toprakta akülüme olduğu zaman, toprağın yapısını su geçirgenliğini azaltarak bozmaktadır. Tuz akülümülasyonu, iyon toksisitesi, mineral dengesindeki bozulmalar, membran geçirgenliğinin değişmesi ve kararsızlaşması, azalan fotosentez ve enerji metabolizmasındaki değişimler gibi bitkinin hayatta kalışı işin için elzem olan metabolik aktiviteleri etkilemektedir. Bunların yanı sıra, tuzluluğa karşı yanıt türden türe göre değişse de tüm bitkilerde, su kaybını azaltmak için daha küçük yapraklar, bodurlaşma, vasküler dokuda meydana gelen farklılaşmalar, kök tüylerinde küçülme, yoğunluğunda azalma ve hatta yok olma,

normalden çok daha uzun kökler, tomurcuklar ve yapraklarda mineral eksikliğine bağlı olarak klorofil yıkımı yani klorosis gibi fizyolojik etkiler ortaya çıkmaktadır [13, 14].

Bitkiler canlılıklarının devamlılığını korumak için çeşitli moleküler savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Stresle başa çıkabilmek için bitki ilk olarak, artan antioksidan ifadesi ve şaperon proteinlerin yardımıyla hasarı önlemeli veya hafifletmelidir. İkincisi, stres etmenlerinin bulunduğu ortamdaki bozulan homeostatik koşulları, seçici olmayan katyon kanalları (NSCC) ve tuz aşırı hassasiyet (salt overly sensitive; SOS) katyon kanalları yardımıyla hücre dışarısına Na^+ pompalanması gerçekleşerek yeniden oluşturmalıdır. Üçüncüsü, düşük bir oranda da olsa büyümeye devam etmelidir. Birinci yolak bitkiye topraktan kök aracılığıyla alınan toksik dozdaki tuzun indirgenmesi veya fotosentezden sorumlu dokularda birikiminin azaltılmasıdır. Bunun için kök tarafından kaspari şeridi oluşumu gibi mekanizmalarla seçici geçirgenlik uygulanmaktadır. Diğer bir yolak ise, sitoplazmadaki toksik tuz derişiminim indirgenmesidir. Bitkiler bu moleküler yolakları tuzun iyon pompaları aracılığıyla ya da aktif taşımayla hücrelerden dışarı pompalanması, tuzun ve oluşan reaktif oksijen türevlerinin organellerde kritik hasar oluşturmasını engellemek için tuzun vakuollerde depolanması, osmotik dengenin sabit tutulabilmesi ve hücrelerin içerisine su alınabilmesi için osmoprotektan kimyasalların üretimi ve tuz molekülleri için intrasellüler iyon bölünmesi gibi çok karmaşık direnç mekanizmaları ile gerçekleştirmektedirler. Üçüncü yol ise, absisik asitin (ABA) ve sikline bağımlı protein-kinaz inhibitörü olan ICK1'in birikimi ve aktivasyonu hücre döngüsünün sürdürülmesine yardımcı olan sikline bağımlı protein kinazların (CDK) aktivitelerini azaltarak hücre bölünmesini inhibe edebilmektedir. Hücre büyümesinde görevli oksin, sitokinin, giberellik ve brassinostreoidler gibi diğer hormonların senteziyle, büyüme yeniden bazal seviyede hayata geçirilmektedir [15-17].

Bitki verimini düşüren iki önemli stres etmeni beraber düşünüldüğünde hem bor hem de tuz ile kontamine toprakların ıslahı için öne sürülebilecek en mantıklı çözüm yolu, hiperakümülatör bitkilerin kullanımını gerektiren fitoremediasyon yoludur. Fitoremediasyon, toprakta biriken ağır metallerin, ametallerin, radyonüklidlerin, metalloidlerin ve diğer organik bileşiklerin hiperakümülatör bitkiler yardımıyla uzaklaştırılması işlemi ve diğer bir adıyla yeşil ıslah olarak adlandırılmaktadır. Bu işlem sırasında bitki kökleri, topraktan kirletici maddeleri toplayarak toprak üstü

kısımlarında depolanmasını gerçekleştirmektedir. Sonrasında bitkiler hasat edilerek atılabilir ya da bitki depo yapmadan kirletici molekülü enzimatik aktivitelerle değişikliğe uğratıp zararsız hale getirebilmektedir [18].

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, çevre temizliği için fitoremeditasyon kullanımı, ucuz ve çevre dostu olması nedeniyle klasik remediasyon işlemlerinin önüne geçmektedir. Toprak geri kazanımının önemli örnekleri olarak Ukrayna'da Çernobil havzası çevresinde ayçiçeklerinin kontamine olmuş topraktaki radyoaktif Sezyum (^{137}Cs) atomlarının geri kazanımı için kullanılması ve Japonya'nın da Fukushima kentinde nükleer enerji santralinde meydana gelen kazadan sonra yabani bitkilerle gerçekleştirdiği çalışmalar verilebilir. İspanya da yerli türlerini, atık madenciliği olarak bilinen bitki ıslahı işlemlerinde kullanmaktadır. Türkiye'de de özellikle bor madenlerinin olduğu mikro çevrelerdeki yüksek bor içeren topraklara adaptasyon sağlamış olan ve fitoremediasyona uygun çeşitli hiperakümülatör türler bulunmaktadır [19-23].

Türkiye'de çorak çimi ismiyle adlandırılan *Puccinellia distans* türü, etkileyici bir şekilde hem tuzlu hem de yüksek konsantrasyonda bor içeren topraklarda rahatlıkla yaşayabilmektedir. *P. distans,* bor elementi için yüksek miktarda akülümülasyon, kapasitesine sahip olan hiperakümülatör bir halofit bitkidir ve bu özelliği sayesinde gerek çevre kirliliği gerekse bor madenciliği için ne kadar önemli bir bitki olduğu öne çıkmaktadır. Klasik remediasyon çalışmaları zahmetli ve yüksek maliyet içerdiği için gelişen teknoloji bizi hiperakümülatör bitkilerin besin değeri açısından zenginleştirilmesi ya da hiperakümülatör bitkiler aracılığıyla toprağın tarıma elverişli hale getirilmesi gibi tekniklere itmektedir. Gerek gen aktarımı gerekse ıslah yoluyla bor toksisitesine dirençli kültür bitkilerinin oluşturulması için söz konusu direnç mekanizmalarının arkasında yatan moleküler yolakların aydınlatılması gerekmektedir. Ayrıca yüksek oranda bor ve tuz içeren topraklarda metabolik faaliyetlerini aksatmadan yürütebilen monokotil bir bitki olan *Puccinellia distans*' ın kendisi gibi monokotil bitkilerden oluşan ve temel tahıl gurubunu oluşturan bitkiler için bor ve tuz stresi direnci araştırmalarında dikotil bir bitki olan *Arabidopsis thaliana'* ya kıyasla çok daha uygun bir model organizma olacağı düşünülmektedir [23, 24].

Özellikle artan küresel ısınmanın getirdiği yoğun su kaybıyla beraber toprakların tuzluluk miktarı gün geçtikçe artmaktadır. Geldiğimiz noktada tuz kontaminasyonu

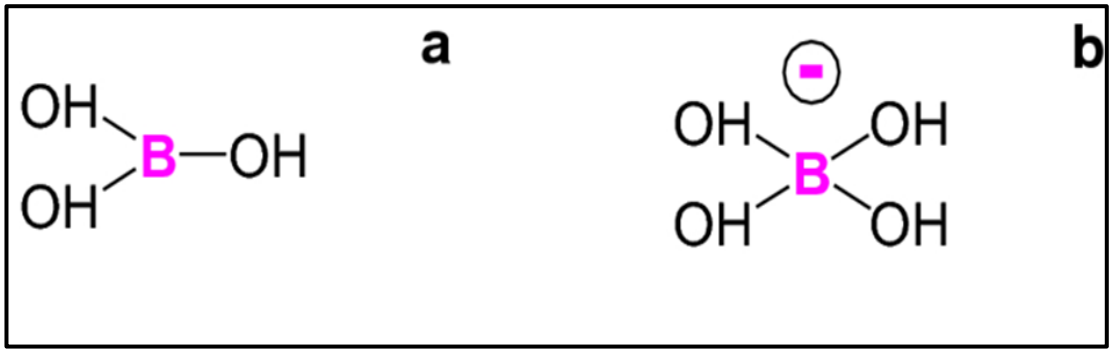
içeren toprakların ıslahı hem maddi olarak zor olmaktadır hem de artan küresel ısınma ile imkânsız hale gelmektedir. Ayrıca insanlık olarak küresel ısınmaya karşı ciddi adımlar atsak bile var olan kontamine alanların yeniden ıslah edilmesi oldukça uzun yıllar alacaktır. Öte yandan, azalan tarım alanlarına karşı dünya nüfusu hızla ve kontrolsüzce artmaktadır. Monokotiledon tahıl bitkileri, insan nüfusunun temel gıdasını oluşturmakla beraber, artan tuzluluk ve bor stresinden en çok etkilenen bitkilerini de içermektedir. Bor ve tuzluluk stresi günümüz dünyasında sıklıkla beraber görülen ve tarımı etkileyerek ciddi verim kayıplarına neden olan abiyotik stres faktörleri olarak bildirilmektedir.

Tahıl bitkilerinin düşen verimini önleyebilmek adına çeşitli araştırmalar özellikle geçtiğimiz son yıllarda oldukça artmıştır. Ancak kullanılan model organizmanın dikotiledonlu *Arabidopsis thaliana* olması, bulunan sonuçların tahıl bitkilerine uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Bu sebeple gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, monokotiledon bitkiler için uygun bir model organizma olabileceği öne sürülen, yüksek tuz ve bor stresine direnç gösteren, hiperakümülatör bir bitki olan *Puccinallia distans* bitkisi kullanılarak bitkilerin tuz ve bor direncine katkı sağlayan moleküler yolaklarının aydınlatılması planlanmaktadır. Bu sayede, tahıllarda son derece önemli olan bitkilerin yüksek iç bor konsantrasyonlarıyla nasıl başa çıktıklarını anlamak için bir model olma potansiyeline sahiptir.[23]

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BOR STRESİ

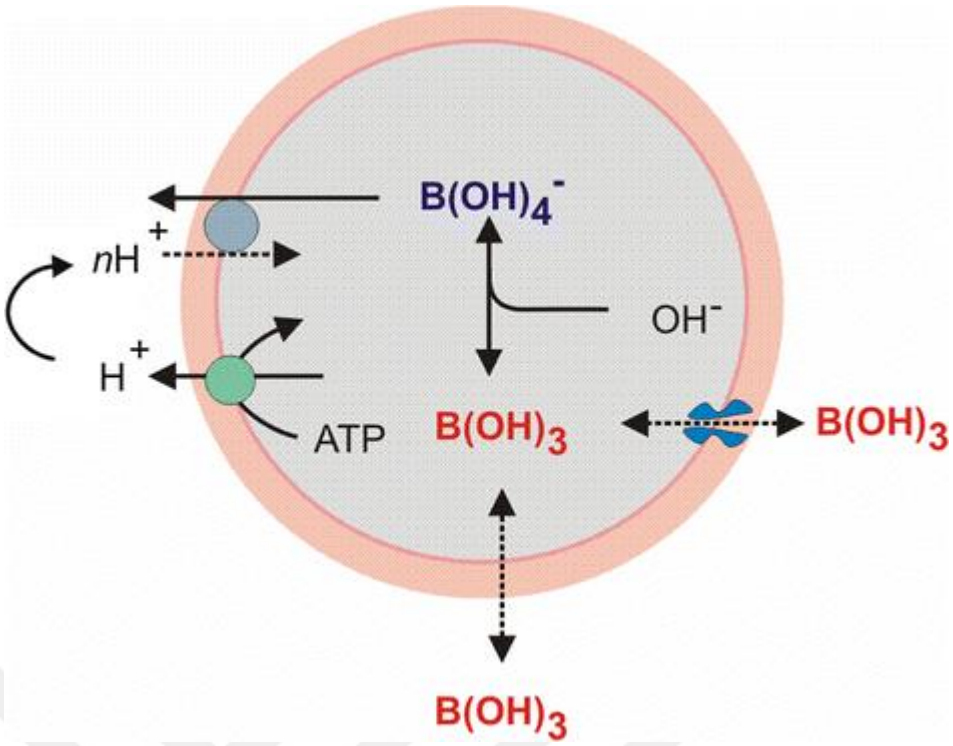
Bor elementi, bitkilerin doğal fizyolojik süreçlerinde, büyüme ve gelişme için esansiyel olan bir mikro besleyici elementtir. Bor elementi, esansiyel mikro besleyiciler arasında yer alan tek yarı metaldir. Atom numarası 5 olan ve periyodik çizelgede 3A gurubunun içerisinde yer alan bor elementi, germanyum, polonium, arsenik ve silisyum gibi diğer elementleri de kapsayan metaloid grubunun bir üyesidir. Bitkilerde yaşamsal faaliyetlerin devamı için kritik öneme sahip olan bor elementinin önemi ilk olarak Katherine Warington tarafından 1900 yıllarında fasulye bitkisinde gerçekleştirilen çalışmalar ile açığa çıkarılmıştır. Bor elementi doğada yalnızca element formuyla bulunmaz. Fizyolojik pH koşullarında bor elementi herhangi bir yük ihtiva etmeyen borik asit (H_3BO_3) olarak doğada bulunmaktadır. Bor nadiren de olsa borat iyonları ($B(OH)_4$) şeklinde de bulunmaktadır. Bitkilerin yanı sıra bor elementi, bakteriler, mayalar, bazı alg türleri ve diatomlarında da yaşamlarını etkilenmeden sürdürebilmesi için elzem olan bir besindir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) bor elementini günlük diyet ile alınması gereken kritik elementler listesine 2001 tarihinde eklemiştir [25-29].



Şekil 2.1 A) Borik asidin kimyasal yapısı B) Boratın kimyasal yapısı [2].

Mikro besleyici bir element olmasının yanı sıra bor elementinin çok çeşitli kullanım alanları da mevcuttur. Bunlar, yapı malzemeleri, cam ile seramik, malzeme ve metalürji, temizlik sanayi, savunma sanayi, ulaşım sanayi, sağlık ve enerji sektörüne ait oldukça geniş bir yelpazeye sahip ürünlerdir. Bitkiler alemi için kritik öneme sahip olan bor elementi toprakta düşük seviyelerde bulunduğunda, toprağa dışarıdan gübre verilerek ya da yapraklarına solüsyon halinde dışarıdan püskürtülerek takviye yapılabilmektedir [30, 31].

Bitkiler tarafından oldukça düşük miktarda gereksinim duyulan bor elementinin yoksunluk ve toksisite sınırları birbirine oldukça yakındır. Bu sebeple, bor elementinin miktarı oldukça hassas ayarlanmalıdır. Bor toksisitesi ve noksanlığı, kurak ve yarı kurak bölgelerde önemli verim kayıpları yaşanmasına neden olmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonuna bağlı olan toksisite, bitkilerde temel düzeyde dört etki mekanizmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki ve en erken oluşanı, hücre çeperinde meydana gelen lipit yapısının bozulmasıdır. İkinci mekanizma, RNA yapısında bulunan riboz bağlarını hedefleyerek RNA stabilizesinin bozulmasına sebep olmasıdır: Üçüncü mekanizma ise NADH, NADPH veya ATP' ye bağlanarak riboz şekeri kısmına kusurlar oluşturmasıdır. Dördüncü mekanizma ise hücre içerisinde K^+ iyon konsantrasyonun artmasına, Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarının miktarının azalmasına neden olarak ozmotik dengeyi bozmasıdır. Bor elementinin fonksiyonunun cis-dioller ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Çünkü bor elementi hücre duvarı sentezinde, hücre bölünmesinde, nükleik asit metabolizmasında, oksin/indol asetik asit metabolizmasında, solunumda, gamet oluşumunda ve özellikle de karbonhidrat metabolizmasında etkili olmaktadır. Bor elementinin bitkilerde biriken miktarının %90'ı karbohidratlarla beraber hücre çeperinde lokalize olmaktadır. Bunun sonucu olarak da eksikliğinde ilk olarak gövde ve kök ile yaprak uçlarında bozulmalar görülmektedir [32-34].



Şekil 2.2 Borun Hücre İçerisine Alımı [35].

Bor, bitkilerde difüzyon ve toplu akış yollarını kullanarak hem semplastik hem de apoplastik yollarla hareket edebilir. Bor hücre içerisine 3 temel mekanizma ile girmektedir.

- Lipid tabakasından pasif, çift yönlü difüzyon
- Seçici veya seçici olmayan kanallar aracılığıyla pasif çift yönlü difüzyon
- Kanal proteinleri ve iyon pompalarıyla alım

Borik asit doğrudan pasif difüzyonla ya da aquaporin tipi kanallar vasıtasıyla çift tabakalı lipit zar içerisinde geçerek hücre içine alınmaktadır. Borik asit ve borat anyonları hücresel pH'a bağlı olarak birbirlerine dönüşebilme kabiliyetine sahiptir. Borat anyonunun taşınımı ise elektrokimyasal gradiyent farkını kullanan içe doğru yönlendirilmiş H^+ ve dışa doğru yönlendirilmiş borat H^+ ile antiportırları tarafından gerçekleştirilmektedir. Hem H^+ akışı hem de borat akışı, plazma membranını depolarize edeceğinden ve sitoplazmayı asitleştireceğinden osmotik dengenin korunması için H^+/ATPaz aktivitesi gerekmektedir[35-37].

Bitkiler, bor toksisitesiyle başa çıkabilmek ve hayatsal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için çeşitli moleküler ve biyokimyasal savunma mekanizmalarına

sahiptirler. Köklerden alınan iyonların kontrollü bir şekilde alınımı ve yapraklara taşınması, iyonların hücre içi ve hücreler arası düzeyde uygun dağılımı, membran yapısında meydana gelen değişimler, antioksidan enzimlerin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin regüle edilmesi, fotosentetik yolun değişimi, seçici iyon birikimi bu savunma mekanizmalarını oluşturmaktadır. Temel mekanizma borun bitki içerisinde dağılımın düzenlenmesine dayanmaktadır. Bitki büyümesini ve gelişmesini desteklemek için, bor konsantrasyonu çok düşük seviyelere ulaştığında, bor aktif taşıma yoluyla floeme aktarılarak, hızlı büyüyen meristematik dokulara nakledilmektedir. Borun, floemdeki hareketliliği bitki türleri arasında oldukça büyük farklılıklar içermektedir. Şeker alkolü üreten bitki türlerinde borat, mannitol, sorbitol ve dulsitol gibi şeker alkollerine bağlanabilir ve ortaya çıkan kompleksler, floem yoluyla yaşlı yapraklardan genç yapraklara bor taşınmasının yeniden düzenlenmesine sebep olmaktadır [38, 39].

Gerekli miktarlarda alındığında, eser bir element olan bor elementi, dane büyüklüğü, hücre uzaması, bitki büyüme düzenleyicilerinin üretimi, hücre bölünmesi, polen oluşumu, polen tüplerinin gelişimi, karbonhidrat ve proteinlerin mekanizması ve dane ağırlığı üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Ek olarak, şeker moleküllerinin bitki boyunca taşınmasına izin verdiği ve hücre duvarını oluşturan moleküllerin sentezinde etkin bir şekilde yer aldığı için daha verimli dane oluşumu sağlamaktadır. Bor özellikle Poaceae ailesine ait bitkilerin generatif dönemlerinde etkin rol oynayan bir mikro besleyici elementtir. Tahıl bitkilerinde özellikle generatif dönemde etkin roller üstlenmesi nedeniyle bor elementi noksanlığı çeken bitkiler meyve tutma ve çiçeklenme açısından gerilik yaşamaktadır. Bitkiler soylarının devamlılığını güvence altına almak için bor yoksunluğunda vejetatif gelişmede dormansi haline geçerek üreme faaliyetlerinin gerçekleşmesini indüklemektedir. Ancak bor yoksunluğunda erkek ve dişi gametlerin gelişim süreçleri de zarar gördüğünden döllenme süreci de bor yoksunluğu süresince olumsuz etkilenmektedir [40-42].

Bor noksanlığı semptomları ilk olarak uç sürgünlerde ve şiddetli yoğunlaşmış dallar üzerinde küçük, deforme olmuş yapraklar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Apikal meristemlerin büyümesi durdurulur ve sürgün tepe noktası nekrotik hale gelmektedir. Bor eksikliğinde görülen diğer bir belirgin etki, bitkilerin gövdesinin kırılgan hale gelmesidir. Ayçiçeği, yapraklarda, gövde de ve üreme kısımlarında karakteristik bor

noksanlığı semptomları geliştiren, bor noksanlığına en duyarlı mahsullerden biri olarak bilinmektedir. Bu noksanlık belirtileri ilk olarak bronz renge bürünen ve sertleşen, kusurlu ve nekrotik hale gelen genç yapraklarda belirginleşmekte ve sap mantarlaşmaktadır. Bu durum kötü tohum tutumu ve verimsizlikle sonuçlanmaktadır. Ayçiçeği kökleri, büyüme ortamından borun çıkarılmasından sonra 6 saatten daha kısa bir sürede etkilenmekte ve büyümelerini durdurmaktadır. Bezelyede bor noksanlığı zayıf bir kök sistemi oluşumuna ve yaprağın sertleşmesine neden olmaktadır. Bor eksikliğine maruz kalan soğan bitkilerinde yapraklar kalın, kırılgan, mavi yeşil renkli, sert ve pürüzlü yüzey yapısına sahip olarak gelişmektedir. Karnabahar da orta derecede bor noksanlığı altında benzer semptomlar göstermektedir. Dış yapraklar kalın ve kırılgan, yaprak sapı ve orta kabuğunda ise küçük kabarcıklar ve çatlaklar oluşturmaktadır. Bor eksikliği olan lahana ve karnabahar yapraklarının göze çarpan en önemli özelliği, yapraklarda maviye dönen renk değişimi veren kalın bir epikutiküler mum tabakasını oluşturmasıdır. Marulda, genç yaprakların kenarları yanar ve kıvrılmalar oluşmaktadır. Daha yüksek bitkilerde, bor tükenmesine veya eksikliğine en hızlı tepki hem ana hem de yan köklerde kök uzamasının engellenmesi veya azaltılması olarak bilinmektedir. Domates ve kabak bitkilerinde kök uzamasının inhibisyonu, borun besin çözeltisinden çekilmesinden sonraki 3 saat içerisinde gözlenmektedir [43-47].

Yüksek ticari öneme sahip olan buğday ve arpa gibi çeşitli hububat bitkilerinde bor yoksunluğu neticesinde polen ve anterlerde zayıf gelişim gözlenmektedir. Bunun sonucunda da erkek kısırlığı olarak bilinen durum ortaya çıkmakta ve dane oluşumu engellenmektedir. Borun buğdaydaki üreme gelişimi üzerindeki etkisi spesifiktir. Mayoz öncesi evre en hassas dönemdir. Çünkü daha sonra çiçek kalitesi ve verimi üzerinde etkili olmaktadır. Polen oluşumu, pistil oluşumu ve polen tüpünün uzaması bor konsantrasyonuyla yakından ilişkilidir. Borun üreme organlarındaki karbonhidrat metabolizmasına katıldığı, böylece polen oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bor noksanlığına maruz kalan bitkilerde, yoksunluğa bağlı olarak erkek gametlerinde genotipik farklılıklar ortaya çıkmaktadır [48, 49].

Bölgeler arasında topraktaki bor minerali miktarı da büyük değişikler göstermektedir. Bu yüzden bitkilerin optimal koşullarda büyüyebilmesi için, topraktaki bora olan ihtiyaçları büyük değişiklikler göstermektedir. Hatta aynı türün farklı fideleri için bile

bor elementi eksikliği ve toksisite eşikleri değişkenlik göstermektedir. Bu değişikliğin temel sebebi, strese maruz kalan bitkinin yağış, pH veya nem gibi diğer çevredeki değişkenlerden veya toprak yapısındaki farklılık gibi çevresel etkenlerden de etkilenmektedir. Farlı tür bitkiler arasında çok farklı tolerans düzeyleri olmasına ve çok farklı tepkiler verilmesine rağmen, noksanlığında tüm türlerde benzer etkiler ortaya çıkmaktadır. Toprakta optimal koşulların üstünde bor elementine maruz kalan bitkiler strese girerek hasarlanmakta veya gelişimlerini tamamlayamamaktadır. Ancak bazı bitkiler için bu durum sorun teşkil etmemekte ve gelişimsel süreçlerini etkilememektedir. Bazı bitkiler ortamda bir mikro besleyici fazla bulunduğunda doğal fizyolojik koşullarına devam edebilirler. Hiperakümülatör olarak adlandırılan bu türler, yüksek miktarda mikro besleyici stresine dayanmanın yanı sıra, bu mikro besleyicileri hücrelerinde güvenli bir biçimde saklamanın yollarını da geliştirmişlerdir [50, 51].

Bor elementinin miktarı 1 mM eşiğinin üzerine çıktığında bor toksisitesine bağlı toksik etkiler belirgin bir biçimde gözlenmeye başlamaktadır. Toprakta bor mevcudiyeti, Japonya, Çin, ABD ve Brezilya da dahil olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde sınırlıdır. Bu bölgelerde bor eksikliğinin ana nedeni yüksek yağıştır. Toprak çözeltisindeki bor borik asit olarak bulunur ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle topraktan kolayca süzülerek toprağın alt katmanlarına inmektedir. Aksine, kurak ve yarı kurak bölgelerde, yeraltı suyu kılcal etki ile toprağın üst katmanlarına ulaşır ve buharlaşırken çözünmüş bor minerallerini toprakta bırakmaktadır. Bor açısından zengin yeraltı suyuna sahip bölgelerde, toprağın üst katmanındaki bor konsantrasyonu bitkiler için toksik bir seviyeye ulaşıp ve mahsul verimine büyük ölçüde hasar vermektedir. Güney Avustralya, Mısır, Irak, Ürdün, Libya, Fas, Suriye, Türkiye, Kaliforniya ve Şili, tarım arazilerinde yüksek bor birikmesi sonucunda toksisite sorunları olan bölgeler olarak öne çıkmaktadır. Bu sebeple ülkemizde bor stresine dirençli türler moleküler ve fizyolojik açıdan iyi karakterize edilmeli, bor stresine direnç yolakları aydınlatılmalıdır. Böylelikle elde edilen verilerin tarım bitkilerine de uygulanarak bor stresinin verim üzerindeki olumsuz etkisinin elimine edilebileceği düşünülmektedir [52, 53].

2.1.1. Bor Tolerans Mekanizmaları

Borik asit, sitoplazmik pH'da (yaklaşık 7.0-7.5) zayıf bir asittir. Bor hücre duvarında bulunan pektik polisakkarit ramnogalakturonanları köprüleme kabiliyeti sayesinde hücre duvarının stabilitesi için önem arz etmektedir. Bitkiler için önemli bir element olmasına rağmen noksanlığında veya yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda fitotoksiktir. Bitkiler tuzluluk, kuraklık ve diğer abiyotik stres etmenlerine olduğu gibi bor stresini de tolere edebilmek için bazı mekanizmaları kullanmaktadır. Bor stresini tolere edebilmek için bitkiler;

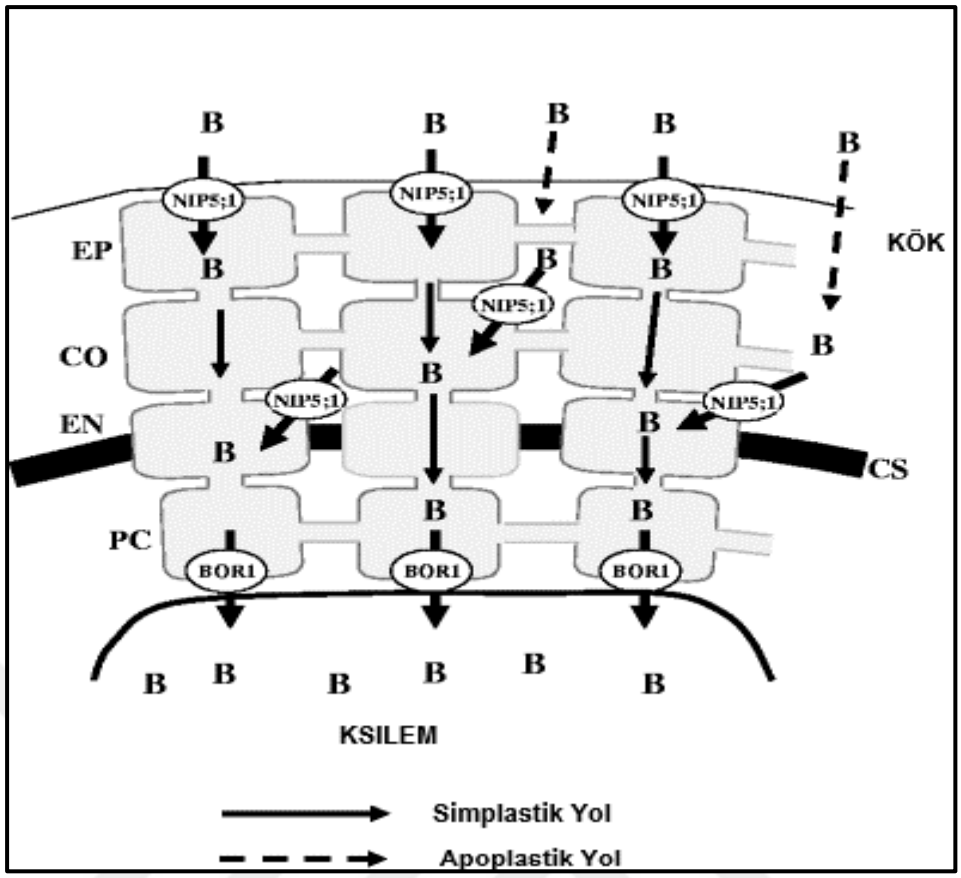
- Kökten bor alımının proteinler aracılığıyla düzenlenmesi
- Polialkollerin ve fenolik bileşiklerin sentezinin arttırılması
- Serbest borun organeller ve vakuoller içerisinde biriktirilmesi
- Antioksidan moleküller yardımıyla ortaya çıkan oksidatif stresle mücadele mekanizmalarını kullanmaktadır.

Bor elementinin bitki boyunca taşınımı, bitki buharlaşma yoluyla su kaybettikçe bitkinin üst kısımlarına doğru ksilemler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Terleme olgun yapraklarda genç yapraklara oranla daha yüksek seviyelerde gerçekleşmektedir. Bor son taşınım yeri olan yaprak uçlarında, yaşlı dokularda veya meyve gibi organlarda birikmektedir. Ayrıca diğer mikro besleyicilerin yanı sıra bor elementinin bitkide taşınımı ilginç bir şekilde bitki türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Borik asit, yüksüz bir moleküldür ve memranlardan geçme kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle toprakta yeterli konsantrasyonlarda bulunduğunda pasif difüzyon ile alınarak taşınmaktadır. Ancak borik asit konsantrasyonu kritik düzeylere indiğinde, borun taşınması için major intrinsink protein (MIP) kanallarını veya borat pompalarını (BOR) kullanmaktadır. Bitkiler yüksek bor konsantrasyonu altında da borat pompalarını kullanmaktadırlar. BOR ailesi, anyon taşıyıcılarına benzer bir moleküler yapıya sahiptir ve benzer şekilde negatif membran potansiyeli tarafından yönlendirilen borat anyon uniporterleri olarak işlev göstermektedirler. Apoplasttaki düşük pH nedeniyle, borat anyonu hızla yüksüz borik aside dönüştürülür ve böylece BOR' lar hızla artan bir borik asit gradiyenti oluşturarak katyon konsantrasyonunu arttırmaktadır. Her iki tip bor taşıyıcısı da optimal olmayan koşullar altında köklerin bor alımına rol oynamaktadır [30, 54, 55].

MIP'ler, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yüksüz su ve borik asit molekülleri için kanal görevi gören plazma membran proteinleridir. Bitkilerdeki MIP süper ailesi, nodulin-26 benzeri intrinsik proteinler (NIP), plazma membran intrinsik proteinleri (PIP), küçük bazik intrinsik proteinler (SIP), tonoplast intrinsik proteinler (TIP) ve karakterize edilmemiş X- intrinsik proteinleri (XIP) olmak üzere farklı görevleri üstlenen beş alt aileye ayrılmaktadır. Bazı MIP üyeleri, hücrelere kolaylaştırılmış difüzyonla bor akışını sağlayan borik asit kanallarıdır. NIP'ler de akuaporinleri içeren MIP süper ailesine dahildir. NIP'ler su, üre, borik asit, gliserol, laktik asit ve silisik asit gibi yüksüz molekülleri taşıyabilmektedir. *Arabidopsis*' de NIP5;1 ve NIP6;1 plazma membranında lokalize olan ve bor taşınmasında görevli iki kanal proteinidir. NIP5;1 kök hücrelerinde borun hücre içerisine ilk alımı sürecinde yer almaktadır. NIP6;1 ise genç dokularda borun ksilem-floem transferi arasındaki dengede rol almaktadır. NIP6; 1, yapısal olarak NIP5; 1'e benzer ve çoğu zaman NIP5; 1 gibi davranır; ancak NIP6; 1 bir aquaporin olarak görev yapamamaktadır. Plazma membranı İç Proteinleri de (PIP'lerin) bor taşınımına aracılık ederek bor toleransının arttırılmasında rol oynamaktadır. PIP'ler yüksek bor konsantrasyonları altında osmotik dengenin korunabilmesi için plasma membranından borun dışarı atımında görev yapmaktadır. Geçtiğimiz 5 yıl içersisnde yapılan çalışmalara göre, *Oryza sativa'*da iki PIP, OsPIP1; 3 ve OsPIP2; 6 çift yönlü bor taşıyıcıları olarak işlev görmekte ve *Arabidopsis thaliana*' da aşırı eksprese edildiği zaman arttırılmış bir bor toleransı sağlamaktadır. Tonoplast intrinsik proteinlerinin de bor toleransı ve taşınımında önemli olduğu gösterilmiştir. AtTIP5; 1'in hem *Arabidopsis* yaprak mezofil hücre protoplastlarında hem de *Nicotiania benthamiana* yaprak dokularında tonoplast membranında lokalize olduğu ve bor toleransında rol oynadığı bilinmektedir. [55-58].

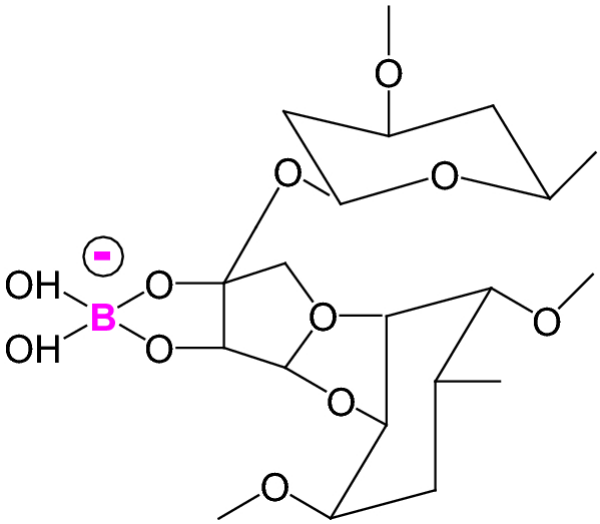
BOR1 esas olarak ksileme yakın kök perisikl hücrelerinde eksprese edilmektedir. BOR1, borun ksileme yüklenmesi işlemlerinde önemli rol oynayan bir bor taşıyıcısıdır. *A. thaliana* BOR1-1 mutantının yabanıl tipe göre bor noksanlığına çok daha hassas olduğu bilinmektedir. NIP5; 1 mutantlarında hem sürgün hem de köklerde büyüme gecikmesi ve azalmış bor birikimi görülmesine rağmen BOR1- 1 mutantlarında sadece sürgün dokularında büyümenin azalması ve azalmış bor birikimi gözlemlenmektedir. BOR1, üç ana sınıfa ayrılan çözünen taşıyıcı 4 (SLC4) süper ailesinin bir üyesidir. SLC4 süper ailesi, anyon değiştiriciler (AE), sodyum bağlı bikarbonat taşıyıcılar

(NCBT) ve bor taşıyıcıları (BOR) ailelerini barındırmaktadır. *A. thaliana*' da borik asit taşınmasında görev yapan AtBOR1 düşük bor konsantrasyonları altında köklerden sürgünlere bor alımını ve borun ksileme taşınımını gerçekleştirmektedir. Düşük bor konsantrasyonlarında, BOR1 esas olarak hücre membranın da lokalize olmaktadır. Yüksek konsantrasyonda ise, BOR1 hücre içerisine bor alımını stimüle etmeye devam ederek osmotik dengeyi bozmaktadır. BOR1 toksik bor seviyesi altında bitki büyümesine negatif etki oluşturacağı için reseptör aracılı endositozla erken endozomlarla birleşmekte ve hücre içerisinde sindirilmektedir. BOR1'in bor konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak gerçekleştirdiği bu bozunma, toprakta yüksek bor konsantrasyonları mevcut olduğunda bitkinin toprak üstü kısımlarında fazladan bor birikimini önlemesine izin verdiği için bitkiler için önemli bir tolerans mekanizmasıdır. Yine BOR ailesinin üyesi BOR4 pompası ise, borun ksilemde ve genç dokularda birikmesini önlemek amacıyla borun köklerden toprağa salınmasında görev yapmaktadır. HvBOR2, BOR7 ve BOR4'ün hücre içerisinde toksik etki oluşturacak boru dışarı vermesi, bitkinin sağ kalımı için en önemli mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır [52, 59].



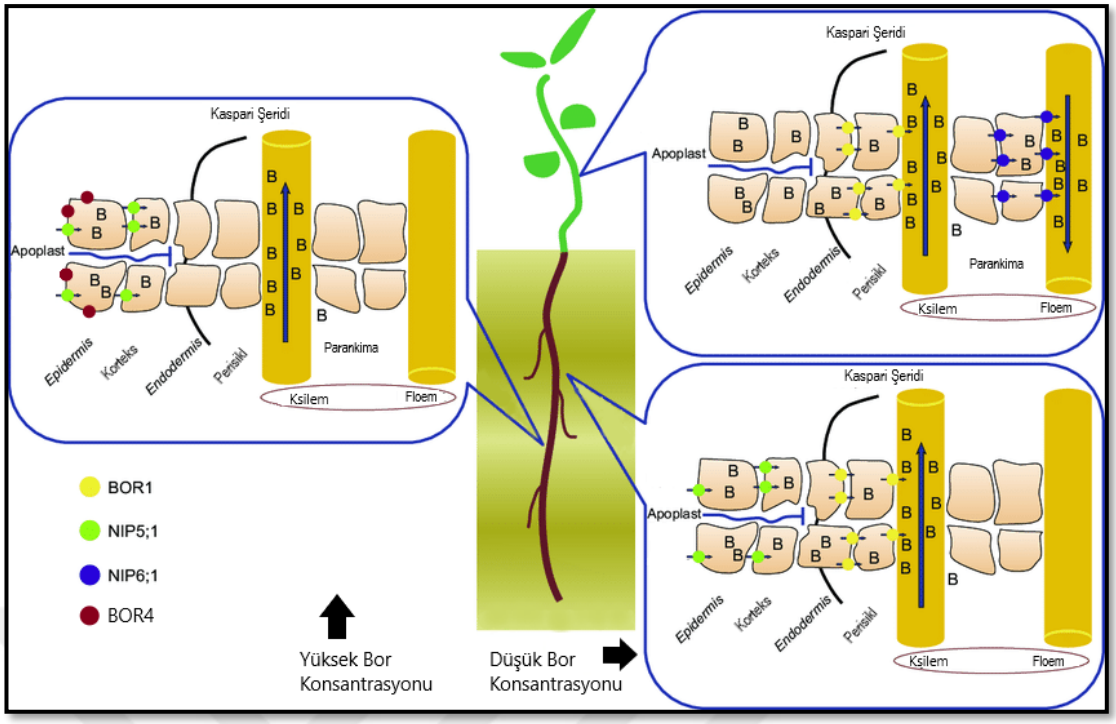
Şekil 2.3 Borun MIP kanalları ve BOR pompalarıyla topraktan alınıp ksileme aktarımı, EP: Epidermidis, CO: Korteks, EN: Endodermis, PC: Perisikl [52].

Floem hareketi olmaksızın, bor taşınımı sonrasında yaşlı dokularda birikmesi gerekmektedir. Ancak bazı bitki türlerinde bor, tüm bitki içinde eşit seviyelerde veya genç dokularda olgun dokulara oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu, borun bazı bitki türlerinde floem boyunca hareket etme kabiliyetinin sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Genellikle, sükroz yerine kullanılan mannitol ve sorbitol gibi şeker alkollerini yüksek oranda üretme kapasitesine sahip olan bitkiler bor eksikliğine karşı yüksek oranda tolerans sağlamaktadır. Sorbitol, mannitol ve cis-hidroksil grupları, borik asit kaynaklı diol-B komplekslerine kolaylıkla bağlanarak stabil bir poliol-B kompleksi oluşturmaktadır. Bor floem yoluyla işte bu poliol-B kompleksleri aracılığıyla taşınmaktadır [60, 61].



Şekil 2.4 Floem'deki Sorbitol İçeren Bor Kompleksi [2].

Bitki türlerine bağlı olarak farklı şekerler, şeker alkolleri ve amino asitler stres koşulları altında hücre içerisinde birikmekte ve bitkilerin tolerans mekanizmalarında önemli roller oynamaktadır. Şeker alkolleri osmotik dengenin stabilizasyonunda ve ROS (Reaktif oksijen türevi), hidroksil radikallerine karşı antioksidan aktivite göstererek strese karşı yanıtta rol almaktadır. İnositol, pektin, hemiselülozlar ve bitki hücre duvarlarındaki ilgili yapıların üronosil ve pentosil birimlerinin biyogenezinde de rol oynayan bir şeker alkoldür. *Puccinellia distans*'ta bor stresi altında inositol taşıyıcı 2 (INT2) genin anlatımı artmaktadır. Bu taşıyıcının artan ekspresyonuna bağlı olarak, inositol seviyesini arttırmakta ve ROS ve şelatlanmış borun hücre dışına atılarak tolereans sağlanmaktadır [62, 63].



Şekil 2.5 Borun Organizma boyunca Taşınımı ve Bor Kanalllarının Bitki Dokularındaki Dağılımı [63].

2.2. TUZ STRESİ

Tuzluluk, doğal süreçler (birincil tuzlanma) veya antropojenik etkiler (ikincil tuzlanma) nedeniyle toprak ve sudaki toplam çözünmüş tuzların konsantrasyonunun artışına bağlı olarak görülen ve verimi doğrudan etkileyen bir olaydır. Tuzluluk sırasıyla, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek sodyum katyonu (Na^+) konsantrasyonu ve yüksek pH (yüksek Cl^-, Mg^{2+}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}) olarak tanımlanan tuzlu, sodalı ve alkali toprakları içeren bir terimdir. Sodyum klorür (NaCl) doğada en fazla kontaminasyonuna rastlanılan tuz forumudur ancak tuzluluk sadece Na^+ iyon konsantrasyonuna bağlı değildir. Bunun yanı sıra çeşitli sülfatlar, klorürler, bikarbonatlar, boratlar ve karbonatlar da doğada bulunan diğer tuz formları da etki etmektedirler. Tuzluluk stresine genellikle NaCl varlığı hâkim olurken, diğer iyonlar da stres seviyesine katkıda bulunmaktadır. Toksisite etkileri farklı iyonlar ve iyon kombinasyonları arasında değişiklik göstermektedir [64, 65].

İnorganik iyonlar genellikle rekabetçi enzim inhibitörleri olarak işlev görmektedir, fakat aynı zamanda proteinlerin yüzeylerindeki yüklerine müdahale ederek, moleküler etkileşimleri dengesizleştirmektedir. Örneğin Na^+, K^+ 'ı esas bağlanma yerlerinden

uzaklaştırarak oluşan boşluğa kendisi bağlanmaktadır. Metabolizmada K^+ iyonuna bağımlılığı en iyi bilinen iki örnek piruvat kinaz ve ribozomlardır. Piruvat kinazın aktivitesi, K^+ varlığında 400 kat artmaktadır. K^+ yerine Na^+ ile çok daha yavaş çalışmaktadır. Ökaryotik ribozomların peptidil transferaz aktivitesi yüksek K^+ konsantrasyonuyla yakından ilişkilidir. K^+ konsantrasyonu düşer ve Na^+ konsantrasyonu artarsa, bu tür inhibitör süreçler redoks ve enerji metabolizması dahil olmak üzere birçok metabolik süreçte dengesizliklere ve hatta işlev kayıplarına neden olmaktadır [65, 66].

Tuzluluk primer veya sekonder tuzluluk olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelebilmektedir. Özetle insan kaynaklı faaliyetler ve doğal faktörlerden kaynaklananlar olarak birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Primer tuzluluğa sebep olan etmenler kayalarda meydana gelen ayrışmalar, iklimsel değişimler veya tuz deposu olarak kabul edilebilecek olan okyanuslardır. İkincil tuzlanma, sulama suyu için tuzlu yeraltı suyu kullanımı, kalitesiz atık su kullanımı ile doğal mikroçevreyi bozarak arazilerin tuzlu bileşiklerle kontaminasyonu, mera ve mahsul üretimi için derin köklü orman alanlarının tarım arazisine çevrilmesi yada tahrip edilmesi ise sekonder tuzluluk olarak kabul edilmektedir [67, 68].

Toprak tuzluluğu, tarımda bitki büyümesini sınırlayan ve dünya genelinde ürün verimliliğinde kayıplara neden olan önemli bir sorundur. Tuzluluğun neden olduğu olumsuzluklardan, dünyadaki ekili arazilerin yaklaşık 5'te 1'i ve sulanan arazilerin yarısı etkilenmektedir. Aynı zamanda, tatlı su kıtlığı nedeniyle tuzlu suyun tarımda kullanımı giderek artmakta ve büyük sorunlar oluşturmaktadır. Dünya insan nüfusunun 2050 yılına kadar 9,1 milyar seviyesine ulaşması beklenmektedir ve bu zamana kadar küresel gıda üretiminin bu nüfus artışını karşılayabilmesi için yaklaşık %60 oranında arttırılması gerekmektedir. Ancak öngörülen teknolojik gelişmeler ışığında bile artan ihtiyacın karşılanması mümkün görünmemektedir. Sonuç olarak, tuzdan etkilenen alanlar sürekli yanlış sulama ve gübreleme yüzünden artmakta ve her yıl önemli miktarda ekilebilir arazi tarım yapılamayacak hale getirilmektedir [69, 70].

Tuzluluk bütün dünya genelinde toprakları etkileyerek verimsizleştiren ya da tarıma elverişsiz hale getiren en büyük sorunlardan birini oluşturmaktadır. Ülkemizde tuzluluk sorunu, kurak ve sıcak iklim koşulları, tarımsal alan ve peyzaj uygulama

hatalarına bağlı olarak oluşan drenaj probleminin yaşandığı alanlarda ve düşük yağış miktarı alan alanlarda ortaya çıkmaktadır. Böylece kullanılabilir tarım arazilerinin miktarı ve yıllık üretim hacmimiz giderek azalmaktadır Bununla birlikte, tuzlanmadan etkilenen sadece ekonomik olarak gelişmemiş ülkeler değildir: ekonomik olarak iyi gelişmiş ülkeler de, ikincil tuzlanmaya daha bilinçli önlemler alsalarda birincil yani doğal kaynaklı toprak tuzlanmasından etkilenmektedirler [71].

Tuz stresi bitkilerde meydana getirdiği morfolojik bozuklukların yanında metabolik aktivitelerinde de birçok aksaklık ve hasar oluşmasına neden olmaktadır. Tuz stresi ayrıca yaprakların, gövdelerin ve köklerin taze ve kuru ağırlıklarında önemli bir azalmaya da neden olmaktadır. Bitkiler sahip oldukları tolerans derecesinde tuz stresinden etkilenmekte, bazıları gelişimini etkilenmeden devam ettirirken bazıları, klorosise uğrayarak, bazıları büyüme inhibisyonuna uğrayarak bazıları ise verim ve kalite kayıplarına uğrayarak tepki vermektedir. Tuz stresine bağlı olarak semptomların ortaya çıkmasının en önemli sebebi kökün topraktaki yüksek osmotik kuvvete karşı yenilerek su alımında yetersiz kalması ve fizyolojik kuraklığın gerçekleşmesidir. Buna bağlı olarak düşük turgor basıncı ve bitki hücrelerindeki iyon konsantrasyonunda artmalar meydana gelmektedir. Yoğun tuz stresine maruz kalan bitkilerde bir dizi azot içeren bileşik (NCC) birikir. En sık biriken NCC' ler, aminoasitler, amidler, proteinleri, kuaterner amonyum bileşiklerini ve poliaminleri içermektedir. Tuzlu ortamlarda biriken spesifik NCC' ler, bitki türlerine göre değişiklik göstermekle birlikte en sık rastlanan prolin aminoasitidir. Ozmotik dengenin korunması, hücresel makromoleküllerin depolanması ve korunması, azotun hücre içerisinde depolanması, sitosolik pH'ın korunması, hücrelerin detoksifikasyonu ve serbest radikallerin atılması, bu bileşiklerin stres koşulları altında en temel işlevleri olarak ortaya çıkmaktadır. Aşırı tuz alımına bağlı olarak gerçekleşen bu değişimlerin sonucunda da bitki büyüme düzenleyicilerinde dengesizlikler, stoma açılış-kapanış mekanizmasında bozukluklar, CO_2 asimilasyonunda bozukluklar ve transpirasyonun inhibisyonu gibi çeşitli sorunlar oluşur ve büyüme ile gelişmeye ket vurulmaktadır [72-74].

Toprağın ya da suyun elektrik iletkenliğinden bahsedilirken elektriksel iletkenlik (EC, dSm^{-1}) değeri biçiminde ölçülmektedir. Bitkilerin yaşamı için optimal EC değeri genellikle 0-2 dSm^{-1} arasındadır ve ekstrem hassas türler için stres faktörüne dönüşmektedir. 4-8 dSm^{-1} aralığında tolerant olmayan bitkiler için toksik etki

oluşturmaya başlamaktadır. 8-16 dSm^{-1} aralığında halofitler hariç diğer bitkiler için toksik etki oluşturmaktadır. EC 16 dSm^{-1} üzerinde ise sadece ekstrem halofilik bitkiler yaşayabilmektedir. Pamuk, arpa ve şeker pancarı oldukça toleranslıdır ve yüksek değerlerde etkilenmeden gelişimini sürdürebilmektedir, ancak tatlı patates, buğday ve mısır yüksek hassasiyet göstermektedir EC değeri 2'nin üzerinde ise büyüme inhibisyonu gerçekleştirmektedir. Biyokimyasal veya fizyolojik süreçlerde meydana gelen bu inhibisyon, metabolik süreçlerde ve hücre sinyalizasyonunda birçok dengesizliğe neden olarak, hücre redoksuna ve temel olarak enerji metabolizmasında hasarlanma oluşturan reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmaktadır [75-77].

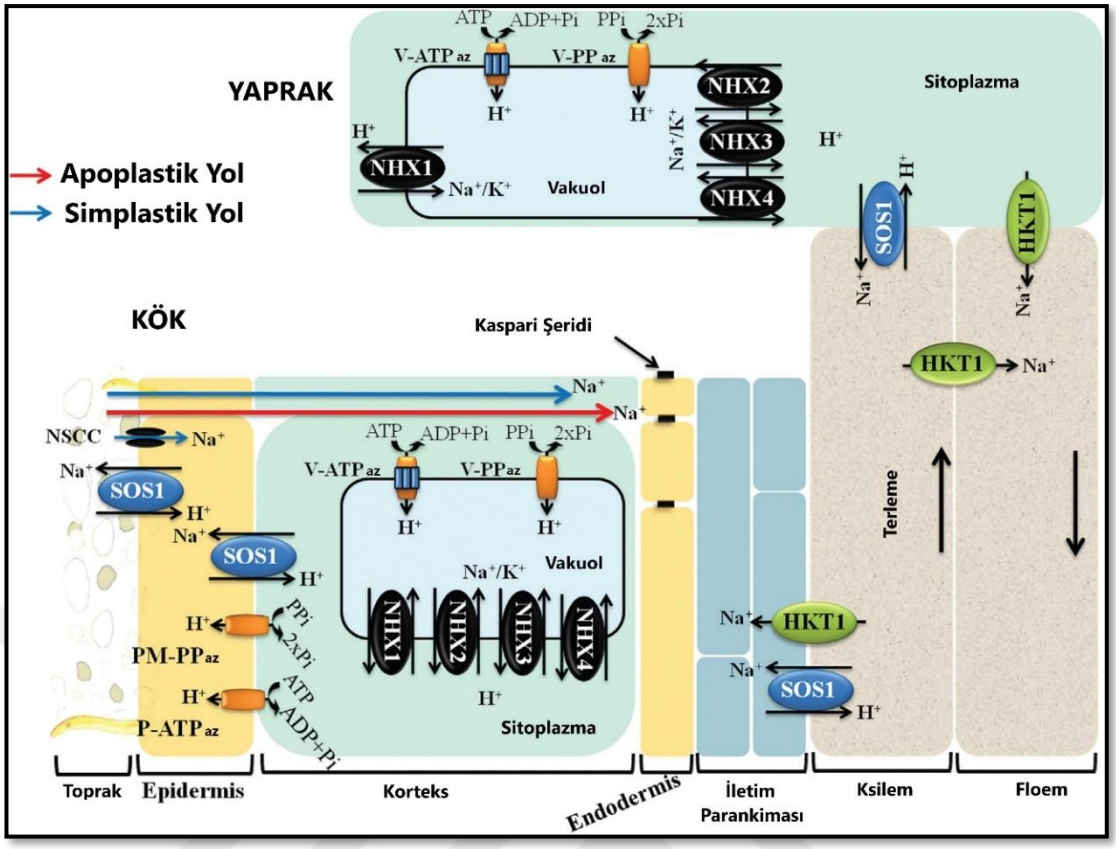
2.2.1. Tuz Stresi Tolerans Mekanizmaları

Bitkilerin stresle başa çıkmak için çok sayıda tolerans mekanizmalarını kullandıkları bilinmektedir. Tuzluluk stresi ile başa çıkmak için bitkiler kökten iyon alımının durdurulması, alınan iyonların hücre içerisinden uzaklaştırılması veya vesiküller ve organeller içerisinde depolanması mekanizmalarını kullanmaktadır. Tuzluluk stresi temel olarak, iyon toksisitesi, ozmotik stres ve oksidatif streste dengesizliklere neden olarak bitkinin metabolik aktivitelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bitkiler metabolik aktivitesinin normal şekilde sürdürülmesi için hücre turgorunu korumak zorundadır. Gelişmiş bitkiler, hücre içerisindeki ozmotik dengeyi sağlamak için prolin, çözünür şekerler, glisin, betain ve diğer ozmolitleri kullanmaktadır. Prolin aminoasiti, önemli bir ozmoprotektan molekül olarak, düşük moleküler ağırlığa, yüksek çözünürlüğe sahiptir. Fizyolojik pH aralığında yüksüz halde bulunmaktadır. Bitki hücreleri, tuz stresinin neden olduğu ozmotik stresi hafifletmek ve topraktan su çekebilmek için yüksek çözünürlüklü ozmoprotektan molekülleri hücre içerisinde biriktirerek hücre içerisini yoğunlaştırmaktadır [78-80].

Topraktan suyla birlikte alınan tuz molekülleri hücre içerisindeki iyon dengesinde düzensizliklere neden olmaktadır. Hücrenin metabolik aktivitelerinin devamlılığının sağlanabilmesi için toksik etki oluşturan aşırı Na^+ ve Cl^- iyonlarının kontrol altına alınması gerekmektedir. Bitkilerin normal aktivitelerini gerçekleştirebilmesi için sitosol içerisinde yüksek bir K^+ / Na^+ oranı sağlamasıyla gerçekleşmektedir. Bu oranın yüksek tutulabilmesi tuz stresinin tolere edilebilmesi için önem arz etmektedir. Tuz stresine bağlı olarak, hücre içerisine yüksek miktarda Na^+ iyonu girişi gerçekleşir ve bu durum sitozolde iyon toksisitesine neden olmaktadır. Sitozol içerisinde yüksek Na^+

oranı enzim aktiviteleri, fotosentez ve metabolizma üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle bitkiler için son derece toksiktir. Aşırı Na^+ girişine bağlı olarak hücrelerde K^+ miktarı azalarak homoastazi bozulmaktadır. Kök hücrelerinin plazma membranındaki bulunan düşük membran potansiyeli, Na^+ iyonunun hücre içerisine pasif olarak taşınmasına neden olmaktadır. Na^+ iyonunun hücre dışına taşınması ise pasif değildir ve iyon kanalları sayesinde enerji harcanarak gerçekleşmektedir. Na^+ hücre içerisine HKT (yüksek afiniteli K^+ kanalları), LCT (düşük afiniteli katyon kanalları) ve NSCC kanallarıyla da alınmaktadır [17, 81, 82].

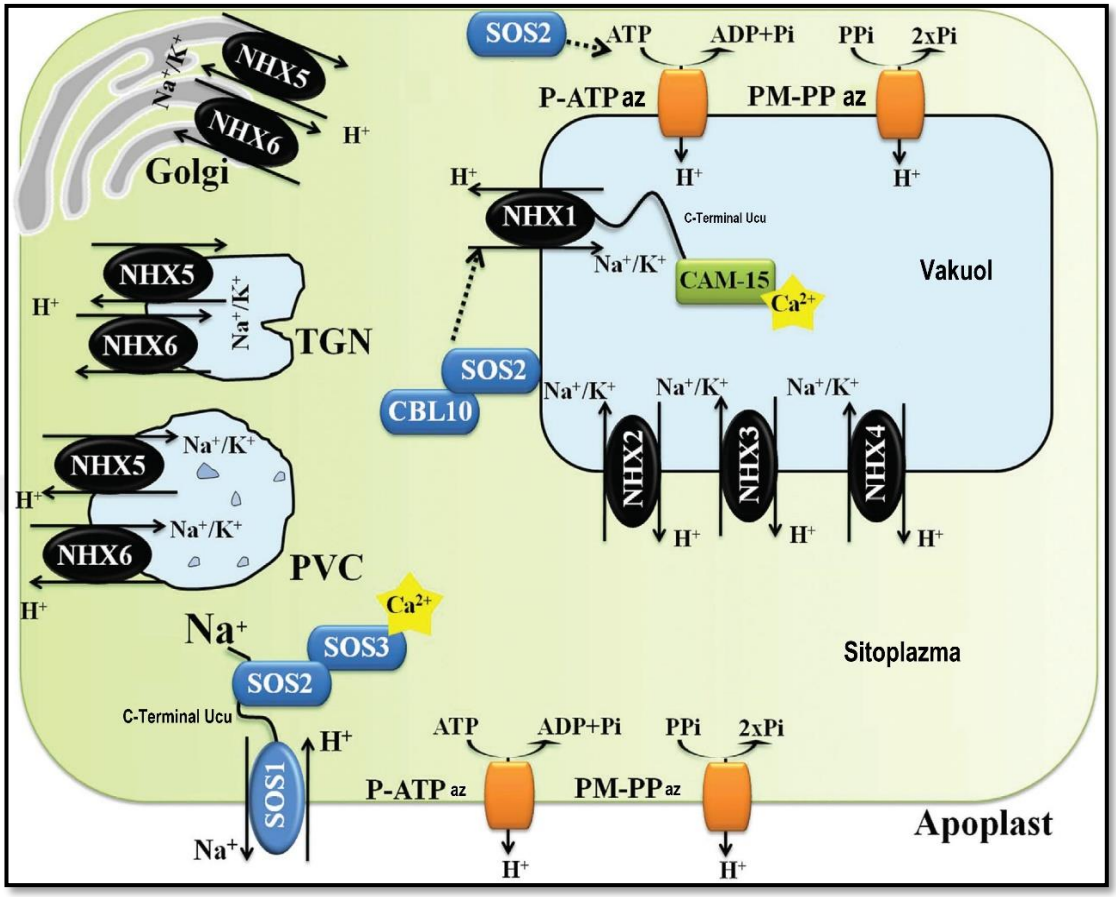
Hayvan hücrelerinde bulunanın aksine, bitkilerde Na^+-ATPaz veya K^+/ Na^+-ATPazları bulunmamaktadır ve Na iyonunun hücre dışına atılması için H^+-ATPaz ve H^+-pirofosfatazlar (PPaz) tarafından gerçekleştirilmektedir. Plazma zarına lokalize halde bulunan SOS1 ve vakuol membran lokalize NHX kanalları, Na^+/ H^+ antiporterları olarak görev yapmaktadır. SOS1 Na^+ iyonlarının hücre içerisinden uzaklaştırılmasında görev almaktadır. NHX kanalları ise Na^+ vakuol içine pompalanarak iyon dengesinin korunmasında görev almaktadır. Farklı NHX kanalları farklı organel ve dokular üzerinde farklı görevler üstlenmektedir. HKT1 ailesinin üyeleri Na^+'' nun ksilemden dışarı atılarak kök hücreleri tarafından yeniden emilmesini gerçekleştirmektedir. Böylece Na^+''un uzun mesafeli taşınmanın engellenmesini sağlayarak yer üstü dokularda Na^+''un yüksek konsantrasyonlarda birikimini önlemektedir. HKT2 ailesinin üyeleri ise köklere Na^+ alımında görev yapmaktadır [17, 80, 83, 84].



Şekil 2.6 Tuz Stresinin Tolerans Mekanizmaları [17].

SOS1' in Na^+/H^+ antiport aktivitesinin aktivasyonu SOS3 ve SOS2 tarafından kontrol edilmektedir. Yüksek Na^+ konsantrasyonu gibi uyaranlara yanıt olarak sitoplazmaya organeller ve vesiküller içerisinden Ca^{2+} iyonu akışı gerçekleşmektedir. Sitosolik Ca^{2+}'un bu geçici artışı, kalsinörin B benzeri protein (CBL) ve nöronal Ca^{2+} sensör benzeri proteini SOS3 tarafından algılanmaktadır. HKT1 ve NSCC'ler artan sitosolik Ca^{+2} tarafından hızlıca bloke edilerek hücre içerisine Na^+ alımı durdurulmaktadır. Artan Ca^{2+} SOS3'ü uyararak aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktif SOS3, SOS2'nin oto-inhibitör alanı ile fiziksel olarak etkileşmektedir. SOS2-SOS3 kompleksinin oluşumuyla kinaz aktivitesine kavuşan SOS2, Na^+'yı hücreden dışarı pompalayan SOS1'in C-terminal ucunu fosforilleyerek Na^+/H^+ antiporterını aktifleştirmektedir. SOS1'in aktivasyonuyla beraber sitoplazmada birikerek zararlı etki oluşturacak Na^+ iyonları hücre dışına aktarılmaktadır. Yine SOS2 aktivasyonuna bağlı olarak aktifleşen NHX kanalları da Na^+'yı vakuoller içerisine pompalayarak iyonik dengenin korunmasını sağlamaktadır. Na^+/H^+ antiporterları, hücre için toksik etki yaratabilecek iyonların vakuolde depolanması veya sitozolden dışarı atılması için

kullandıkları enerjiyi, H^+ pompalarının oluşturduğu gradiyent sırasında açığa çıkan fosfat bağının serbest enerjisinden sağlamaktadır [78, 85-87].



Şekil 2.7 Tuz stesi altında SOS Kanallarının Hücresel Dağılımı,Trans-Golgi ağı (TGN) ve prevakuolar bölme (PVC) [17].

Bitkiler tuz stresi sonucunda ortaya çıkan ROS' ların zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için en etkin savunma mekanizması olan antioksidan sistemlerini kullanmaktadır. ROS' lar karbonil türevleri oluşturmak için proteinlerdeki amino asit rezidülerine (Tyr, Phe, Trp, Met ve Cys) saldırarak konformasyonel değişikliklerine ve işlev kayıplarına neden olmaktadır. Antioksidanlar, reaktif oksijen türevlerinin oluşmasını engellemek ve eğer oluştuysa da hücre içerisinde meydana getirdiği hasarı en aza indirmek üzere özel görevler üstlenmektedir. Antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılırken kendi aralarında da enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon-S-transferaz (GST) en sık karşılaşılan enzimatik

antioksdanlardır. Antioksidan enzimlere ek olarak, askorbik asit (ASH), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkaloidler, protein olmayan amino asitler, alfa tokoferol ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde rol oynamaktadır [87, 88].

2.3. Puccinellia distans

Puccinellia distans (Jacq.) Parl., Poaceae familyasının, Poaideae alt familyasına ve *Puccinellia Parl*. cinsinin elemanı olan bir türdür (Şekil 2.8). Poaideae (Buğdaygiller) alt familyası içerisinde birçok çim ve otsu bitkinin yanında, günlük diyetimizin önemli bir kısmını oluşturan buğday, arpa, çavdar gibi önemli bitkileri de bünyesinde bulundurmaktadır. Yaklaşık olarak 100'den fazla farklı türü olan *Puccinellia*, çim türleri arasında büyük bir çoğunluğu oluşturmaktadır. *Puccinellia* cinsine ait *Puccinellia distans* Türkiye'de çorak çimi olarak isimlendirilmektedir ve genel olarak hem kara hem de kıyı kesimlerde tuzlu ve borlu alanlarda yetişmektedir. Tuz ve bor elementine karşı direncinin evrimsel süreçte yetişme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Büyümek için genellikle gölge ve yarı gölge alanları tercih etmektedir. Toprak tercihi ise nemli ıslak ve hafif kumlu topraklardır. Özellikle çimlenme evresinde nem ihtiyacı yüksektir. Haziran, Temmuz gibi yaz aylarında çiçeklenen *Puccinellia* bitkisi dişi ve erkek organları bir arada bulunduran hermafrodit bir türdür ve rüzgârın polenlerini havada uçurarak taşıması yoluyla tozlaşmaktadır. *P. distans*, rüzgâr, trafik akışı ve hatta potansiyel olarak arabalara yapışmış çamurda dahil olmak üzere farklı yöntemlerle dünyaya dağılmıştır. *Puccinellia* bitkisi genel olarak kuzey yarım küre bölgelerine yayılım göstermiştir ancak bazı türleri Afrika, Avusturalya ve Güney Amerika kıtalarının yüksek bölgelerinde gözlemlenmektedir. Genel olarak yüksek alanları tercih etmektedir. *P. distans*'ın ABD ekotipi, 20-30 cm yüksekliğe kadar büyüyen ve Kuzey Amerika'da hem tuzlu hem de kurak ortamlarda yaygın olan çok yıllık bir halofittir. Bu bölgelerdeki *Puccinellia* bitkileri geniş alanları kaplayan toplu bir yayılış düzeni göstermektedir. Ancak güney bölgelerde birbirinden uzak küçük kümeleşmeler halinde kopuk bir dağılım sergilemektedir. *Puccinelli*a bitkisinin toprak üzerindeki gövde boyutu ortalama olarak 0,7-0,8 m aralığındadır. Kökleri ise saçak kök biçimindedir ancak çorak ve kurak bölgelerde suya ulaşmak amacıyla 6 ile 7 metre derinliğe kadar inebilmektedir [89-92].

Şekil 2.8 *Puccinellia distans (Jacq.) Parl.*[93].

Puccinellia bitkisinin gövdesi toprağa yakın olan boğumlarından yüksek miktarda kardeşlenip yumaklar oluşturur. Her bir boğumdan yeni bir yaprak çıkar ve yeni yapraklar gövde üzerinde düzenli bir şekilde dizilmektedir. Yaprakların aya bölgeleri kayık ve küt biçimindedir. Başakçıkları ise birbirine eşit boyutlarda olmayan sap bölgeleri ile salkımların eksenlerine birleşmiştir. İngilizce' de Alkaligrass olarak bilinen *Puccinellia distans (Jacq.)* çorak çimi olarak bilinen tüm çimlerin içerisindeki en yüksek tuz direnci gösteren türdür. Bununla birlikte, bugüne kadar bulunan en yüksek bor toleransı Türk ekotipinde görülmektedir. Bu tür, hidroponik kültürde 1250 mg B/L'yi ve canlı sürgünlerinde 6000 mg B/kg tolere edebilmektedir. *Puccinellia frigida* da sürgünlerinde yaklaşık 4000 mg kg^{-1} birikimini sağlayabilen bir diğer önemli bir *puccinellia* türü olarak karşımıza çıkmaktadır. *P. distans*' ın yaşam döngüsünü tamamlamak için yüksek konsantrasyonda tuz gerekmemektedir ve fakültatif halofitler olarak da isimlendirilebilmektedir. *P. distans* bitkisinin tarımı besinsel değerleri düşük olması sebebiyle yapılmamaktadır ancak *Puccinellia ciliata* ve *Puccinellia maritima* türlerinin ekstrem tuzlu alanlarda bile tarımı yapılmaktadır ve bu türler 10-40 dSm^{-1} oranında tuz içeren topraklarda bile ve hatta kurak alanlarda verim kaybetmeden yetişebilmektedir. *P. maritima* ile *P. ciliata*' nın tarımı genel

olarak Avusturalya kıtasının batısında yer alan tuzlu bölgelerde gerçekleştirilmektedir. Optimum büyüme koşullarında yaklaşık olarak %10 ile %18 arasında ihtiva ettiği protein miktarı, tuzlu bölgelerde yetiştiği takdirde %5'lere kadar düşebilmektedir. Bitkinin %60 ile %78 arasında olan sindirilebilirdik oranı ise tuzlu bölgelerde yetişmesine bağlı olarak %50'ye kadar düşmektedir. Söz konusu bitki için verim her bir hektar için 3 ile 8-ton aralığındadır. Bor stresine, tuzluluğa ve kuraklığa dirençli olması özellikleriyle bilimsel olarak önem vaat eden bir tür olmasına rağmen *Puccinellia* bitkilerinde yapılan araştırmalar hala sınırlıdır [94-96].

P. distans, kök hücrelerinin plazma zarında bulunan bazı düşük afiniteli K^+ taşıyıcılarının yüksek K^+ / Na^+ seçiciliği sayesinde, yüksek tuz toleransı sayesinde topraktan beslenmesi sağlanabilmektedir. Onların varlığı yüksek Na^+ hücre ortamında bile bitkinin sitozol içerisinde yüksek K^+ ve düşük Na^+ oranını korumasını sağlamaktadır. Endodermisdeki kaspari şeridi, Na^+ iyonunun hücre içerisine girişinin apoplastik yolunu bloke ederek engellemektedir. Na^+, endodermisin hücreler arası boşluğuna dağıtılıp birikirken K^+, ozmotik regülasyondaki görevlerini devam ettirebilmesi için hücrelerde ve ksilemde konsantre edilmektedir. K^+ ve Na^+'' nın asimetrik dağılımı, endodermal hücrelerin bariyer ve filtrasyon fonksiyonlarını gösteren özelleşmiş kanal proteinlerinin varlığı sayesinde gerçekleşmektedir [97].

Monokotillerin büyük bir çoğunluğu tuzluluğa karşı oldukça duyarlı glikofitler grubunun üyeleridir. Bu yüzden monokotil bitkilerde tuz ve bor toleransını sağlayan moleküler mekanizmaların temelleri incelenmek istediğinde, iyi karakterize edilmiş model bir bitkinin eksikliği karşımıza çıkmaktadır. Diğer hassas monokotil buğdaygillerin aksine *P. distans*, ekstrem bor ve tuz toleransı gösteren bor hiperakümülatör bir halofittir. Bu özelliği sayesinde *P. distans* besin değeri ve üretim hacmi yüksek olan diğer buğdaygillerin hassasiyetinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. *P. distans*'ın tolerans mekanizmasını iyi anlaşılmasıyla birlikte, yakın gelecekte transgenik teknolojilerin de kullanılmasıyla beraber tuz ve bor stresine çok daha dirençli monokotil bitkilerin elde edilmesi için önemli bir model olma potansiyeline sahiptir [97, 98].

Bugüne kadar Türkiye üzerinde yetiştiği belirlenen 10 farklı Puccinellia cinsi bulunmaktadır. *P. distans P. grossheimiana, P. convoluta, P. intermedia P.*

dolicholepis, P. bulbosa, P. gigantea, ,P. festuciformis, P. dolicholepis, P. koeieana ve P. ciliata [99].

P. distans'ın bor elementine olan toleransı, çoğu bitkinin bor hassasiyeti göz önüne alındığında önemini daha da arttırmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonuna sahip topraklarda doğal şartlarda gerçekleşmesi çok zor bir işlem olan bitki yetiştirilmesi ve bu alanların tarıma elverişli hale getirilmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca, çevresel atıklarla veya doğal yollara kirlenmiş toprakta bitki örtüsü oluşmasının doğal mikro çevreye önemli etkileri olmaktadır. *P. distans*'ın canlı kökleri tarafından nüfuz etmesinin, rizosferin ve mikroçevresinin bakteriler ve mikorizal mantarlar da dahil olmak üzere diğer organizmalar tarafından kolonileşmesini kolaylaştıracağı ve yeni oluşan floranın toprağı zenginleştireceği bilinmektedir. Ayrıca, lifli köklerin sürekli üretimi ve çürümesi toprağın organik madde içeriğini artıracak, böylece toprağı B seyrelterek B toksisitesini azaltacaktır [98].

2.4. PROTEOMİK

Proteomik, belirli bir zamanda ve belirli koşullar altında hücre, doku, organ veya tüm organizmadaki proteinlerin yapısal özelliklerinin birbirleriyle ve diğer moleküllerle olan tüm bağlantılarının incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Protein ilişkili olan tüm moleküler analizler proteomik analiz olarak adlandırılmaktadır. DNA, tüm genetik bilgiyi taşıyan kararlı bir kod dizisi olsa da dinamik hücre içi değişiklikleri göstermekten uzaktır. Bu nedenle transkriptomik ve genomik çalışmalar yüksek önem arz etmektedir, ancak proteinlerin hücre içi işlevlerin neredeyse tamamını gerçekleştirmesi sebebiyle en güvenilir sonucu veren çalışmalar proteomik çalışmalardır. mRNA seviyelerinin verdiği transkripsiyon sonrası ortaya çıkan regülasyonlar, bir proteinin hücresel kaderi hakkında yeteri kadar bilgi vermemektedir. Örneğin, herhangi bir posttranslasyonel modifikasyon geçirip geçirmediği veya belirli uyaranlara karşı hücresel yanıtları düzenlemek için ne tür protein-protein etkileşimleri gerçekleştirdiği sorusunun yanıtlarını verememektedir. Çünkü mRNA düzeyinde değişim gösteren bir gen protein düzeyinde başka regülatörler tarafından da regüle edildiği için aslında değişim göstermiyor olabilmektedir. Bu noktada gerçek fizyolojik yanıtları göstermeleri sebebiyle proteomik çalışmalar kritik önem taşımaktadırlar [100-103].

Sıklıkla kullanılan Western Blot ve Eliza yöntemleri, spesifik olarak proteinlerin konsantrasyonları ve değişimlerini belirlemekte oldukça yeterli olmakla beraber spesifik antikor gereksinimine ihtiyaç duydukları için kullanımı bitki gibi yüksek çeşitlilik gösteren organizmalarda sınırlı kalmaktadır. Bu sınırı aşabilmek için bitki moleküler biyologları, iki boyutlu jel elektroforezini kullanmaktadırlar. İki boyutlu jel elektroforezi temel olarak proteinlerin öncelikle izoelektrik noktalarına göre daha sonra da moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmasına dayanan önemli bir teknik olarak her geçen gün önem kazanmaktadır. İkinci boyut ayrışımının ardından jeller boyanarak, ortaya çıkan protein spotlarının, kontrol örneklerine ait protein spotlarıyla kıyaslanarak uygulamaya bağlı olan protein ifadesi değişimleri tespit edilmektedir. Anlamlı olarak değişiklik gösteren her bir protein spotu jelden izole edilerek kütle spektrometrisi ve kromotografik teknikleri kullanılarak dizilenmektedir. Elde edilen dizi veri tabanlarında taranarak hangi proteine ait olduğu belirlenmektedir [100, 104-107].

İki boyutlu jel elektroforezi çok çeşitli kompleks protein karışımlarını ayırmak için kullanılan en önemli ve yaygın tekniklerden bir tanesidir. Proteinlerin ilk olarak oluşturulan pH gradiyenti sayesinde izoelektrik noktalarına göre ayrımını, ikinci aşamada ise proteinleri moleküler ağırlığına göre ayırarak geniş bir ayırma spekturumu sağlamaktadır. pH gradiyenti hem asitlerle hem de bazlarla tuz oluşturabilen düşük moleküler ağırlıklı amfolitler sayesinde oluşmaktadır. Elektrik akımı sayesinde amfolitler asiditelerine göre anota ya da katoda doğru hareket ederek jel içerisinde katottan anoda doğru artan bir pH gradienti oluşturmaktadır. Proteinler de elektrik akımıyla beraber jelde yürümeye başladığında, kendi izoelektrik noktasına geldiğinde, yükünü kaybederek yürümesi sonlanmaktadır [106, 108, 109].

Proteinlerin sahip oldukları izoelektrik noktaları oldukça dar bir aralıkta bulunması sebebiyle, iki boyutlu jel elektroforezinde birinci boyutun ayıracı olan izoelektrik odaklama proteinleri çok keskin bir şekilde ayıramamaktadır. Bu yüzden tam ayırımın gerçekleşebilmesi için ikinci boyut ayırımına ihtiyaç duyulmaktadır. Proteinler pH gradienti içeren jel içerisinde kendi pI noktalarına kadar göç ederler ve bu şekilde her bir protein dar bir pH aralığında birbirinden ayrışmaktadır. pH aralığının dar olması sebebiyle pH değeri 0,02'lik bir pH farkı içerse dahi proteinler oldukça keskin bir şekilde bir birinden ayrılabilmektedir. Ayrıca işlem boyunca yüksek voltaj

kullanımına bağlı olarak ısı açığa çıkacağından sistemin ısınmaması için matriks mutlaka soğuk tutulmalıdır. Aksi durumda jelin yapısı bozulacağından deney sürecinde istenmeyen etkiler oluşabilmektedir [110-112].

Proteomikte, proteinlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. En sık kullanılanı bottom-up (aşağıdan yukarı) proteomiktir. Bu teknikte proteinler, proteolitik bölünme ile peptitlerine parçalanır ve daha sonra proteinlerin karakterizasyonu için kütle spektrometresiyle analiz edilmektedir. Protein karışımı spektrometrik işlemlerin öncesinde proteolitik enzimler tarafından sindirilir, daha sonra peptitlerin kütlesi elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon (MALDI) ile belirlenmektedir. Çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip proteinlerin heterojen karışımına, OmpT, Proteinaz K, Tripsin, Kimotripsin, Subtilisin gibi çalışmanın amacına ve hedef protein kitlesine uygun, farklı kesim özelliklerine sahip proteazlar uygulanarak fragmentlere ayrışım gerçekleştirilmektedir. Çarpışma Kaynaklı Ayrışma (CID) tekniği, nitrojen, helyum ve argon gibi inert gazlarla çarpıştırılıp yeniden parçalanması, yardımıyla diziler üzerindeki spesifik değişiklikler de saptanabilmektedir. Aşağıdan yukarı proteomik, henüz proteinler tanımlanmadan önce proteolizise maruz kaldığı için ve bazı peptit fragmentlerinin tespit edilememesi ihtimali göz önüne alındığında, bu yaklaşım protein izoformlarını veya post translasyonel modifikasyona uğramış proteinleri tanımlamak için uygun değildir. Ancak bu konuda 2-D tekniği bu eksiklikleri gidermek için kullanılabilmektedir. Aşağıdan yukarı proteomikte 2-D kullanıldığında, protein izoformları veya post translasyonel modifikasyona uğramış proteinler, proteolizise uğramadan önce izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre birbirlerinden ayrıldıkları için saptanabilmektedir. Bu sayede, aşağıdan yukarı proteomik, proteom profili oluşturma, protein miktar tayini, protein modifikasyonu ve protein-protein etkileşimlerinin saptama gibi birçok uygulamayı gerçekleştirebilmektedir [113-116].

Yukarıdan aşağıya (Top-down) proteomik, karakterizasyon için peptit fragmentlerinden yararlanan aşağıdan yukarıya proteomikin aksine bozulmamış proteinlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmektedir. Bozulmamış proteinler iyonize edilir ve gaz fazında MS'de parçalanır; böylece hem protein hem de parçalanmış peptit iyonlarının kütleleri bu yaklaşımla belirlenebilmektedir. Yukarıdan aşağıya proteomik,

aşağıdan yukarıya proteomikle kıyaslandığında post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır ve ayrıca proteinin aminoasit dizisini ortaya çıkarmayı sağlamaktadır. Bozulmamış proteinler kullanılmasının, gaz fazındaki protein iyonizasyonu ve protein parçalanmasının büyük zorluklar barındırması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle de büyük boyutlu proteinleri bulunduran karışımlar için, proteinlerin verimli bir şekilde ayrılması ve karakterize edilmesi daha da zorlaşmaktadır [115, 117-119].

Son zamanlarda, giderek daha fazla popülerlik kazanan başka bir teknik daha kullanılmaya başlamıştır. Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya proteomik tekniklerinin bir karışımı olarak ortaya çıkan orta-aşağı proteomik (middle-down) olarak adlandırılmaktadır. Histon proteinleri üzerinde post-translasyonel modifikasyonların lokalizasyonunun daha iyi gözlemlenmesi için geliştirilen bu teknik, genellikle Lys-C veya Glu-C gibi endoproteazlar kullanılarak sınırlı sindirim yoluyla daha büyük peptit fragmanları üretmeye dayanmaktadır. Aşağıdan yukarı tekniğinde elde edilenlerden fragmentlere (5-15 kDa) kıyasla boyut olarak çok daha büyük fragmentler (50 kDa) elde edilerek gerçekleştirilmektedir. Böylece bozulmamış protein iyonizasyonu ve parçalanma problemi bu yaklaşımla aşılmaktadır. Hem yukarıdan aşağıya hem de ortadan aşağıya proteomik, proteinler üzerinde farklı post-translasyonel modifikasyonların başarılı bir şekilde karakterize edilmesini daha başarılı şekilde sağlamaktadır [120, 121].

Yu ve diğ. (2011)'de *Puccinellia tenuiflora* ile tuzlu koşullar altında gerçekleştirdikleri çalışmalarda 2-DE tekniğini kullanılmıştır. 107 spot içerisinde 93 farklı protein elde etmiştir. Bu proteinler esas olarak fotosentez, stres ve savunma yanıtı, karbonhidrat ve enerji metabolizması, protein metabolizması, sinyalizasyon ve membran taşınımıyla ilgilidir. Proteinlerin identifikasyonu için MS/MS ve ESI-Q-TOF MS teknikleri kullanılmış ve veri tabanlarında analiz edilmiştir [122].

Yu ve diğ. (2013)'de 50 günlük *Puccinellia tenuiflora* fidelerine 7 gün boyunca 38mM ve 95mM Na_2CO_3 alkali tuz stresi uyguladıkları çalışmada 2-DE tekniğini kullanmıştır. MS/MS tekniğiyle identifikasyonun ardından mascot veritabınında analiz gerçekleştirilmiş ve 43 farklı protein elde etmiştir. Bu proteinler, fotosentez, stres yanıtı ve savunma mekanizmaları, karbonhidrat ve enerji metabolizması, amino asit

metabolizması, transkripsiyon faktörleri, protein sentezi, protein katlanması ve taşınması, ubikutinasyon, ile ilişkili proteinler olarak belirlenmiştirn[123].

Bar (2015)'de *Puccinellia distance* bitkisinde gerçekleştirdiği çalışmalarda 21 gün boyunca (500 mg B/L) bor uygulamasına tabi tutulmuştur. Proteinler LC/MS tekniğiyle sıvı homojenatlar halinde incelenerek protein profilleri ve farklılıkları incelenmiştir. Yapılan analizler neticesinde 189 adet farklı protein elde etmiştir. Saptanan 189 proteinden 163 tanesinin ifadesinin arttığını, 26 tanesinin ise ifadesinin azaldığını belirlemiştir. Belirlenen proteinlerden 3 tanesi hiperakümülasyon mekanizmasında rol aldığı düşünülmektedir [124].

Sang ve diğ. (2015)'de gerçekleştirdikleri çalışmalarda bor toleranslı *Citrus sinensis* ve hassas *Citrus grandis* fidelerinde bor toksisitesinin yaprak protein profilleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmak için ilk olarak 2-DE tekniğini uygulamışlardır. Her iki narenciye türünde de bor toksisitesi, antioksidasyon ve detoksifikasyon ve proteoliz ile ilgili proteinlerin ifadesi arttırmıştır. Protein biyosentezinde yer alan proteinlerin ifadesini ise azaltmıştır. Özellikle C.sinensis'de fotosentez ve enerji metabolizmasında ki proteinlerin ifadesi ve buna bağlı olarak antioksidan protein miktarlarında düşük ifade gözlenmiştir. Proteinlerin identifikasyonu MALDI-TOF / TOF-MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir [125].

Wang ve diğ. (2010)'de gerçekleştirdikleri çalışmaları bor noksanlığına son derece hassas *Brassica napus* bitkisinde bor noksanlık koşulları oluşturarak gerçekleştirmişlerdir. Protein profilleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmak için ilk olarak 2-DE tekniğini uygulamışlardır. 45 adet farklı protein spotu elde etmişler ve bunların 35 tanesinde protein ifadesinin arttığını 10 tanesinde ise protein ifadesinin azaldığını belirlemişlerdir. Proteinlerin identifikasyonuun 31 tanesi MALDI-TOF/TOF-MS'le 14 tanesi ise LTQ-ESI-MS/ MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değişiklikler özellikle antioksdan ve detoksifikasyon mekanizmalarında gerçekleşmiştir [126].

Li ve diğ. (2017)'de gerçekleştirdikleri çalışmalarda tuz stresine karşı dirençli bir tür olan *Carex rigescens* bitkisinin yaprak ve köklerinden 12 saatlik tuz uygulaması sonucu gerçekleştirilmiştir. Protein profillerindeki değişen etkileri saptamak için iTRAQ tekniğini uygulamışlar ve 9258 adet farklı protein elde etmişlerdir. Bu

proteinlerin 726 tanesini ifadesi artarken ve 1209 tanesinin ifadesi azalmıştır. Yani 1893 protein, tuz stresi uygulamasından sonra farklı şekilde ifade göstermiştir. Yaprakta 897 kökte ise 900 adet diğer bölgelerde ifade edilmeyen protein saptanmıştır. En çok değişiklik göstren proteinler karbonhidrat ve enerji metabolizması, fotosentez ve elektron taşıma zinciri, sinyal algılama ve iletimi, protein sentezi ve stres savunma yanıtında yer alan proteinler olduğu gösterilmiştir. Proteinlerin tanımlanması Sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC – MS / MS) analiziyle gerçekleştirilmiştir [127].

Bu tez çalışmasında farklı dozlarda bor ve tuz kombine noksanlık/stres uygulama koşullarında yetiştirilen *Puccinellia distans* bitkilerinde her bir doz için 3'er tekrarlı olarak 2-DE çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde ifade farklılıkları belirlenmiştir. İfade farklılığı gösteren spotlar LIBS tekniğiyle incelenmiş ve metal iyonlarına ait emisyon saptanan spotlar eş zamanlı yürütülmüş tekrar jellerinden kesilerek MALDİ-TOF analiziyle proteinlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler MASCOT veri tabanında analiz edilerek proteinlerin identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Puccinellia distans (Jacq.) parl. tohumları Eskişehir Kırka' da bulunan bor madenlerinde doğal olarak yetişen bir popülasyondan toplanmıştır. Toplanan tohumlardan bitkilerin yetiştirilmesi Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu için ilk olarak %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde 10 dakika karıştırılmasının ardından 5 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Çimlendirilen tohumlar 1/5 Hoagland besin solüsyonu içerisine 1,86 mg L^{-1} H_3BO_3 ilave edilerek hidrofonik kültürde büyütülmüştür. Gelişme süreleri boyunca yaklaşık 22 derece sıcaklık %45-55 nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotunda yetiştirilmiştir. 2 haftalık fideler noksanlık/B0 (0µM), kontrol/B1 (30µM) ve yüksek seviyede/B2 (4mM) olmak üzere 3 farklı uygulanan bor dozu Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Bor uygulamalarıyla eş zamanlı olarak NaCl uygulaması başlatılmıştır. Noksanlık/T0 (0mM), kontrol/T1 (100mM), yüksek tuz/T2 (250mM) NaCl uygulamısına maruz bırakılmıştır. 30 günün ardından bitkiler hasat edilerek -80°C 'de analizler gerçekleştirilene kadar saklanmıştır.

Tablo 3.1 Bor ve Tuz Uygulamalarının Konsantrasyonları

B0 (0 µM Bor) + T0 (0mM NaCl)	B1 (30 µM Bor) + T0 (0mM NaCl)	B2 (4mM Bor) + T0 (0 mM NaCl)
B0 (0 µM Bor) + T1 (100mM NaCl)	B1 (30 µM Bor) + T1 (100mM NaCl)	B2 (4mM Bor) + T1 (100 mM NaCl)
B0 (0 µM Bor) + T2 (250mM NaCl)	B1 (30 µM Bor) + T2 (250mM NaCl)	B2 (4mM Bor) + T2 (250 mM NaCl)

3.1.2. Protein İzolasyonu

Farklı miktarda tuz ve bor konsantrasyonlarıyla muamele edilen ekstrem toleranslı *Puccinellia distans* bitkileri bor, tuz ve tuz-bor kombine stresinin translasyonel

etkilerinin incelenmesi için proteinleri izole edilmiş ve izole edilen proteinlere iki boyutlu jel elektroforezi metodu uygulanarak incelenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda bor ve tuz uygulanmış bitkilerden her bir doz için 0,3 g bitki örneği tartılmış ve 2 saat önceden -80 de bekletilmiş soğuk havanlarda sıvı azot yardımı ile toz hale getirilmiştir. Örneklerin erimesi beklenmeden içerisinde %90 aseton- %10 trikloroasetik asit (TCA)- %0,07 β-Merkaptoetanol (2-met) içeren 1,6 ml soğuk ezme tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenantlar 2 ml hacimli santrifüj tüplerine alınarak -20°C' de 1 saat bekletilmiştir. Bu 1 saat içerisinde her 15 dakikada bir olmak üzere 3 kez tüpler ters-düz edilmiş ve tamponun tüm örneklerle muamelesi sağlanmıştır. 1 saatin dolmasının ardından örnekler +4°C' de 15.000 rcf' de (göreceli santrifüj kuvveti) 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant pipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırılmış ve kalan pellet %90 aseton %0,07 2-met içeren soğuk saflaştırma tamponu ile karıştırılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Pelletin tamamen çözünmesinin ardından örnekler 15 dakikada bir ters-düz edilmek üzere -20°C' de bekletilmiştir. Örnekler 1 saatin ardından yeniden 4°C' de 15.000 rcf'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırma işlemi 3 tez tekrarlandıktan sonra pelletin yeşil rengini kaybettiği görülmüştür. Renk pigmentlerinden arındırılan pelletler Eppendorf Concentrator Plus cihazında 25 dakika oda sıcaklığında santrifüj tüplerinin kapakları delinerek kurumaya bırakılmışlardır. Elde edilen toz protein pelletleri tartılarak BioRad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme (Rehydration/Sample) tamponuyla her 10 mg için 600 µL olacak şekilde karıştırılmıştır. Karışım proteinlerin çözünmesi için oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve sürenin sonunda oda sıcaklığında 15.000 rcf'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüplerinden süpernatantlar pipet yardımıyla yeni tüplere alınmış ve etiketlenerek -20°C'de saklanmıştır [128-130].

3.1.3. Proteinlerin Saflaştırılması

İzole edilen proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezinde kullanılır hale getirilmesi için BioRad ReadyPrep™ 2-D CleanUp (saflaştırma) Kiti kullanılmıştır. Bu işlem için her bir protein örneğinin içerisinden 100 µL alınarak yeni tüplere transfer edilmiş ve üzerlerine 300 µL çökeltme ajanı I (precipitation agent) eklenmiştir. Örnekler pipetaj yapılarak nazikçe karıştırıldıktan sonra 15 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplere 300 µL çöktürme ajanı II (precipitating agent) eklenmiş ve yeniden

pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır. Örnekler 15.000 rcf'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant mikropipet yardımıyla dikkatlice çekilerek uzaklaştırılır. Örneklerin tamamıyla saflaşması için bu işlem bir kez daha tekrarlanır. Tamponların kalıntılarından kurtulmak için pelletin üzerine 40-50 µL yıkama solüsyonu (wash reagent) eklenmiş ve pipetaj yardımıyla pelletin çözünmesi sağlanmıştır. 15.000 rcf'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve pipet yardımıyla süpernatant dikkatlice çekilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 25 µL Bio-Rad ultra saf (NANOpure) su eklenerek çözündürülmüştür [131, 132].

İzolasyonun tamamlanmasının ardından pelletin tamamıyla çözündürülmesi büyük önem arz etmektedir. Bütün pelletin çözündürülememesi elde edilecek olan spot sayısını direkt olarak etkilediği için bu aşama çok önemlidir. 2-D elektroforezinde ilk adım izoelektrik odaklama olduğu için çözücü tampon içerisinde proteinlerin yüklerini değiştirecek kimyasallardan kaçınılması gerekmektedir. Tampon içerisinde iyon içeren deterjanlardan kaçınmalı ve noniyonik deterjenlar kullanılmalıdır. Proteinlerin çözelti içerisinde birbirleriyle etkileşerek oluşturabilecekleri kovalent bağlar engellenmeli ve proteinleri çözünmüş halde tutabilmeli yeniden katlanıp kompleks yapılar oluşturmaları engellenmelidir. Ayrıca ortamda bulunabilecek olan proteaz aktivitelerinden korumalıdır. Çalışmalarımızda saflaştırma aşamalarının ardından proteinlerin çözülmesi için, Bio-Rad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme (Rehydration/Sample) tamponu (8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, % 0,2 pH 3-10 amfolit ve eser miktarda bromofenol mavisi) kullanılmıştır [133].

3.1.4. Bradford Protein Miktar Tayini Yöntemi

Protein konsantrasyonlarının tayin edilmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford oldukça yaygın olarak kullanılan ve hassas okuma ölçeğine sahip bir metottur. Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitlerin asidik ve bazik üniteleriyle etkileşmesiyle meydana gelen renk değişimleriyle tayin edilmektedir [134].

Protein konsantrasyonlarının tayini için, 1µg/µl BSA (Bovine Serum Albumin) stokundan artan dozlarda hazırlanan standartlardan elde edilen absorbans/konsantrasyon değerlerine göre standart eğri grafiği çizilmektedir. Deneyler 96 kuyucuklu petri üzerinde gerçekleştirilmiş ve standart oluşturulurken en az 2 tekrarlı olacak şekilde 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl, 4 µg/µl ve 5 µg/µl BSA kuyucuklar içerisine duvarlara bulaşmasından kaçınılacak şekilde yerleştirilmiştir. Örnekler de

yine en az 2 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklar içerisine yerleştirilmiştir. Oluşturulan standartlar ve protein örneklerinin üzerine her kuyucuk içerisinde 200 µl olacak şekilde Bradford solüsyonu ilave edilmiştir. Renk oluşumunun tamamlanması için 10 dakika karanlıkta bekletilmiş ve örnekler 595 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda (iMark™ Microplate Absorbance Reader) okutulmuş ve elde edilen veriler neticesinde bir standart eğri oluşturularak proteinlerimizin konsantrasyon miktarları elde edilmiştir [134, 135].

3.1.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

3.1.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi

SDS jel elektroforezi proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını temel alan bir tekniktir. SDS proteinlerin içerisindeki aminoasitlere bağlanarak onları negatif yük ile yükler ve proteinlerin yüklerinin önemsiz hale gelerek sadece moleküler ağırlıklarına göre jelde dağılım göstermelerini hedeflemektedir. Jel akrilamid ve bis akrilamid monomerlerinin çapraz bağlarla polimerizasyonu sonucunda gerçekleşmektedir. Polimerizasyonun gerçekleşmesinde TEMED katalizör APS (Amonyum persülfat) başlatıcı molekül olarak görev yapmaktadır [136].

Konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri, örnek kalitesinin belirlenebilmesi için ilk olarak %12'lik SDS poliakrilamid jellerde yürütülmüştür. Konsantrasyonlarının eşitlenmesi için her bir kuyuda 60 µg protein olacak şekilde 4X Laemmli ile 1:3 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 95°C' de 5 dakika bekletilir. Bu işlemin amacı sıcaklık etkisiyle hidrojen bağlarının kırılarak proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının bozulmasıdır. DDT ve β-Merkaptoetanol proteinlerin sülfit bağlarına etki ederek yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır. 5 dakikalık sürenin ardından örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Örneklerin oda sıcaklığına gelmesinin ardından yürüme tamponunun içerisine batırılmış olan jellerin içerisine yükleme yapılmıştır. Yüklemenin tamamlanmasının ardından sistem yürüme işlemi için hazırlanarak 120 V akımda 90 dakika yürümesi sağlanmıştır. Daha sonra jeller sistemden çıkartılarak 2 saat fiksasyon solüsyonu içerisinde inkübe edilmiştir. 2 saatin sonunda jeller 20 dakikada bir yeni distile su eklenerek 1 saat boyunca yıkanmış ve ardından commasie parlak mavisi G-250 solüsyonunda bekletilmiştir. Jellerin boyanmasının ardından protein örnekleri konsantrasyon ve bant keskinleri

karşılaştırılmıştır. Eşit görüntü vermeyen örneklerin Bradford analizi tekrarlanmış ve yeniden SDS poliakrilamid jelde yürütülmüştür [136, 137].

3.1.6. İki Boyutlu Jel Elektroforezi

3.1.6.1. Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları

Proteinlerin izoelektrik odaklamaları için 17 cm'lik Bio-rad marka ReadyStrip™ IPG Stripler kullanılmıştır. IPG stripler uzun süre saklanabilmesi için inaktif halde temin edilmiştir. Yeniden aktif hale gelmesi için 12 saatlik rehidrasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Suyunu yeniden kazanmasıyla aktifleşen striplerin porları yeniden oluşarak proteinlerin yürüyebilmesi için uygun ortam oluşmaktadır. Protein örnekleri Bio-Rad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme tamponu ile karıştırılarak 300 µl içerisinde 405 ng protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler elektrotların iki ucuna çok fazla yaklaşmayacak şekilde odaklama tepsisine (focusing tray) kanalın tek bir duvarından dağıtılır. Daha sonra IPG strip forseps yardımıyla örneğin üzerine jel kısmı alta bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Striplerin üzeri buharlaşmayı önlemek amacıyla mineral yağı ile kaplanmıştır. Rehidrasyon işlemi 20°C'de 50 volt sabit akım içerisinde 12 saat boyunca yapılmıştır. Rehidrasyonun ardından elektrotların üzerine elektrot kâğıtları yerleştirilerek proteinlerin yürümesi başlatılmıştır.

Yürümenin bitmesinin ardından IPG stripler forseps yarımıyla yıkama tepsisine alınarak mineral yağının fazlasından kurtulmak için 1 kez ultra saf suyla yıkanmıştır. Yıkamanın ardından stripler başka bir kuyuya alınarak üzerine 6 ml dengeleme tamponu (equilibrium buffer l) 1 ilave edilerek karanlıkta 15 dakika boyunca tamponun her yere eşit dağılabilmesi için çalkalanması sağlanmıştır. 15 dakikanın ardından stripler başka bir kuyuya alınarak üzerlerine 6 ml dengeleme tamponu (equilibrium buffer ll) 2 ilave edilir ve yeniden karanlıkta 15 dakika çalkalanması sağlanmıştır. Bu sürenin ardından örnekler 2. Boyut elektroforez için hazır hale gelmiştir [108].

3.1.6.2. Proteinlerin 2. Boyut Elektroforezinde Moleküler Ağırlığına Göre Ayırılması

Proteinlerin moleküler ağırlığına göre ayrılması %12'lik SDS PAGE jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jeli tamamen polimerleşmesi için en az 2,5 saat bekletilmiş daha uzun süre beklemesi gereken jeller ise kurumaması için distile su içerisinde 4°C'de

bekletilmiştir. Jellerin dökülmesinin ardından üzeri izopropanol ile kaplanarak jelin hava ile teması kesilmiştir.

İzoelektrik odaklaması gerçekleşen stripler %12'lik SDS PAGE jel üzerine yatırılarak üzeri yaklaşık 2 mL Biorad marka overlay agaroz ile kaplanır. Overlay agaroz içerisindeki brumofenol mavisi sayesinde oluşan takip boyası jelin yürüme durumu hakkında önemli bir belirteç olmaktadır. Agarozun yeniden polimerleşmesinin ardından sistem içerisine 1x yürüme tamponu ilave edilerek sistem çalışmaya hazır hale getirilir. SDS ile negatif yükle yüklenen örnekler, elektrik akımı sayesinde pozitif yüklü uca doğru hareket etmektedirler. Yüklenen örnekler, Biorad marka PROTEAN® II xi Cell cihazı kullanılarak ikinci boyut ayrışımı gerçekleştirilmektedir. Güç kaynağı olarak ise BioRad PowerPac HC kullanılmış ve örnekler 30 dakika 30 mA daha sonra 6 saat 4 mA sabit akımda yürütülmüştür. İkinci boyut ayrışımının tamamlanmasının ardından örnekler 2 saat fiksasyon solüsyonunun içerisinde bekletilmiştir. Fiksasyon işleminin ardından jeller boyama solüsyonunun içerisine alınarak protein spotlarının belirginleşmesi için 2 gün süreyle 20 rpm hızda orbital çalkalayıcı içerisinde inkübe edilmiştir.

3.1.6.3. 2-D Jellerin Analizi ve Spotların Kesilmesi

Boyadan çıkartılan jeller fazla boyadan arındırmak amacıyla 30 dakika distile su içerisinde bekletildikten sonra Biorad marka ChemiDoc™ MP Imaging System yardımıyla beyaz ışık altında görüntülenmiştir. Kaydedilen görüntüler PDQuest Advanced analiz programı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir kondisyon kontroller ile karşılaştırılarak proteinlerin anlatım dereceleri protein spotlarının artıp azalmasına bağlı olarak belirlenmiştir. Artış veya azalışları anlamlı olarak değerlendirilen spotlar analiz için, steril pipet ucu yardımıyla jelden kesilerek steril bir mikro santrifüj tüpüne alınmıştır. Mikro santrifüj tüp içerisine 1:1 oranında asetonitril ile karıştırılmış 100 mM amonyum Bicarbonat solüsyonundan 100 µl eklenerek jelin içerisindeki boyanın temizlenmesi için yarım saat orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Jelin boyadan tamamen arındırılması için üzerine 500 µl asetonitril ilave edilir ve jel tamamen beyazlaşana kadar bekletilmiştir. Tamamen beyazlaşmış olan jel yeni mikro santirifüj tüpüne alınarak üzerine spotun büyüklüğüne bağlı olarak 56-70 µl tripsin tamponu ilave edilip jelin içine işlemesi için 2 saat boyunca buzdolabında inkübe edilir. İki saatin sonunda örnekler buzdolabından çıkartılarak 37°C'de gece boyu inkübe

edilmiştir. Ertesi gün örneklerin içerisine 1:2 oranında karıştırılmış 5%'lik formik asit/asetonitril karışımı ilave edilip 15 dakika daha inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler Eppendorf Concentrator Plus cihazında vakum yardımıyla konsantre edilerek kurutulmuştur. Kurutulan spotların analizleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Bölümü DEKART Proteomik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir [138, 139]. Çalışma kapsamında her örneğe ait 2'şer jel hazırlanmıştır.

3.1.6.4. Zip-Tip

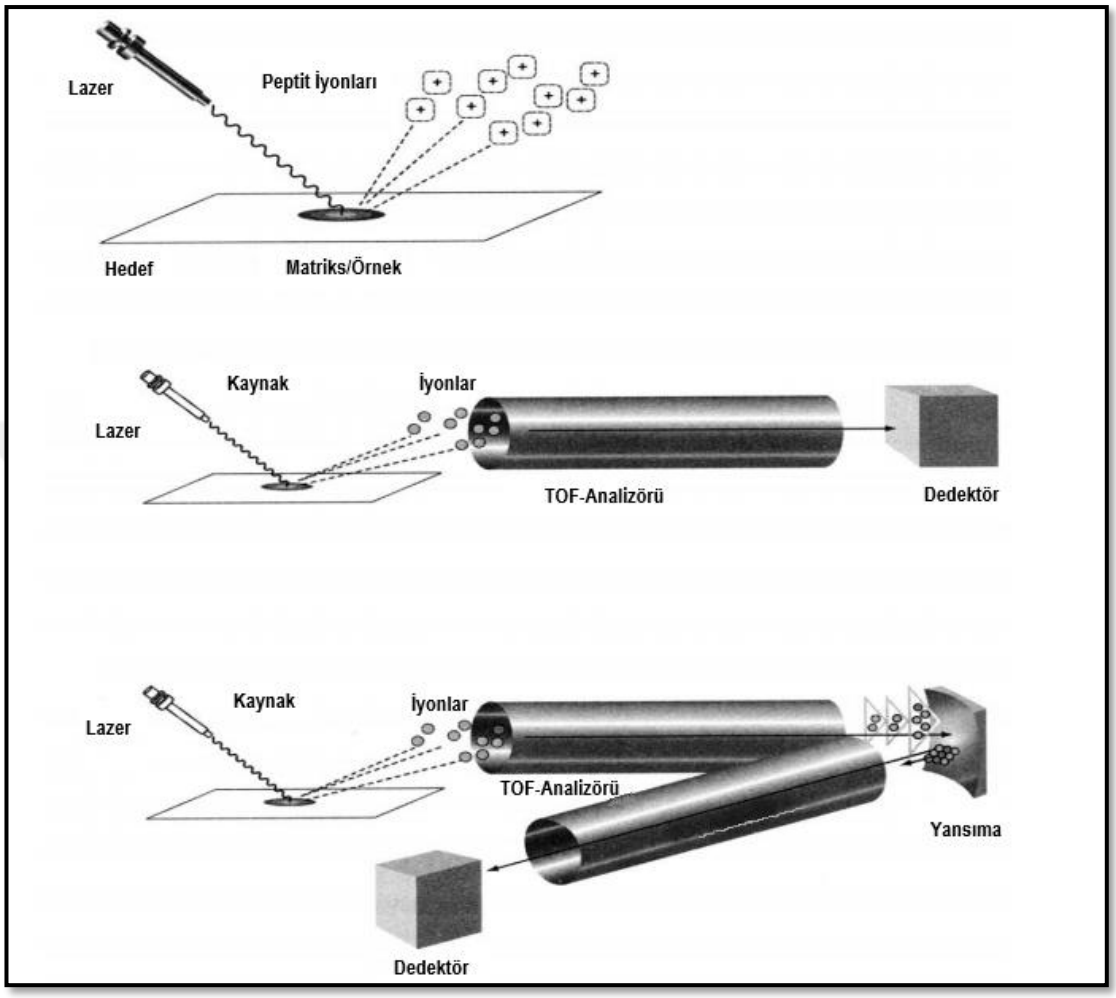
Proteinlerın saflaştırılması için Zip-tip® Millipore ™ temizleme uçları aşağıda tarif edilen protokole göre kullanılmıştır. Uçlar ilk önce %100 asetonitiril ile iki defa ıslatılmıştır. %100'lük acetonitril uzaklaştırıldıktan sonra %70'lik acetonitril içeren ıslatma solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Sonraki aşamada ise %3 asetonitril ve %0,1 trifloroasetik asit içeren dengeleme solüsyonu ile muamele edilmiştir. 10 µl protein örneği Zip Tip pipet kolonlarına çekilerek 15-20 kez pipetaj yapılmış ve kolondaki proteinlerin tuzdan arındırılması için %5 metanol + %0,1 trifloroasetik asit içeren yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. 10 µl protein karışımı temiz bir tüpe aktarılarak üzerine %60 acetonitril ve %0,1 trifloroasetik asit içeren elüsyon solüsyonu ile elüt edilmiştir. Örnekler Eppendorf Concentrator Plus cihazında vakum yardımıyla konsantre edilerek kurutulmuştur [140].

3.1.7. MALDI TOF-TOF Analizi

Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) tekniği 1985 yılında Franz Hillenkamp, Michael Karas yaptığı çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır ve lazer enerjisini absorbe ederek iyonizasyon oluşturma mantığına dayanmaktadır. Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu geleneksel yöntemlerle iyonize edilmesinde zorluk yaşanan biyomoleküllerin ve büyük organik bileşiklerin analizi için büyük bir imkân sağlamaktadır. Kullanılan matriks analiz edilecek örneklerin birbirinden ayrı durmasını sağlarken aynı zamanda birbirleriyle yeniden etkileşimde bulunmalarını engellemektedir. İyonize olan moleküllerin uçuş zamanlı kütle analizatörleri sayesinde toplanarak detektör yardımıyla moleküler ağırlıklarına ve yüklerine göre analiz edilmektedir [141, 142].

Peptit kütle tayini için MALDI-TOF ölçümleri, 5800 AbSciex MALDI-TOF / TOF Proteomik Analiz Cihazında gerçekleştirilmiştir. MASCOT veri tabanından (Matrix

Science., Boston, ABD) elde edilen veriler ışığında ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) programında proteinlerin dizileri kütle/yük (m/z) oranları kullanılarak gerçekleştirilen analizler neticesinde saptanmıştır.



Şekil 3.1 MALDI TOF-TOF Analizinin Şematik Olarak Gösterimi[143]

3.1.8. Lazer Kaynaklı Plazma Spektroskopisi (LIBS)

LIBS tekniği, örnek yüzeyi üzerinde düşük enerjili lazer darbeleri yardımıyla plazmalar elde edilmesini ve bu plazma buharının analizini içermektedir. Teknik özellikle metallerin ve metal alaşımlarının analizi için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde arkeoloji, ev eşyaları, mermerler, camlar, mücevherler, çeşitli pigmentler, madeni paralar ve biyomateryallerin analizlerinde kullanılmaktadır. Örnek içerisinde bulunan çeşitli eser elementlerin dahi kantitatif tayini ve metalürjik teknolojileri hakkında detaylı bilgiler vermektedir [144].

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü Lazer Plazma ve Optik Spektreskopi laboratuvarında Lazer Kaynaklı Plazma Spektroskopisi (LIBS) tekniği kullanılarak poliakrilamid jellerin içerisindeki protein spotları analiz edilmiştir. Kombine stres koşulları altında ifade farklılığı gösteren protein spotlarının içerisinde bor elementine ait emisyonların bulunması amaçlanmıştır. Düşük enerjili lazer ışınları kullanılarak bor elemintinin saptanması için 249 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir [145, 146].

3.1.9. İstatistiksel Analiz

Farklı kondisyonlara ait 2DE'inden elde edilen jellerin görüntüleri PDQuest™ yazılım aracı ile normalize edilmiş, istatistiksel analizler ve spotların ifade miktarlarının belirlenmesi PDQuest™ (Bio-rad ABD) yazılım aracı kullanılarak yapılmıştır[147].

Jeller üzerinde yapılan analizler sonucu elde edilen protein miktar değişimlerinin grafikleri GraphPad Prism 8 programı yardımıyla çizilmiştir. Yine elde edilen protein değerlerinin karşılaştırılması için, tek yönlü varyans Analizi (ANOVA) yapılmıştır [148].

4. SONUÇLAR

4.1. BOR VE TUZ STRES DENEMELERİNDE BİTKİ GELİŞİMLERİNE AİT SONUÇLAR

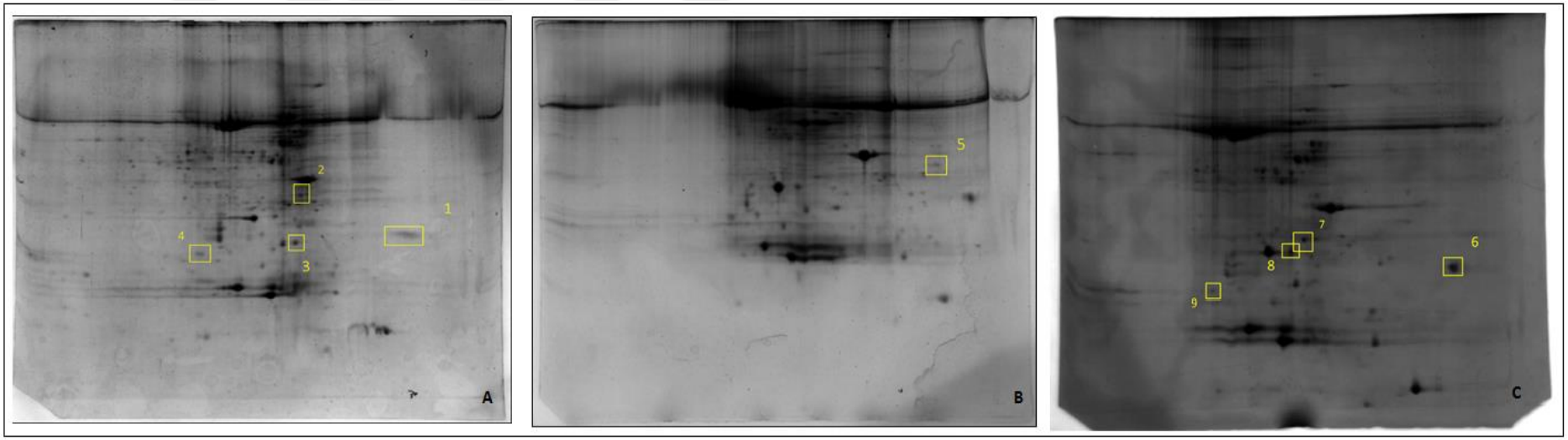
P. distans bitkileri çimlenme aşamasının ardından 15 gün süreyle büyütülmüş ve bu sürenin ardından 2 haftalık fideler noksanlık/B0 (0µM), kontrol/B1 (30µ) ve yüksek seviyede/B2 (4mM) olmak üzere 3 farklı bor dozu uygulanmıştır. Bor uygulamalarıyla eş zamanlı olarak NaCl uygulaması da başlatılmıştır. Noksanlık/T0 (0mM), kontrol/T1 (100mM), yüksek tuz/T2 (250mM) NaCl uygulamasına 30 gün süreyle maruz bırakılmıştır. 30 gün bor ve tuz kombine stres uygulamasının ardından bitkilerin fiziksel gelişim ve kuru ağırlıkları baz alınarak yapılan gözlemler sonucunda B0 setinde artan tuz uygulamasına karşı direncin diğer kondisyonlara kıyasla azalma gösterdiği, B2 setinde ise artan tuz uygulamasına karşı direnç kontrol bitkilerine kıyasla artış göstermiştir. Tüm T setlerinde en yüksek kuru ağırlık gösteren kondüsyon B2 olarak bulunmuştur. En yüksek kuru ağırlık ve fiziksel gelişime ise B2T0 dozunda ulaşılmıştır.

4.2. İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZ ANALİZİNE AİT SONUÇLAR

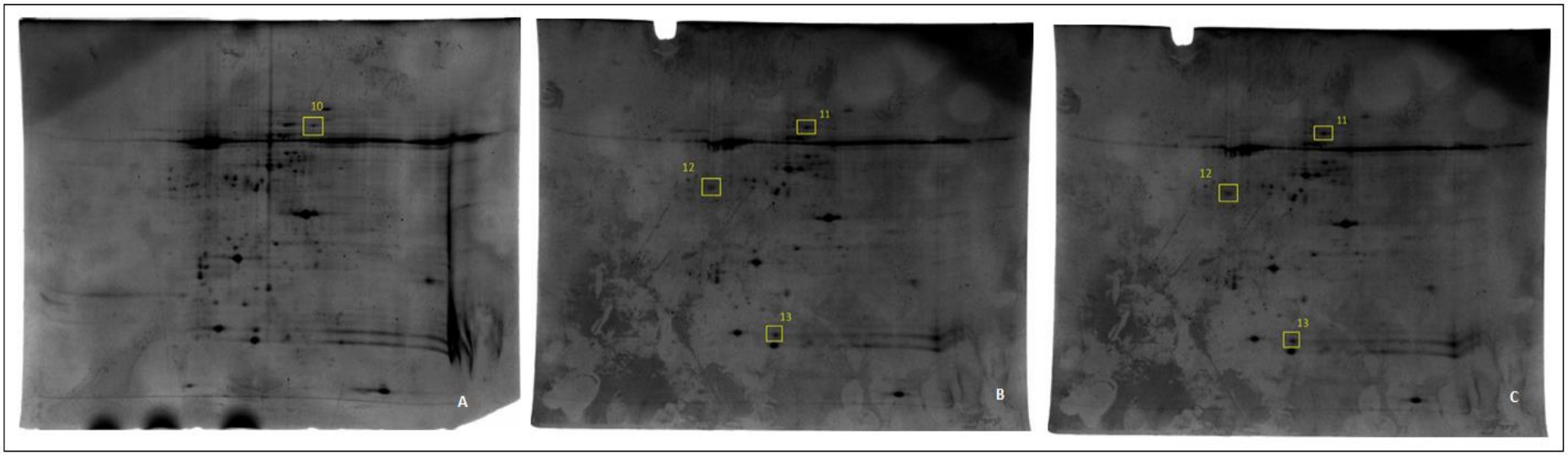
Farklı konsantrasyonlarda bor ve tuz uygulanan *Puccinellia distans* bitkilerinde iki boyutlu jel elektroforezi sonucunda jeller PDQuest™ (Bio-rad ABD) yazılım aracıyla analiz edilmiş ve normalizasyon sonrasında 9 jel üzerinde toplam 2088 protein spotu saptanmıştır. En çok protein spotuna 282 spot ile Bor ve tuz noksanlık kondisyonuna ait jelde saptanmıştır. En az protein spotu ise B noksanlık ve yüksek tuz konsantrasyonuna maruz kalan bitkilerden elde edilen protein jellerinde saptanmıştır. Jellerin spot sayılarına ait detaylı bilgiler Tablo 4.1'de verilmiştir. Tüm kondisyonlara ait jellerin görüntüleri ise Şekil 4.1-Şekil 4.3'te verilmiştir. Saptanan 2088 spot arasından bor konsantrasyonundaki değişimler baz alınarak PDQuest Advanced programı ile analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı artış veya azalış gösteren 28 spot belirlenmiştir.

Tablo 4.1 Jellerde Elde Edilen Spot Sayıları

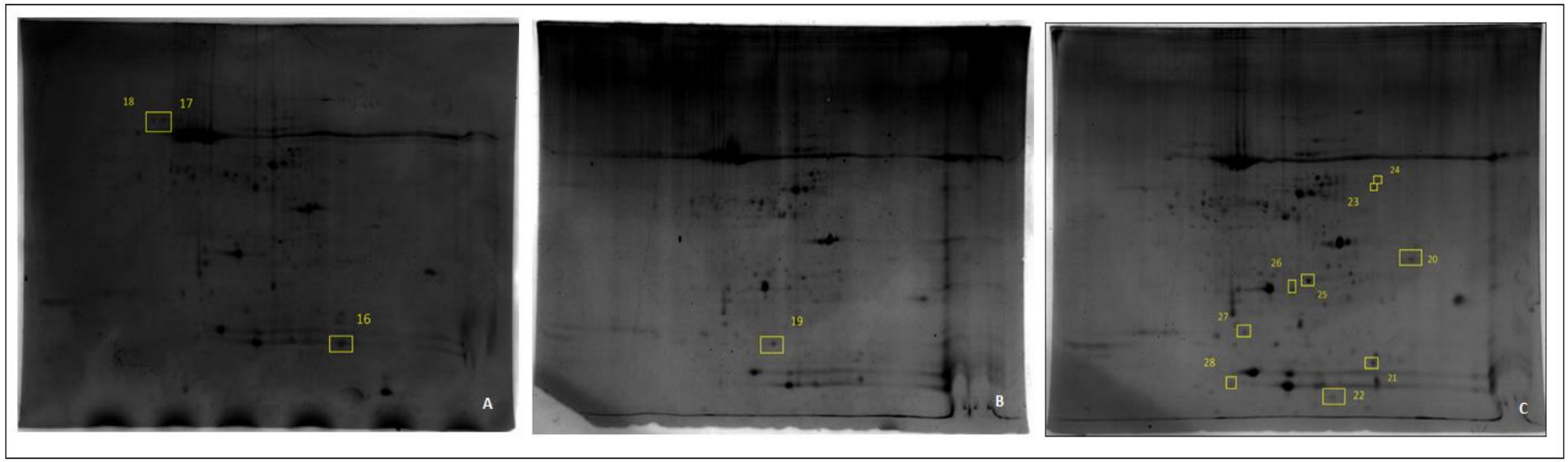
ÖRNEKLER	JELLERDE SAPTANAN SPOT SAYILARI
B0T0	282
B0T1	237
B0T2	179
B1T0	270
B1T1	266
B1T2	195
B2T0	180
B2T1	246
B2T2	233



Şekil 4.1 Bor Noksanlık Koşullarında Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B0T0, B. B0T1, C. B0T2)



Şekil 4.2 Optimum Bor İçeren Koşullarda Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B1T0, B. B1T1, C. B1T2)



Şekil 4.3 Yüksek Bor İçeren Koşullarda Farklı Konsantrasyonlarda Tuz Uygulanan *P. distans* Bitkilerinden İzole Edilen Proteinlere Ait İki Boyutlu Jel Elektroforez Görüntüsü (A. B2T0, B. B2T1, C. B2T2)

Farklı konsantrasyonlarda bor ve tuz uygulanan *Puccinellia distans* bitkilerinde iki boyutlu jel elektroforezi sonucunda jellerden elde edilen spotlar gösterilmiştir. Değişen bor konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı artış ve azalış gösterdiği belirlenen 28 spot seçilmiştir.

4.3. LAZER KAYNAKLI PLAZMA SPEKTROSKOPİSİ (LIBS) ANALİZİNE AİT SONUÇLAR

Farklı konsantrasyonlarda stres uygulanan *P. distans* bitkilerinin iki boyutlu jel elektroforez sonuçlarına göre ifade farklılığı gösterdikleri belirlenen 28 adet protein spotu, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü Lazer Plazma ve Optik Spektroskopi Laboratuvarında LIBS tekniği ile analiz edilmiştir. Jellerden kesilen protein spotlarının içerisinde bulunan proteinlerin metal iyonlarıyla olan etkileşimleri incelenmiştir. Bu incelemeler ışığında seçilen 28 spottan 17 tanesinin yüzeyinde metal iyonlarına ait emisyonlar saptanmış ve çalışmalara bu spotlarla devam edilmiştir [149].

Bor ve tuz stresinin uygulandığı *Puccinellia distans* bitkilerinde yapılan iki boyutlu jel elektroforezi sonucunda elde edilen jellerden kesilen spotlara LIBS tekniğinin uygulanmasının ardından, bor ilişkili 17 adet spot seçilmiştir.

4.4. SEÇİLEN PROTEİN SPOTLARININ PROTEOMİK ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR

LIBS analizinden elde edilen protein spotlarının tanımlanması için jellerin eş zamanlı yürütülmüş 2. tekrarlarından aynı spotlar kesilerek saflaştırılmış ve MALDI-TOF analizleri yapılmıştır. Seçilen protein spotlarının kontrol grubuna (B1T1) göre farklı konsantrasyonlarda bor ve tuz stresine maruz bırakılan örneklerindeki ifade değişimleri ve protein veri tabanlarından eşleştikleri proteinlere ait veriler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 LIBS Analizine Göre Seçilen Protein Spotlarının İfade Düzeylerindeki Değişimler ve Eşleştikleri Proteinler

Spot No	Aksesyon Numarası	Protein Kütlesi (kDa)	Proteinler	İşlev	Lokalizasyon	B0T0	B1T0	B2T0	B0T1	B1T1*	B2T1	B0T2	B1T2	B2T2	Organizma
1	Q7F8R0	31133	Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14	Transkripsyon Faktörü	Nukleus	0,79	0,57	0,48	1,1	1	1,99	0,92	1,48	1,97	*O. sativa*
2	Q9FZK1	52788	F-Box Protein 6	Ubikuitinasyon ve Stres Yanıtı	Nukleus	3,98	4,91	3,45	3,4	1	4,22	2,65	3,33	4,26	*A. thaliana*
3	Q05800	43889	Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	1,52	2,87	1,73	1,67	1	0,93	0,57	1,25	0,36	*Nelumbo lutea*
4	P82536	4879	Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20	Şapreon Protein	Kloroplast	1,01	0,82	0,91	0,64	1	1,49	0,91	1,35	0,84	*Spinacia oleracea*
5	Q9SDD6	20861	Peroksiredoksin 2-F	Antioksidan Aktivite	Mitokondri	1,49	1,23	1,18	1,26	1	1,92	1,42	1,18	0,57	*O. sativa*

Spot No	Aksesyon Numarası	Protein Kütlesi (kDa)	Proteinler	İşlev	Lokalizasyon	B0T0	B1T0	B2T0	B0T1	B1T1*	B2T1	B0T2	B1T2	B2T2	Organizma
6	O65572	60869	Karotenoid 9-10 Oksijenaz	Aba Biyosentezi ve Stres Yanıtı	Sitoplazma	0,79	0,57	0,48	1,1	1	1,99	0,92	1,48	1,97	*A. thaliana*
7	P46226	26910	Trioz-fosfat izomeraz Sitozolik	Enerji Metabolizması	Sitoplazma	0,57	1,24	1,55	0,75	1	1,36	0,89	0,92	0,54	*Secale cereale*
8	Q00434	27253	Oksijen Evolving Enhancer Protein 2	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	0,74	1,12	1,01	0,93	1	1,03	0,71	0,82	0,76	*T. aestivum*
9	Q8W0W4	22467	TATA Bağlayıcı Protein 2	Protein Sentezi	Nükleus	0,72	0,58	0,9	0,96	1	1,05	0,75	0,85	0,80	*O. sativa*
10	P08823	57485	Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	0,16	0,47	0,88	0,16	1	1,16	0,55	1,13	1,23	*T. aestivum*
11	Q43831	53379	Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	0,19	0,79	0,6	0,24	1	0,91	0,34	1,07	0,4	*Secale cereale*

Spot No	Aksesyon Numarası	Protein Kütlesi (kDa)	Proteinler	İşlev	Lokalizasyon	B0T0	B1T0	B2T0	B0T1	B1T1*	B2T1	B0T2	B1T2	B2T2	Organizma
12	Q01587	45681	Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	1,49	1,23	1,18	1,26	1	0,35	1,42	1,18	0,57	*Cucumis sativus*
13	P26667	19120	Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	0,38	0,44	0,48	0,47	1	0,49	0,58	0,81	0,46	*A. thaliana*
14	Q9ZP21	35878	Tiyoredoksin M	Antioksidan Aktivite	Kloroplast	0,94	0,57	1,18	1,04	1	1,23	0,37	1,59	1,97	*T. aestivum*
15	P46226	26910	Trioz-fosfat izomeraz Sitozolik	Enerji Metabolizması	Sitoplazma	0,42	0,96	1,56	0,86	1	1,48	1,19	1,14	0,72	*Secale cereale*
16	P26667	19405	Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi	Fotosentez Mekanizması	Kloroplast	1,71	4,10	1,88	1,8	1	0,74	0,52	1,32	0,39	*A. thaliana*
17	P85814	8930	Trioz-fosfat izomeraz Sitozolik	Enerji Metabolizması	Sitoplazma	0,55	1,29	1,67	0,47	1	1,39	0,72	0,68	0,49	*Platanus orientalis*

***B1T1=Kontrol=1**

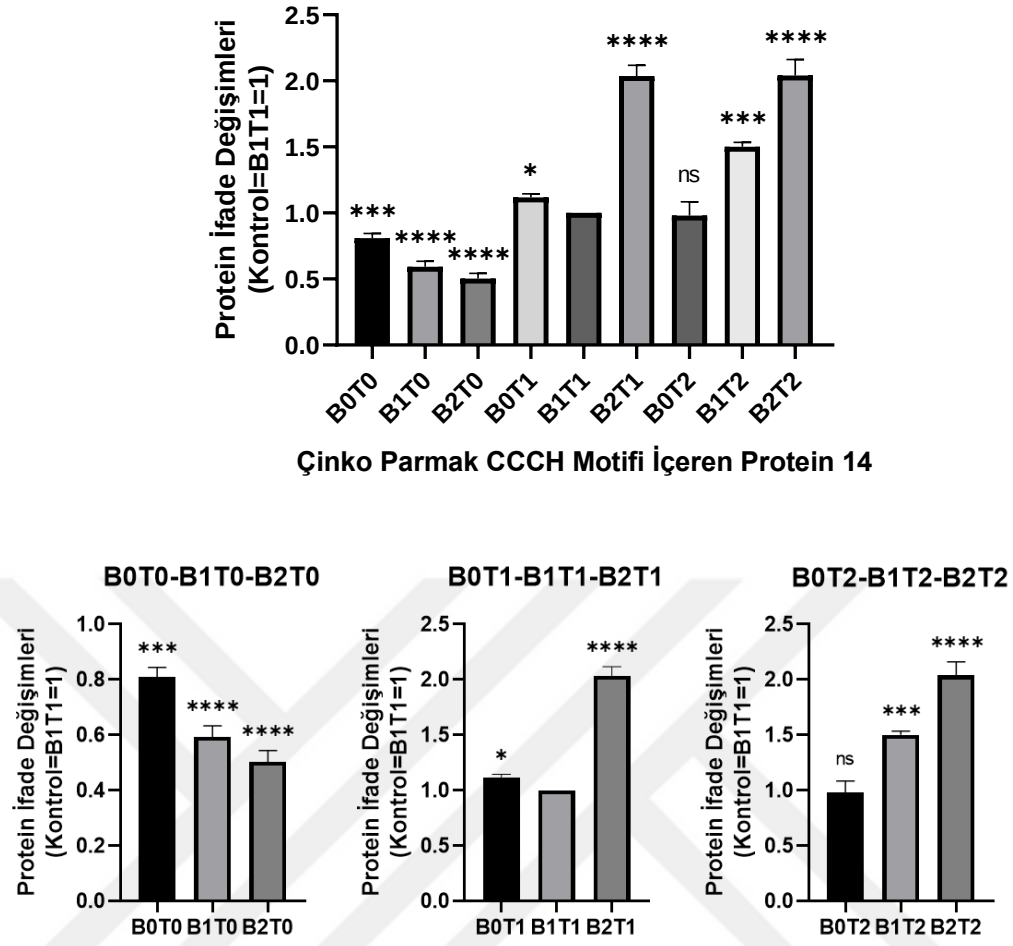
Seçilen 17 spottan 14 tanesinin farklı proteinlere ait oldukları belirlenmiştir. Spot 7,15 ve 17 aynı protein ile eşleştikleri; spot 13 ve 16'nın da aynı proteinle eşleştikleri belirlenmiştir.

4.4.1. Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14'e Ait Sonuçlar

Spot 1 olarak analiz edilen protein spotunun Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14 ile eşleştiği görülmüştür. 2-D jel elektroforezi sonucunda elde edilen jellere göre Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14 proteinin ifade miktarı tüm deneme örneklerinde değerlendirilmiş olup, ifade farklılıkları Şekil 4.4'te verilmiştir.

Bu spota ait en fazla ifade artışı yüksek bor uygulanan örneklerde 100 mM ve 250 mM NaCl uygulanan bitki örneklerinde gözlenirken B ve tuz noksanlık koşullarında ve B noksanlık ve yüksek tuz uygulanan bitki örneklerinde kontrolün altında ifade değerleri belirlenmiştir. Tuz noksanlığı uygulanan bitkilerde bor konsantrasyonunun artışına paralel olarak protein ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu uygulanan T1 yetiştirme koşulunda ise bor konsantrasyon noksanlığında dahi kontrolün üzerinde protein ifadesi saptanmış olup, B2T1 uygulamasında en yüksek protein ifadesi saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonda tuz uygulanan bitkilerin kombine stres konsantrasyonu olarak B noksanlığının uygulandığı örneklerde kontrole göre protein ifadesinin azaldığı ancak B konsantrasyonunun artışına paralel olarak seçilen proteinin ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir.

.



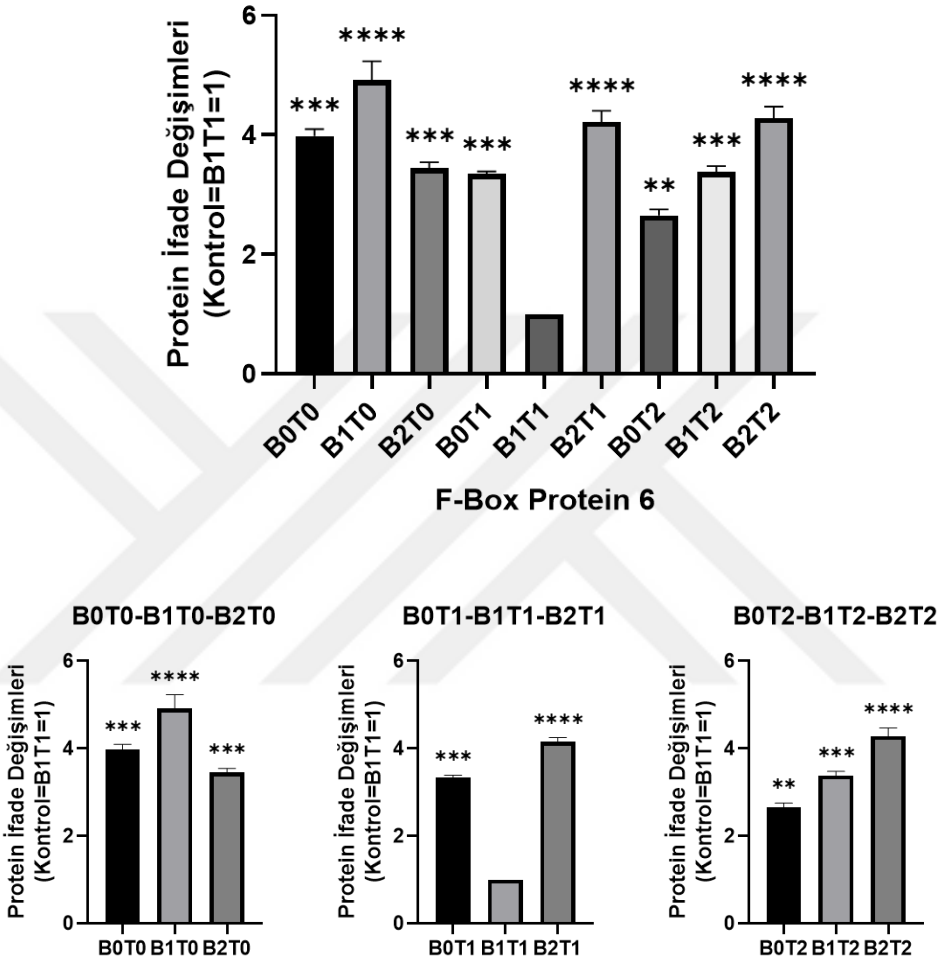
Şekil 4.4 Spot 1 olarak eşleşen Çinko Parmak CCCH Motifi İçeren Protein 14'ün ifade değişimleri

4.4.2. F-Box Protein 6'ya Ait Sonuçlar

Spot 2 olarak analiz edilen protein spotunun F-Box protein ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup tüm muamelelerde protein ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Tuz ve B noksanlığı uygulanan bitkiler (B0T0) ve tuz noksanlığı ve yüksek B konsantrasyonlarında (B2T0) stres koşulunda yetiştirilen bitkilerde, spot 2 olarak belirlenen proteinin ifadesinin kontrol örnelerine göre en az 3 kat artış gösterdikleri tespit edilmiştir. Optimum tuz konsantrasyonunun uygulandığı bitki örneklerinde B konsantrasyonunun artışına paralelel olarak protein ifadesinde de artış gözlenmiştir. B noksanlık uygulanan bitki örneklerinde de spot 2 olarak eşleşen F-box proteinin ifadesinin kontrole göre 3.4 katlık bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Yüksek tuz

konsantrasyonun uygulandığı T2 bitkilerinde ise yine tüm muamelelerde protein ifadesinin kontrolün üzerinde olduğu ve B konsantrasyonunun artışına paralel olarak protein ifadesinin artış gösterdiği gözlenmiştir.

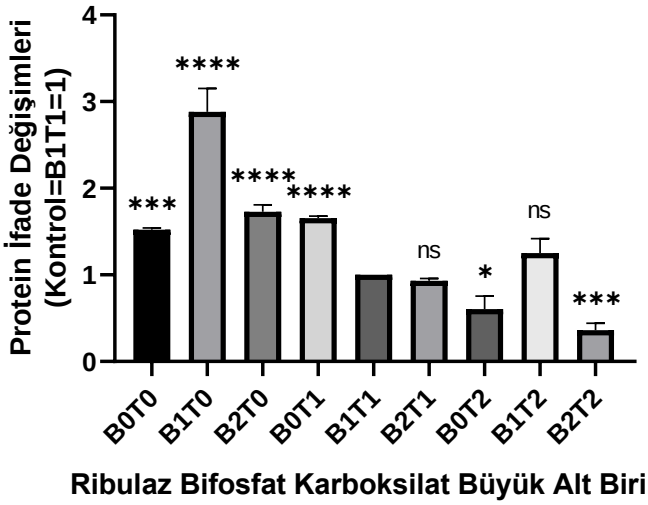


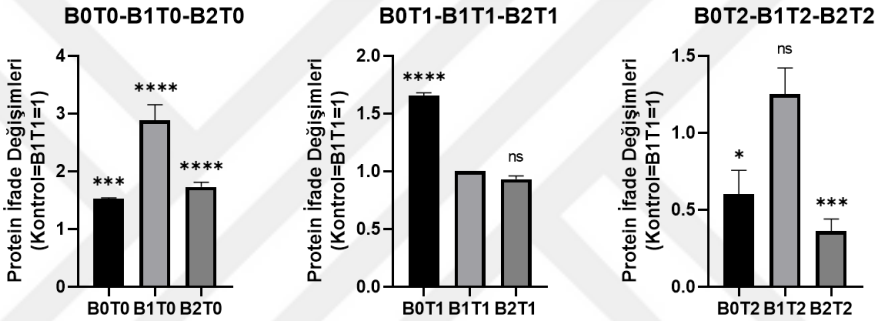
Şekil 4.5 Spot 2 olarak eşleşen F-Box Protein 6'nın ifade değişimleri

4.4.3. Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar

Spot 3 olarak analiz edilen protein spotunun Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol grubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.6'da verilmiştir.

Kontrol grubuna göre en yüksek protein ifadesi tuz noksanlığı uygulanan B1T0 dozunda ve kontrole göre 2,87 katlık bir artış ile tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda B ve tuz uygulanan B2T2 bitkilerinde ise kontrole göre protein ifadesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$). Tuz noksanlığı uygulanan bitkilerde, optimum bor konsantrasyonuna kıyasla Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi proteinin ifadesinde kontrole göre her iki stres etmeni açısından noksanlık uygulamasında (B0T0) 1,52 B1T0 dozunda 2,87 yüksek konsantrasyonda B kombinasyonu uygulanan bitki örneklerinde ise 1,73 katlık artış gözlenmiştir. Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi proteini sadece bor noksanlığı (B0T1) uygulanan örneklerde kontrole göre 1,67 kat bir atış gözlenirken yüksek B uygulanan bitki örneklerinde protein ifadesinin kontrol bitkilerine göre azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerden sadece optimum B konsantrasyonu ile kombine stres uygulanan bitki örneklerinde kontrole göre protein ifadesinde artış saptanırken; B noksanlık ve yüksek konsantrasyonda B uygulanan *P. distans* bitkilerinde protein ifadelerinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir





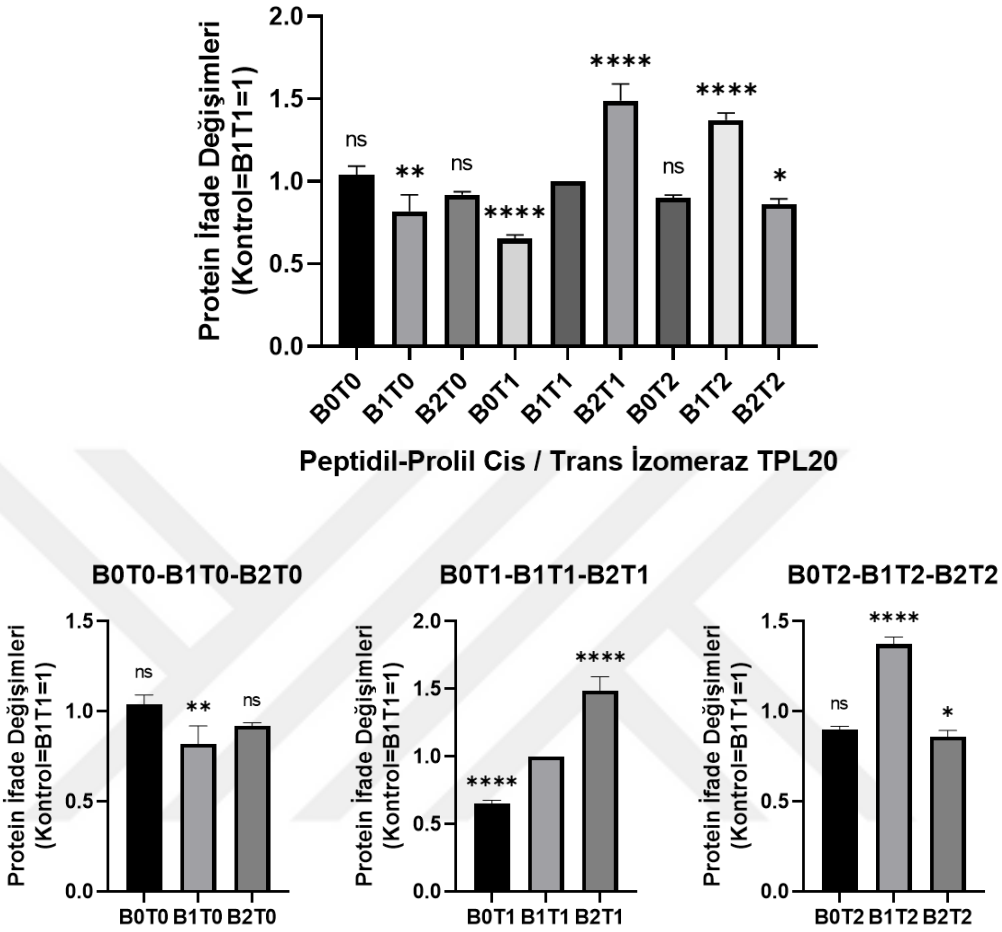
Şekil 4.6 Spot 3 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilat Büyük Alt Birimi'nin ifade değişimleri

4.4.4. Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20'ye Ait Sonuçlar

Spot 4 olarak analiz edilen protein spotunun Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20 proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.7'de verilmiştir.

T0 grubunda Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20 proteinin ifadesinin B ve tuz noksanlık uygulama grubunda kontrole eş bir ifade belirlenmiş olup B1T0 ve B2T0 denemelerinde kontrole göre protein ifadesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu uygulandığında ise Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20 proteininde bor noksanlığında kontrole göre protein ifadesinin azaldığı ancak yüksek B konsantrasyonunda proteinin ifadesinin kontrole göre 1,49 kat arttığı gösterilmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonunda stres uygulaması yapılan bitkiler arasında ise sadece optimum B konsantrasyonu ile kombine stres uygulanan B1T2

deneme grubundaki bitki örneklerinde protein ifadesinin kontrole göre 1,35 kat artış gösterdiği belirlenmiştir



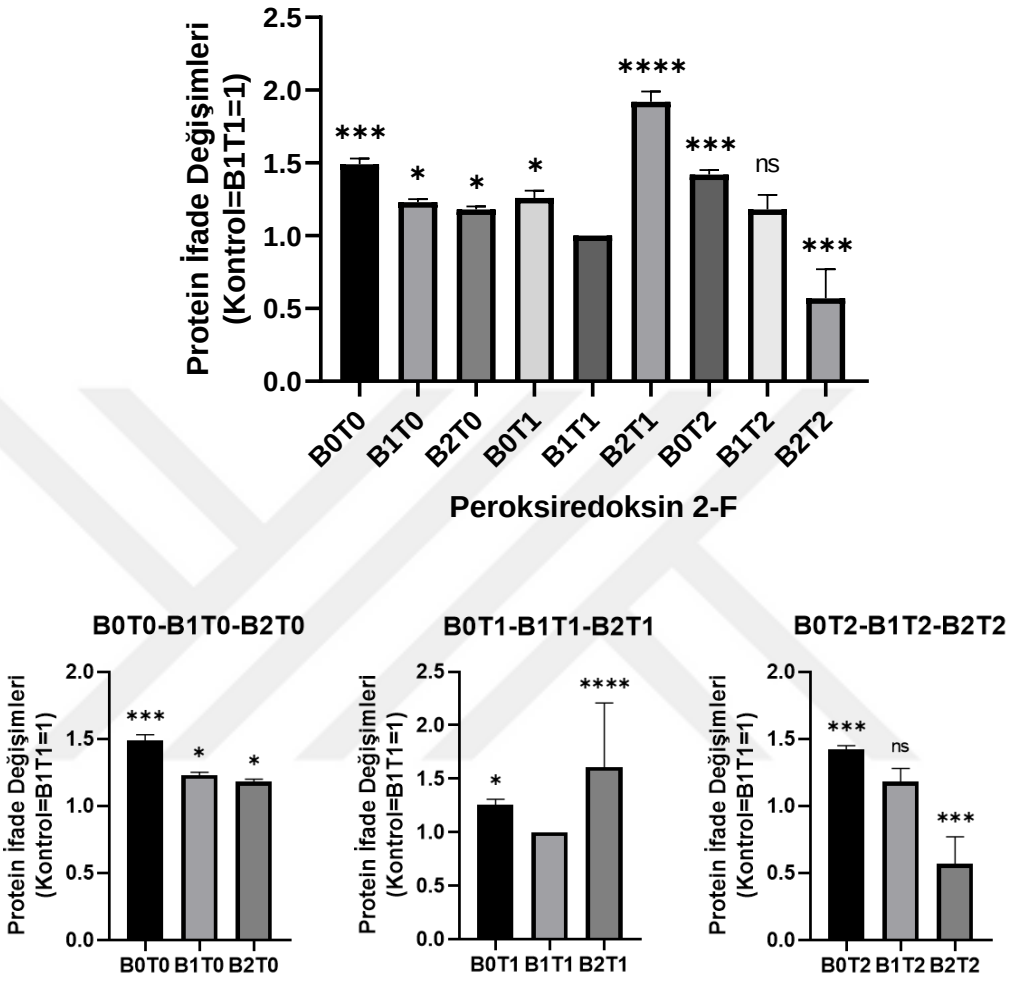
Şekil 4.7 Spot 4 olarak eşleşen Peptidil-Prolil Cis / Trans İzomeraz TPL20'nin ifade değişimleri

4.4.5. Peroksiredoksin 2-F'e Ait Sonuçlar

Spot 5 olarak analiz edilen protein spotunun Peroksiredoksin 2-F proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.8 Spot 5 olarak eşleşen Peroksiredoksin 2-F'nin ifade değişimleriŞekil 4.8'de verilmiştir.

Peroksiredoksin 2-F proteinin kontrol grubuna göre en yüksek ifadeleri B noksanlık kombine stres uygulamalarında saptanmıştır. 1,49 ve 1,42 katlık artışlar sırasıyla tuz noksanlık ve yüksek tuz uygulaması yapılan kombine stres gruplarında görülmüştür. Tuz noksanlığı koşullarında yetiştirilen bitkilerde kombine B uygulamalarının tümünde protein ifadesinin kontrol grubunun üzerinde olduğu görülmüştür. 100 mM

tuz uygulamasının yapıldığı ve B noksanlık ve yüksek B konsantrasyonundaki kombine stres koşullarında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde protein ifadelerinin artış gösterdiği ve bu artışın B konsantrasyonunun artmasıyla ilişkili olduğu gözlenmiştir.



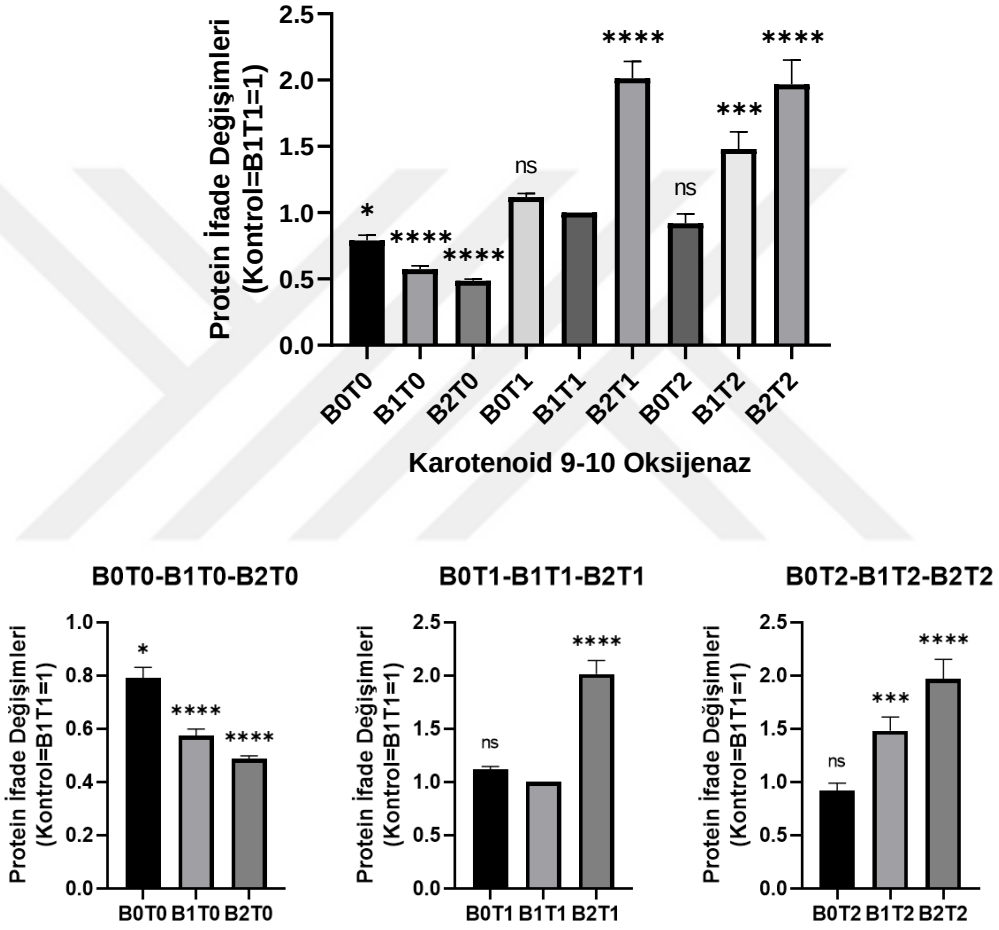
Şekil 4.8 Spot 5 olarak eşleşen Peroksiredoksin 2-F'nin ifade değişimleri

4.4.6. Karotenoid 9-10 Oksijenaz'a Ait Sonuçlar

Spot 6 olarak analiz edilen protein spotunun Karotenoid 9-10 Oksijenaz proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.9'da verilmiştir.

En yüksek karotenoid 9-10 oksijenaz proteini ifadesi yüksek B konsantrasyonu uygulanan bitki örneklerinde gözlenmiştir. 4 mM yüksek B uygulanan ve sırasıyla 100 mM ve 250 mM tuz uygulaması yapılan bitkilerde kontrole göre sırasıyla protein ifadesinin 1,99 ve 1,97 katlık bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Tuz noksanlığı uygulanan *P. distans* bitkilerinde, kombine B stresi uygulamalarıyla protein ifadesinin

kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu uygulanan bitkilerde ise B noksanlık kombinasyonunda saptanan protein ifadesinin kontrol grubundan farklılık göstermediği ve B konsantrasyonunun artması ile protein ifadesinin kontrolün 2 katına çıktığı gözlenmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonun ve optimum B konsantrasyonu uygulanan bitkiler ile yüksek B konsantrasyonu ile kombine stres uygulanan bitki örneklerinde protein ifadesinin kontrole göre sırasıyla 1.48 ve 1.97 katlık artış gösterdiği belirlenmiştir.



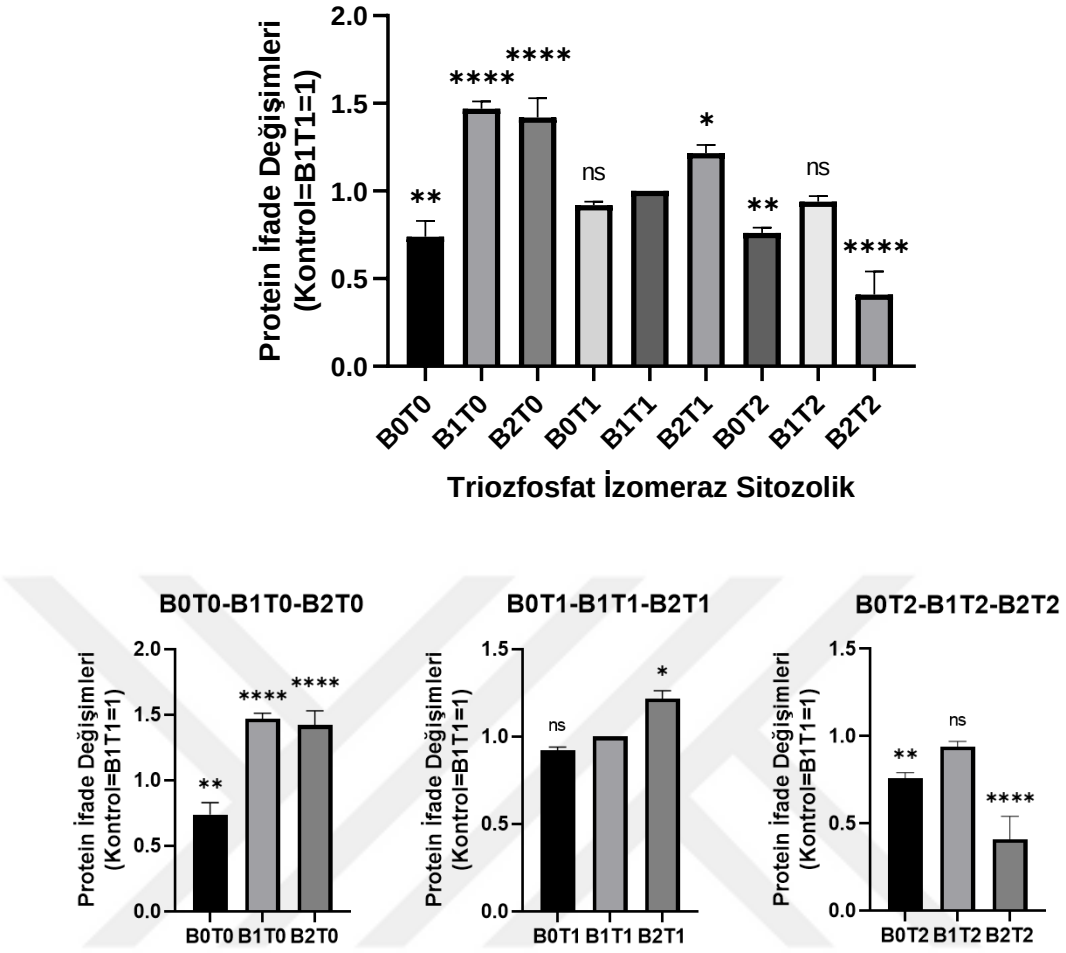
Şekil 4.9 Spot 6 olarak eşleşen Karotenoid 9-10 Oksijenaz'ın ifade değişimleri

4.4.7. Triozfosfat İzomeraz'a Ait Sonuçlar

Spot 7 olarak analiz edilen protein spotunun sitozolik Triozfosfat İzomeraz proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.10'da verilmiştir.

Sitozolik Triozfosfat İzomeraz proteinin ifadesinin tuz noksanlığı koşulunda B konsantrasyonunun artışı ile değiştiği görülmüştür. Tuz noksanlığı koşulunda 30 µM ve 4 mM B kombine stres deneme gruplarında kontrole göre protein ifadesinin sırasıyla 1,24 ve 1,55 kat artış gösterdikleri görülmüştür. 100 mM tuz uygulaması yapılan ve B noksanlık koşulunda uygulanan kombine strese maruz kalan *P. distans* bitkilerinde protein ifadesinin kontrole göre azaldığı ancak yüksek B konsantrasyonu ile kombine strese maruz kalan bitki örneklerinde ise protein konsantrasyonunun kontrol grubu bitkilerine göre 1,36 kat artış gösterdikleri saptanmıştır. Yüksek tuz konsantrasyonu ile uygulanan tüm B stres örneklerinde de protein ifadesinde kontrole göre azalma olduğu gözlenmiştir.

.



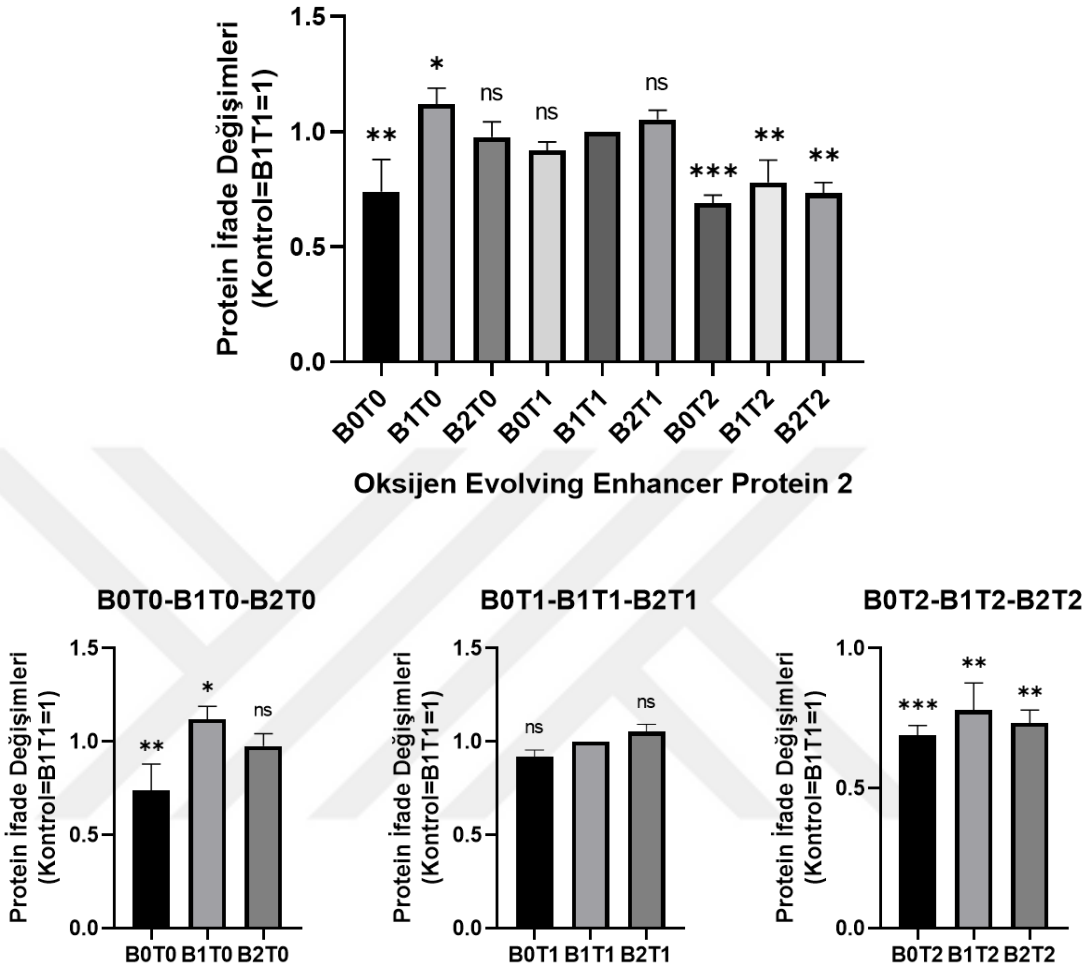
Şekil 4.10 Spot 7 olarak eşleşen sitozolik Triozfosfat İzomeraz'ın ifade değişimleri

4.4.8. Oksijen Evolving Enhancer Protein 2'ye Ait Sonuçlar

Spot 8 olarak analiz edilen protein spotunun Oksijen Evolving Enhancer Protein 2 ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.11'de verilmiştir.

Tuz noksanlık koşulu ile artan konsantrasyonlardaki B uygulamalarında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde oksijen evolving enhancer protein 2'nin ifadesinde kontrole göre anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. B noksanlık koşulunda ise protein ifadesinin kontrole göre azaldığı görülmüştür. 100mM tuz konsantrasyonu ile yüksek konsantrasyonda B uygulaması yapılan bitkilerin protein ifadesinin kontrolden anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki tuz uygulaması ile tüm farklı B konsantrasyonlarının uygulandığı kombine stres denemelerine ait bitki

örneklerinde oksijen evolving enhancer protein 2'nin ifadesinin kontrole göre azaldığı belirlenmiştir.



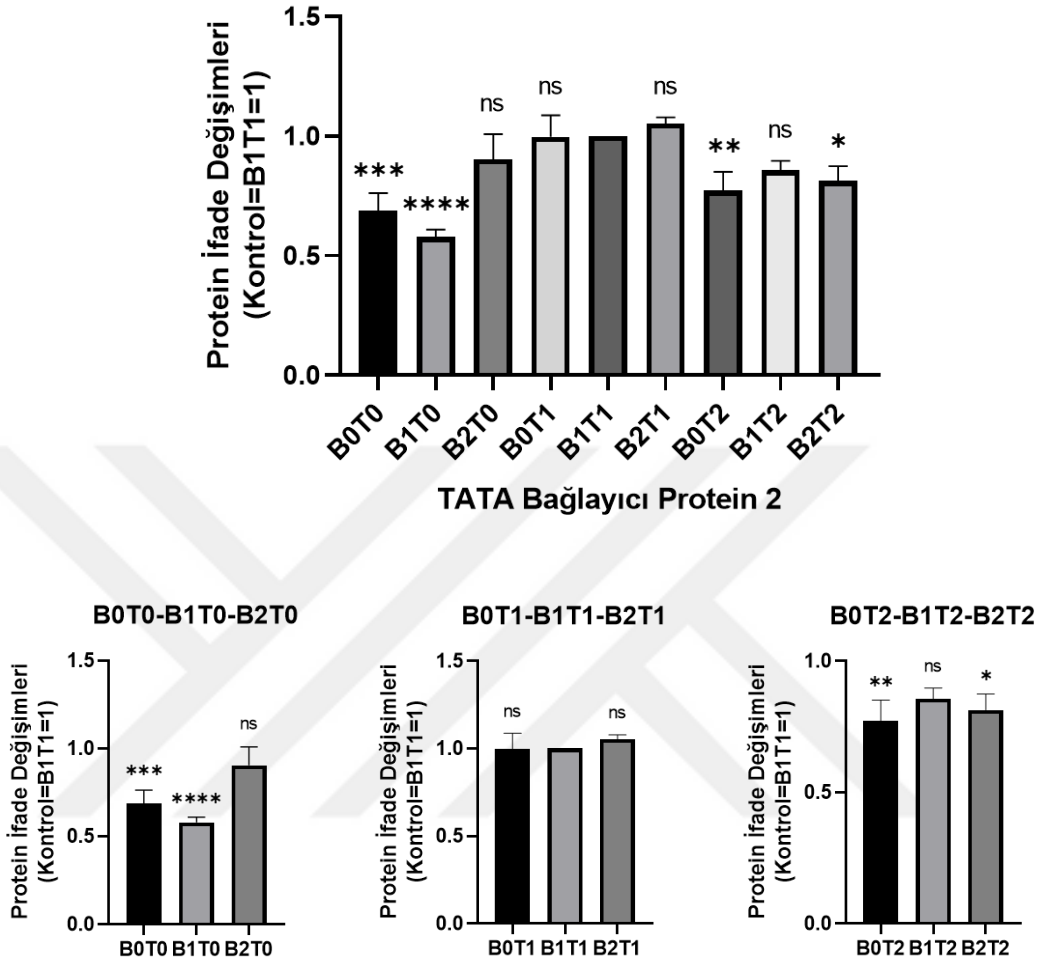
Şekil 4.11 Spot 8 olarak eşleşen Oksijen Evolving Enhancer Protein 2'nin ifade değişimleri

4.4.9. TATA Bağlayıcı Protein 2'ye Ait Sonuçlar

Spot 9 olarak analiz edilen protein spotunun TATA Bağlayıcı Protein 2 ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.12'de verilmiştir.

Tuz noksanlık koşulunda kombine edilen tüm B kondisyonlarında yetişen *P. distans* bitkilerinde TATA bağlayıcı protein 2'nin kontrol grubuna göre azalma profili gösterdikleri belirlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu uygulanan T1 sersinde ise tüm B uygulamalarında protein ifade değişimlerinin kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermedikleri görülmüştür. Yüksek tuzluluk ile kombine kullanılan tüm B

konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerde kontrol grubuna göre TATA Bağlayıcı Protein 2 proteinin ifadesinde kontrole göre azalış profili saptanmıştır.



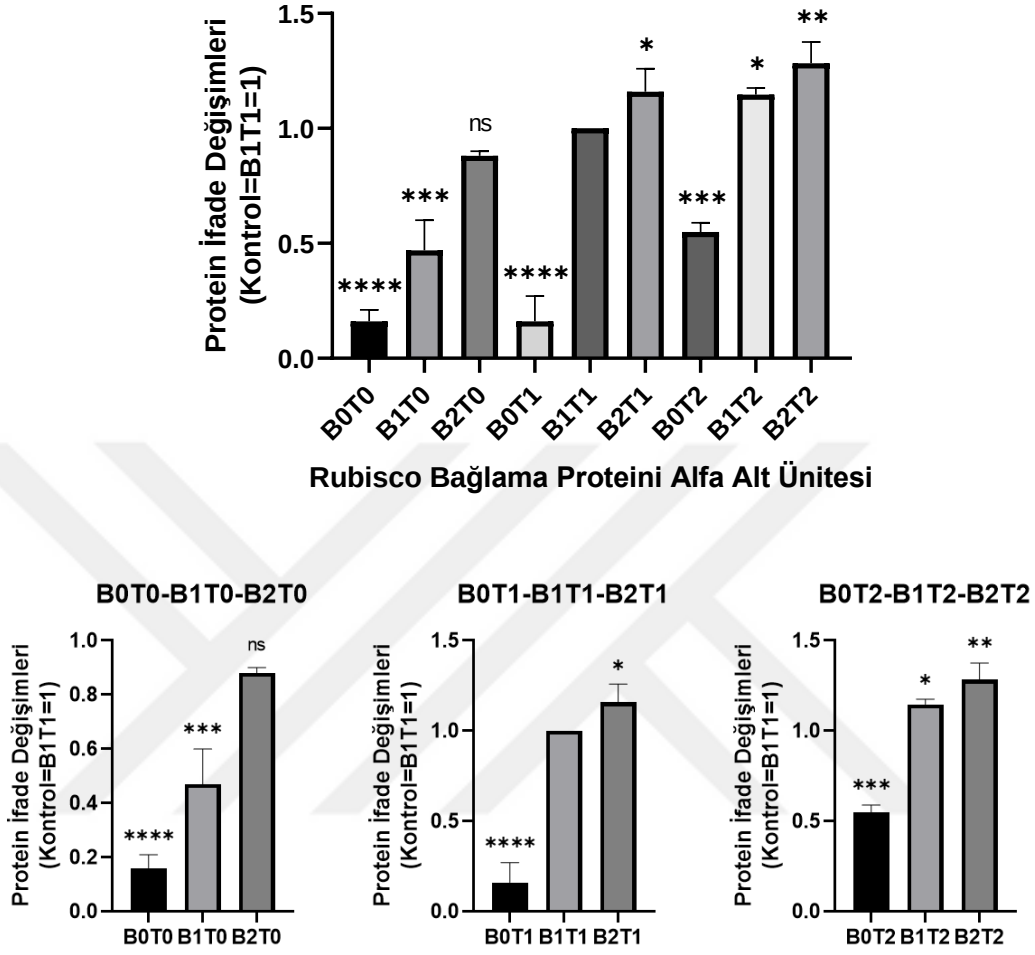
Şekil 4.12 Spot 9 olarak eşleşen TATA Bağlayıcı Protein 2'nin ifade değişimleri

4.4.10. Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi'ne Ait Sonuçlar

Spot 10 olarak analiz edilen protein spotunun Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.13'te verilmiştir.

Tuz noksanlık koşulunda birlikte uygulanan B konsantrasyonuna bağlı olarak yetiştirilen tüm *P. distans* bitkilerinde Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi'nin ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu ve yüksek konsantrasyonda B stresi uygulamasına maruz bırakılan bitkilerde protein ifadesinin kontrolün üzerine çıktığı görülmüştür. Yüksek tuz

konsantrasyonu ile uygulanan 30µM ve 4 mM B kombine stres uygulamalarında protein ifadelerinin sırasıyla 1,13 ve 1,23 kat artış gösterdiği belirlenmiştir.

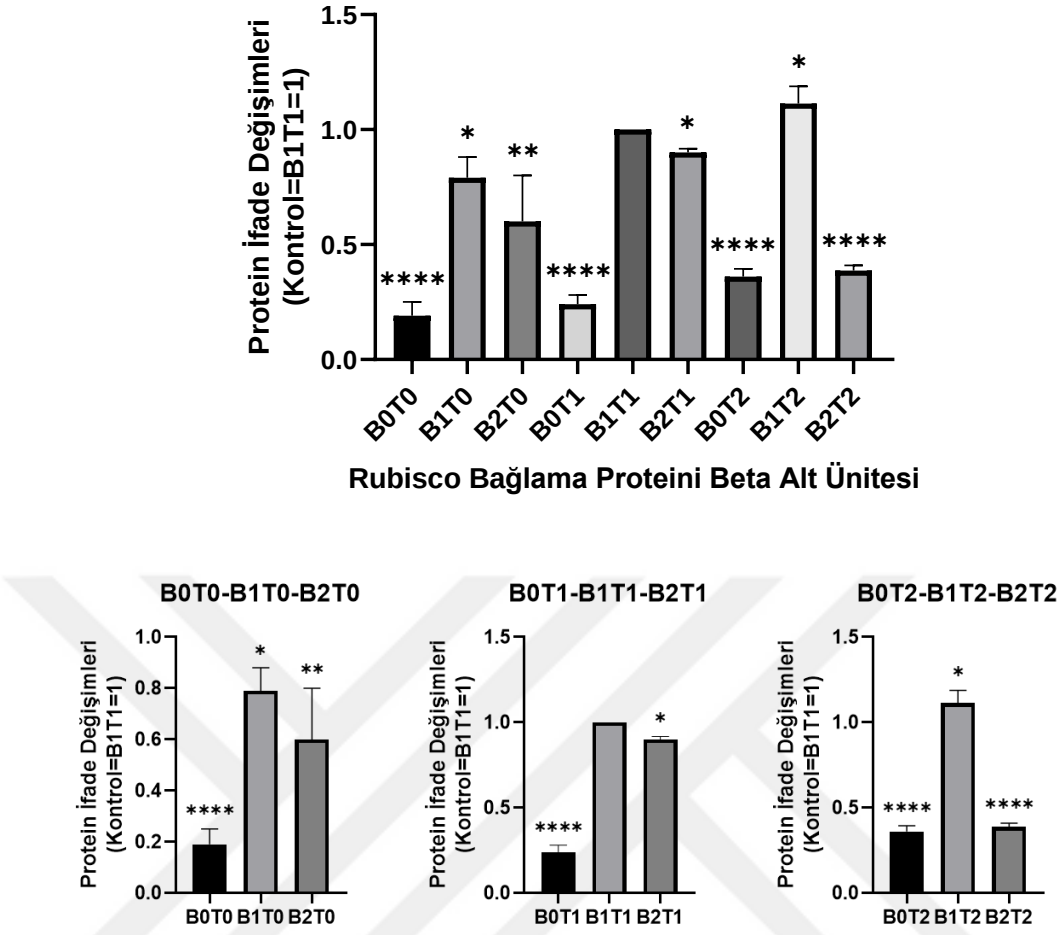


Şekil 4.13 Spot 10 olarak eşleşen Rubisco Bağlama Proteini Alfa Alt Ünitesi'nin ifade değişimleri

4.4.11. Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi'ne Ait Sonuçlar

Spot 11 olarak analiz edilen protein spotunun Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.14'te verilmiştir.

Tuz noksanlık ve optimum tuz koşullarıyla birlikte kombine edilen tüm B stresi uygulamalarında, Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi'nin ifadesinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görülmüştür. Yüksek tuz konsantrasyonu ve 30 µM B kombine (B1T2) uygulamasında belirlenen protein ifadesinin kontrolden anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür.



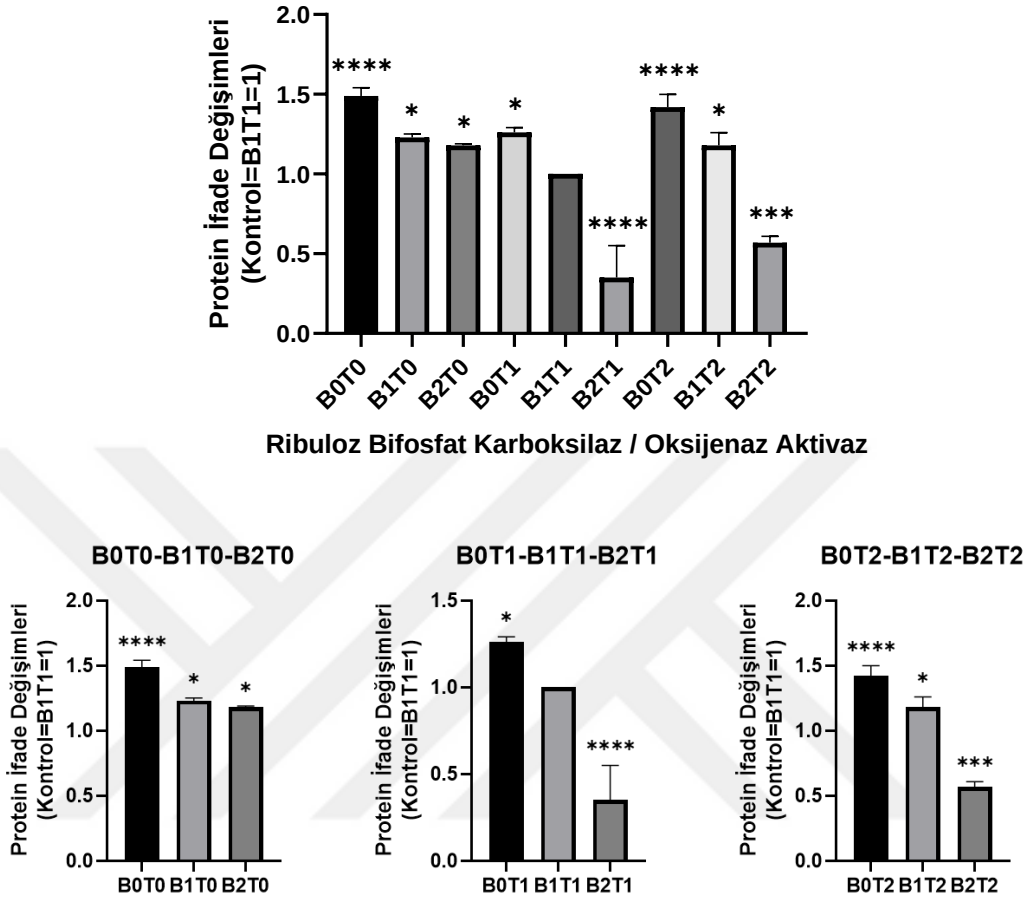
Şekil 4.14 Spot 11 olarak eşleşen Rubisco Bağlama Proteini Beta Alt Ünitesi'nin ifade değişimleri

4.4.12. Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz'a Ait Sonuçlar

Spot 12 olarak analiz edilen protein spotunun Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.15'te verilmiştir.

Tuz noksanlığı koşulu ile kombine olarak kullanılan tüm B konsantrasyonlarında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz proteininin ifadesinde kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir. Optimum tuz konsantrasyonu ve B noksanlık koşulunun sağlandığı stres ortamında yetiştirilen bitkilerde protein ifadesinin 1,26 kat artış gösterdiği gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda tuz ile uygulanan B noksanlık ve optimum B kombine stres uygulamalarına maruz bırakılan *P. distans* bitkilerinde protein ifadelerinin kontrole

göre anlamlı artış gösterdikleri saptanırken, yüksek B konsantrasyonu uygulanan stres grubunda yetiştirilen bitkilerde protein ifadesinin kontrole göre azaldığı gösterilmiştir.



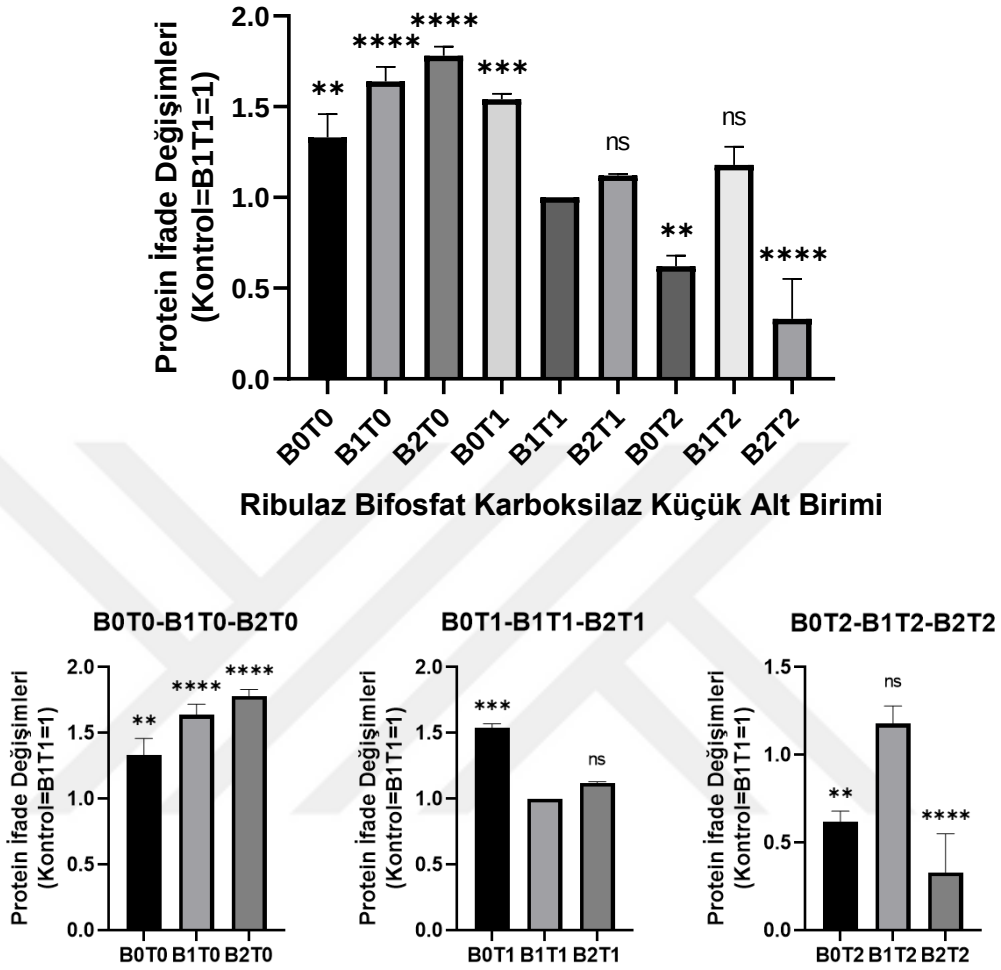
Şekil 4.15 Spot 12 olarak eşleşen Ribuloz Bifosfat Karboksilaz / Oksijenaz Aktivaz'ın ifade değişimleri

4.4.13. Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar

Spot 13 olarak analiz edilen protein spotunun Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.16'da verilmiştir.

Noksanlık ve optimum tuz koşullarıyla birlikte kullanılan tüm B koşullarında protein ifadesinin kontrole göre artış gösterdikleri belirlenmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonu ile kombine uygulanan B noksanlık ve yüksek konsantrasyonda B içeren ortamlarda yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde protein ifadesinin kontrole göre azaldığı ancak

optimum B ile kombinasyon koşulunda yetişen bitkilerin protein ifadelerinin kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir.



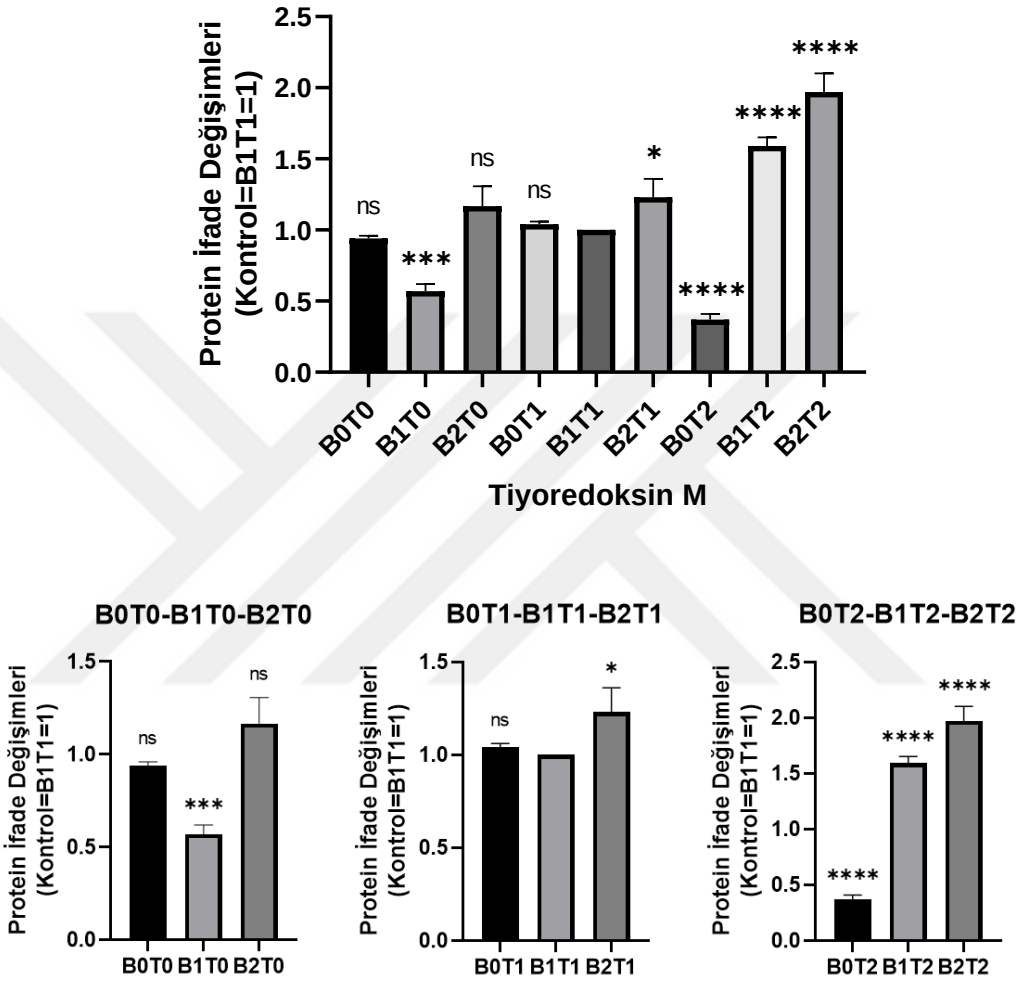
Şekil 4.16 Spot 13 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'nin ifade değişimleri

4.4.14. Tiyoredoksin M'e Ait Sonuçlar

Spot 14 olarak analiz edilen protein spotunun Tiyoredoksin M ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.17'de verilmiştir.

Tuz noksanlığı ve yüksek konsantrasyonda B kombine stres uygulamasındaki bitkilerde Tiyoredoksin B protein ifadesinin kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir. 100 mM Tuz uygulaması ile kullanılan B noksanlık ve yüksek B kombine uygulamalarındaki protein ifadelerinin de kontrolün üzerinde oldukları gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda tuz uygulaması ile B noksanlık koşullarında yetişen

bitkilerin protein ifadelerinin kontrole göre azalma gösterdiği ancak protein ifadesinin B konsantrasyonunun artması ile kontrole göre sırasıyla 1,59 ve 1,97 kat artış gösterdikleri belirlenmiştir.



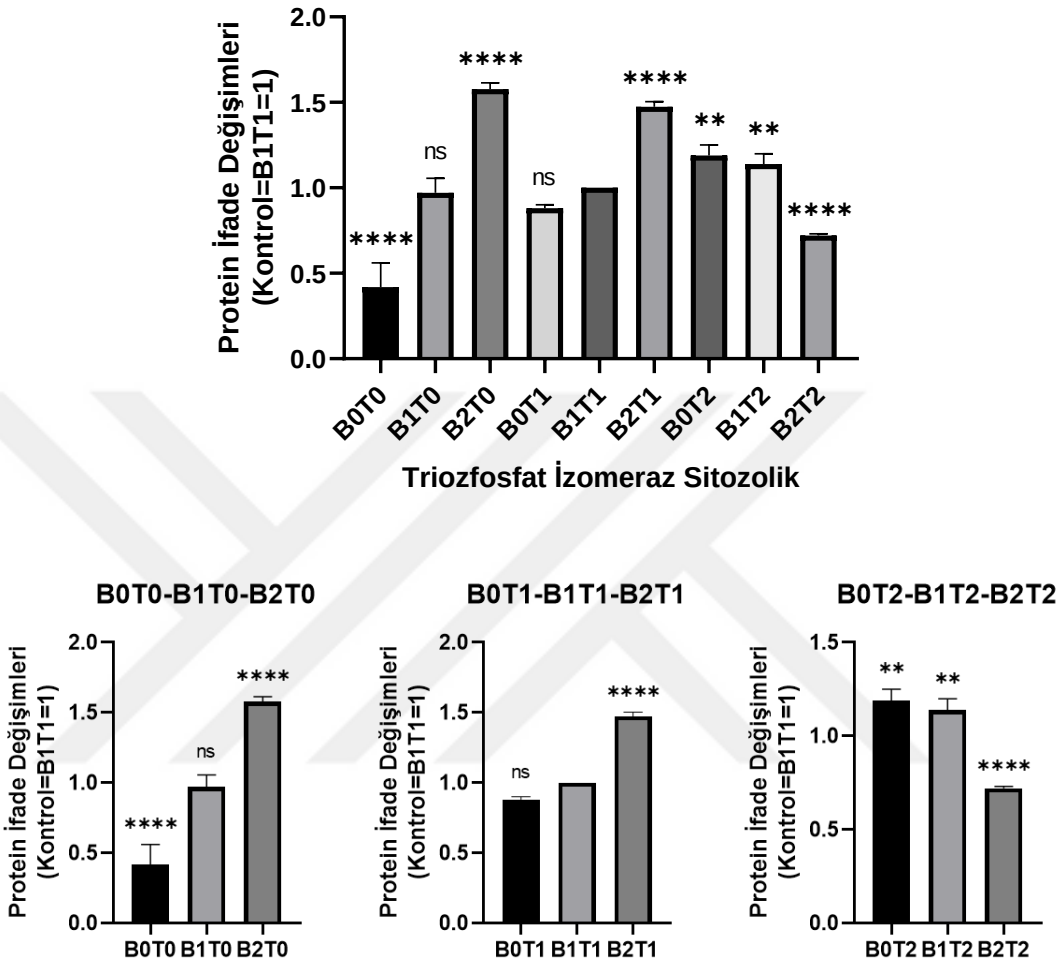
Şekil 4.17 Spot 14 olarak eşleşen Tiyoredoksin M'nin ifade değişimleri

4.4.15. Trioz-fosfat izomeraz'a Ait Sonuçlar

Spot 15 olarak analiz edilen protein spotunun sitozolik Trioz-fosfat izomeraz proteini ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.18'de verilmiştir.

Yüksek B konsantrasyonu ile kombine edilen tuz noksanlık ve optimum tuz konsantrasyonundaki stres uygulamalarına maruz kalan *P. distans* bitkilerinde sitozolik Trioz-fosfat izomeraz protein ifadelerinde kontrole göre artış saptanmıştır.

Yüksek tuz konsantrasyonu ile kombine kullanılan B noksanlık ve 30 µM B stres koşullarında protein ifadesinin kontrole göre artış gösterdiği yüksek B koşullarında ise protein ifadesinin kontrole göre azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir.



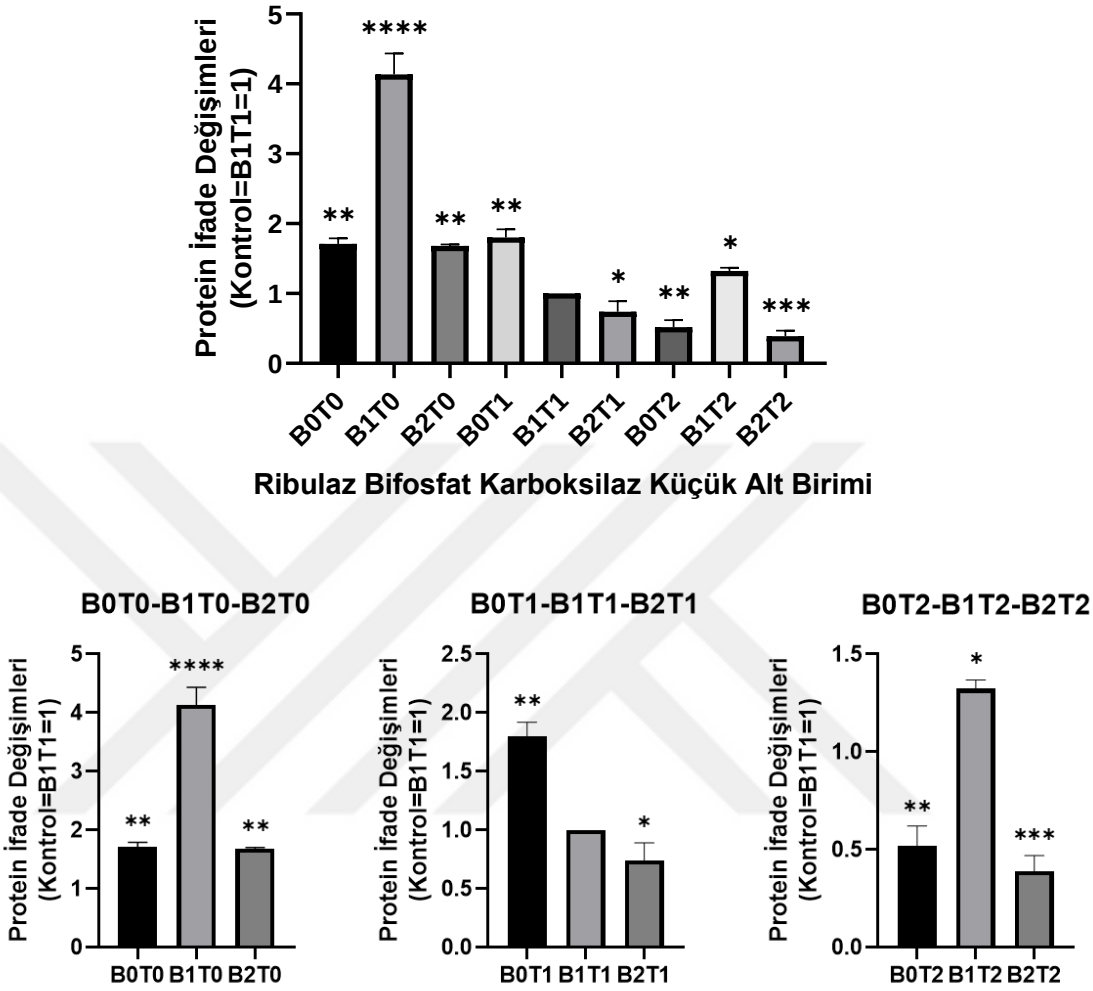
Şekil 4.18 Spot 15 olarak eşleşen sitozolik Trioz-fosfat izomeraz'ın ifade değişimleri

4.4.16. Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'ne Ait Sonuçlar

Spot 16 olarak analiz edilen protein spotunun Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.19'da verilmiştir.

B2T1, B0T2 ve B2T2 kodlu *P. distans* bitkileri haricinde diğer tüm kombine stres uygulamasında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi ile eşleşen protein ifadesinin kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir.

Kontrol grubuna göre en belirgin artışın tuz noksanlığı ile kombine edilen optimum B kondisyonunda olduğu ve kontrole göre 4 kat artış gösterdiği görülmüştür.

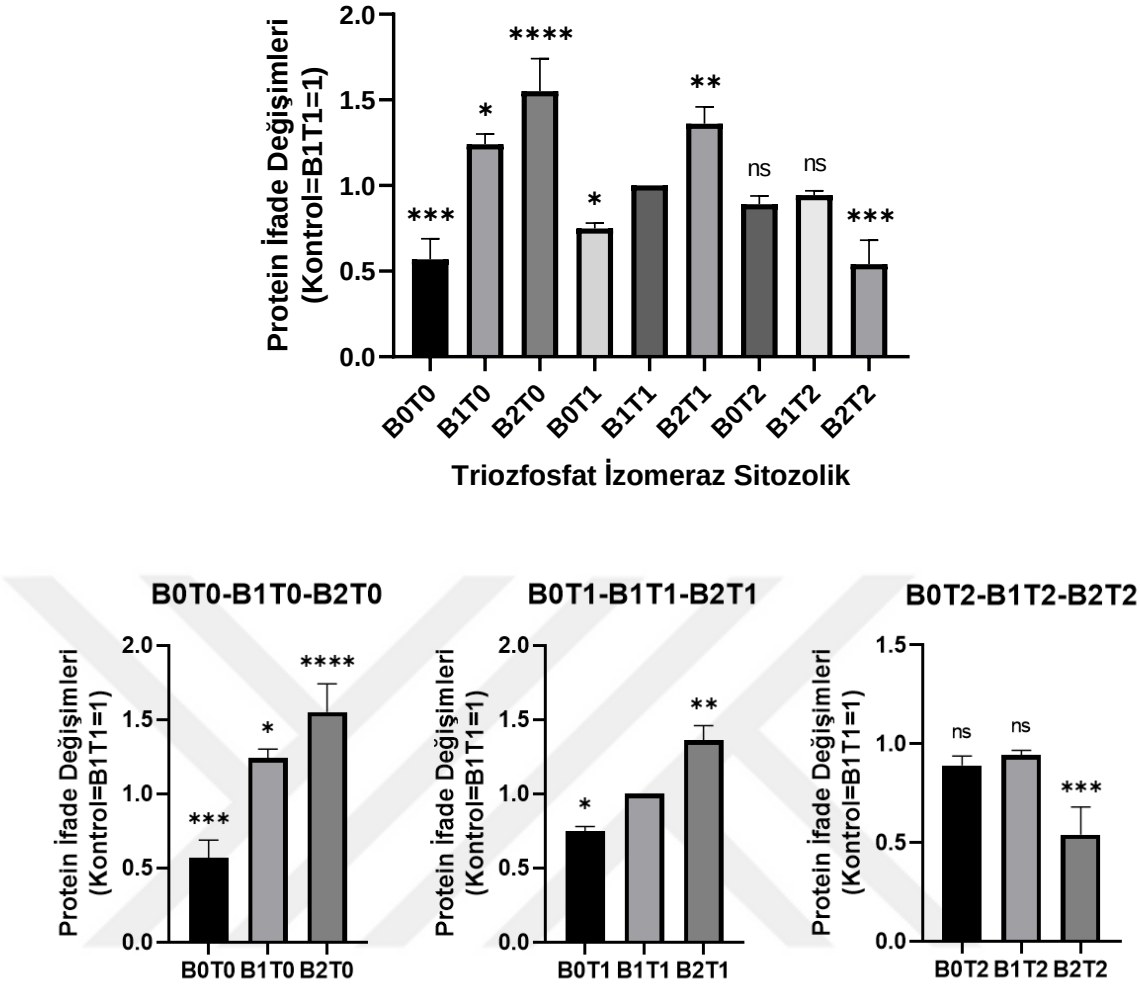


Şekil 4.19 Spot 16 olarak eşleşen Ribulaz Bifosfat Karboksilaz Küçük Alt Birimi'nin fade değişimleri

4.4.17. Trioz-fosfat izomeraz'a Ait Sonuçlar

Spot 17 olarak analiz edilen protein spotunun sitozolik Trioz-fosfat izomeraz ile eşleştiği görülmüştür. Tüm deneme gruplarında protein ifade farklılıkları kontrol gurubu olan B1T1 grubuna göre değerlendirilmiş olup Şekil 4.20'de verilmiştir.

Optimum ve yüksek B konsantrasyonları ile kombine edilen deneme gruplarında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinde seçilen 17 numaralı protein spotu ile eşleşen sitozolik Trioz-fosfat izomeraz proteinin kontrole göre artış gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.20 Spot 17 olarak eşleşen sitozolik Trioz-fosfat izomerazın fade değişimleri

5. TARTIŞMA

Özellikle son 10 yıl içerisinde bitkiler üzerinde proteomik araştırmaların önemi her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Bugüne kadar genomik araştırmalar büyük bir ilgi odağı olarak görülmesine rağmen bu durum yavaş yavaş değişim göstermektedir. Çoğu bitkinin genom analizleri ve genomik çalışmaları bulunmasına rağmen proteomik bilgileri ise son derece kısıtlıdır. Proteinlerin kantitatif olarak daha yüksek doğrulukla saptanmasına imkân sağlayan proteomik tekniklerin gelişmesi ile, proteomların, bitki gelişimi, biyotik ve abiyotik stresler sırasındaki modülasyonlarını ve etkileşimlerini karakterize etmek için özellikle etkili olmaktadır. Bununla birlikte, gen ekspresyon verileri tek başına incelendiğinde, bitkilerin moleküler yanıtlarının tam olarak anlaşılmasına imkân vermemektedir. Transkripsiyonel çalışmalara ek olarak, mRNA'nın proteinlere dönüştürülmesi, posttranskripsyonel modifikasyonlar ve protein modifikasyonları strese verilen yanıtların düzeyini belirleyen esas düzenleyici mekanizmalar olarak ortaya çıkmaktadır. Genlerin ekspresyon düzeyleri her zaman protein miktarları ile eşit düzeyde değişiklik göstermemektedir. Dolayısıyla, protein ifadesi transkript verilerine bakılarak tahmin edilememektedir. Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarının (PTM'ler) tanımlanması yalnızca proteomik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bizim çalışmamızda iki boyutlu jel elektroforez analizini tercih etmemizin sebebi de stres yanıtı olarak protein değişiminin saptanabilmesine olanak vermesidir [150-153].

Hızla artan dünya nüfüsuna bağlı olarak tarımsal gelişimlerin artan gıda talebine ayak uydurabilmesi için, stresin bitkiler üzerindeki verim azaltıcı etkilerinin daha iyi anlaşılması ve azaltılması için önlemler alınması oldukça önemlidir. Bitki proteomiği oldukça dinamik bir araştırma alanıdır ve her geçen gün protein veri bankalarına yeni proteinler eklenmesine rağmen halen tanımlanmamış binlerce protein bulunmaktadır. Bu doğrultuda bitkilerle yürütülen proteomik çalışmaları ağırlığını model bitkilerden ticari değeri olan bitkilere doğru aktarmaktadır. Proteomik ve özellikle de kantitatif proteomik, stres ve stres toleransıyla ilgili proteinlerin hızlı bir şekilde tanımlanmasına imkan sağlayan güçlü bir stres tolerans araştırması alanı olarak kullanılmaktadır [152, 154].

Bu tez çalışmasının amacı, *Puccinellia distans* bitkilerinde daha önce çalışılmamış olan bor ve tuz noksanlığının yanı sıra bor ve tuz kombine stresinin protemik

yanıtlarının araştırılması ve özellikle, ekstrem toleranslı *Puccinellia distans* bitkilerinin tolerans mekanizmalarında B ile ilişkili olarak ifade farklılığı gösteren proteinlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Yine bu çalışma *P. distans* bitkisinde gerçekleştirilen proteomik çalışmalar arasında kombine stres denemesi olması sebebiyle önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda çeşitli organizmalarla homoloji gösteren farklı metabolik yolaklarda işlev gören 14 faklı protein saptanmıştır. Bu proteinler detaylı olarak tartışılmıştır.

Spot1'in eşleştiği Çinko parmak CCCH motifi içeren protein 14'ün, RNA' ya bağlanarak bitki büyümesi, gelişimi, hormonal değişim, RNA stabilizasyonunda ve özellikle stres yanıtında görev alan birçok genin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Jiang ve diğ. (2017)'nin *Brassica oleracea* bitkisinde yaptıkları çalışmada, aktardıkları C3H-tip çinko parmak geninin yüksek anlatımında bitkilerin tuza karşı toleransında önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde Sun ve diğ. (2007)'nin de *Arabidopsis* bitkisinde yapmış oldukları çalışmada C3H-tip çinko parmak genleri olan AtSZF1 ve AtSZF2'nin tuz uygulaması ile hızlı bir biçimde indüklendikleri ve tuz stresi toleransında son derece önemli oldukları gösterilmiştir. Ayrıca Guo ve diğ. (2009) yaptıkları çalışmada GhZFP1 geninin tuz stresine toleransta önemli rol oynadığını ve böylelikle bu genin abiyotik ve biyotik stres cevabında önemli bir regülatör olarak görev yaptığını ifade etmişlerdir. Bu bulgular çalışmamızdaki CCCH çinko parmak motifi içeren proteinlerin ifadelerinin yüksek tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan *P. distans* bitkilerindeki artışını desteklemektedir. Ayrıca artış gözlenen bitkilerin optimum B (B1) ve yüksek B (B2) kombine stres koşullarında yetiştirilen *P. distans* bitkileri olması da proteinin ifadesinin B konsantrasyonuna paralel olarak artış eğiliminde olduğunu da çalışma kapsamında göstermiştir. CCCH çinko parmak motifi içeren proteinlerin bor uygulaması kapsamında ifadesinin değiştiğini gösteren çok az sayıda çalışma vardır. Lu ve diğ. (2015), CCCH çinko parmak motifi içeren protein 22'nin bor noksanlığına ilişkin bitki cevabında önemli rol oynadığını bildirmiştir [155-162]. Ancak çalışmamızda hem B0T1 hem de B0T2 bitki örneklerinde saptanan protein ifade seviyeleri ile kontrol arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

F-Box protein ailesinin üyeleri E3 ubikütin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. Ubikütin bağımlı proteolizin, hücre döngüsü geçişi, sınıf I antijen işleme, reseptör

aracılı endositoz, transkripsiyonel düzenleme, sinyal transdüksiyonu ve gelişimi dahil çeşitli düzenleyici mekanizmaları modifiye ettiği bilinmektedir. G1 siklinlerini, Cdk inhibitörlerini ve diğer birçok proteini ubikütinlemek için E2 enzimi Cdc34 ile kombinasyon halinde işlev görmektedirler. E3 ubikuitin ligazlarının bileşenleri olarak F-kutusu proteinleri, proteoliz sistemi yoluyla bitki gelişimini ve çeşitli abiyotik stres tepkilerini düzenler. Birkaç F-kutusu proteininin ABA'ya bağlı stres yanıtlarını düzenledikleri bilinmektedir. F box protein 6, ABA'ya bağlı stress yanıtlarının regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. F-box kutusu proteinleri proteoliz yoluyla bitki gelişimini ve abiyotik stres tepkilerini düzenlemektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada, tüm stres uygulamalarında F-Box protein 6'nın ifadesinin anlamlı derecede artış gösterdikleri belirlenmiştir ($P<0.05$). Artan protein ifadesinin B ve tuz streslerine cevaben ABA'ya bağlı stres yanıtının geliştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar Kayıhan ve diğ. (2017)'de B'a karşı toleranslı olan *Bolal-2973* ve hassasiyet gösteren *Atay-85* buğday hatlarında yaptığı çalışmalarda artan bor dozları altında her iki cinsin de F-Box protein 6 miktarında artış gösterdiğini bildirmektedir. Lu ve diğ. (2014)'de *Citrus sinensis'*de yaptıkları çalışmalarda ise artan miR394 aktivitesinin F-Box protein anlatımını düşürerek bor noksanlığına karşı direnç sağladığını belirmektedir. Koops ve diğ. (2011)'de *Arabidopsis thaliana'*da yaptığı çalışmada F-box proteinini kodlayan EDL3 geninin tuzluluk stresi altında gen anlatımının arttığını göstermektedir. Song ve diğ. (2013), tuz stresi ile yaptıkları çalışmada F-box proteinin stomatal kapanmada rol oynadığını ve tuz stres cevabında görev aldığını belirtmektedir. Bizim çalışmamızda da ubikütine bağımlı protein yıkım yolunun kombine bor ve tuz stres koşulları altında hasarlanan ve tamir edilemeyen proteinlerin yıkımlarını gerçekleştirmek üzere anlatım düzeylerini arttırdığını düşündürmektedir [163-166].

Klololastların ana proteini olan ribuloz 1,5-bisfosfat karboksilaz, atmosferik karbondioksitin fiksasyonunu katalize eden iki tip alt birimden oluşur. Biri, 55 kd büyük alt birim (spot 3) diğeri, 12-15 kd küçük alt birimden (spot 13 ve 16) oluşmaktadır. Rubisco proteini Calvin reaksyonunda görev alarak 2 önemli reaksiyonu katalizler. Bunlardan ilki karbondioksitin fiksasyon aşamasında D-ribuloz 1,5-bifosfatın karboksilasyonu diğeri ise, fotorespirasyon sırasında beş şekerli pentoz substüratın oksidasyonunu sağlayarak görev yapmaktadır. Rubisco aktivaz (spot 12) ise yanlış katlanmalara karşı Rubisco'nun konfigürasyonunu değiştirmek için ATP

hidrolizinden gelen enerjiyi kullanan bir motor proteini olarak görev yapmanın yanı sıra bakteriyel savunma yanıtı, yaprak yaşlanması, soğuğa tepki, jasmonik aside cevap gibi biyolojik süreçlerde de rol almaktadır. Aktivaz proteini, C3 ve C4 bitkileri ve yeşil algler de dahil olmak üzere tüm bitki türlerinde tespit edilmiştir. Rubisco aktivaz, Rubisco'nun katalitik aktivitesini başlatmak ve sürdürmek için, Mg^{2+} ve RuBP'nin bağlanmasına izin vererek katalitik bölgelerin bir lizin rezidüleri karbemilatlanmasını gerçekleştirmektedir. Rubisco'nun katalitik bölgelerinden sıkıca bağlı inhibitör şeker fosfatlarının ATP'ye bağlı olarak uzaklaştırılmasını katalizleyerek Rubisco'nun aktivasyon durumunu modüle etmektedir. Çalışmamızda ribuloz bifosfat karboksilaz/büyük alt biriminin ifadesinin yüksek B koşullarında kontrole göre azaldığı görülmüştür.

Rubisco aktivaz aktivitesi ise, hem ATP / ADP oranına hem de kloroplastın redoks durumuna bağlıdır ve yüksek sıcaklığa son derece duyarlıdır. Atik ve diğ. (2011), *Hordeum vulgare* (arpa) ile artan dozlarda bor uygulaması altında yaptıkları proteomik çalışmalarında ribulaz bifosfat karboksilat büyük alt biriminin ifadesinin arttığını belirtmektedir. Rubisco aktivaz proteinin ifadesindeki artışın, stresle azalan fotosentez aktivitesini geri çevirmek için arttığı düşünülmektedir. Chen ve diğ. (2014) ve Sang ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmalarında artan bor konsantrasyonuna bağlı olarak Rubisco aktivaz ifadesinde azalma gözlediklerini belirtmişlerdir. Chen ve diğ. (2014)'nin çalışmalarında protein ifadesinde gözlenen azalmanın noksanlık koşuluna kıyasla yüksek B stresi altında olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise B2 setinde sadece B2T0 dozunda kontrolün üzerinde ifade göstermektedir [167-171].

Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz / oksijenazın küçük alt birimi ise elektron transfer sistemlerinde görev alan ve fotosentezin regülasyonunda etki gösteren önemli bir proteindir. Rubisco büyük alt birimiyle beraber işlev görmesine rağmen tek başına katalitik aktivitenin gerçekleşmesinde rol oynayamaz. Katalitik rezidülerinin bulunmamasına rağmen katalitik aktivitenin verimliliğinin ve özgüllüğünün düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Kore-eda ve diğ. (2014), *Mesembryanthemum crystallinum* bitkisi ile gerçekleştirdikleri çalışmada Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz / oksijenazın büyük ve küçük alt birimlerinin kontrole oranla yaklaşık 7 kat azaldığını bildirmektedir. Sobhanian ve diğ. (2010)'nin soya üzerindeki çalışma sonuçlarına paralel olarak bizim çalışmamızda da Rubisco küçük alt birimi

ifadesinin tüm stres ve noksanlık dozlarında kontrol bitkisine göre azaldığı kaydedilmiştir. Tüm kondüsyonları değerlendirildiğinde de bor ve tuz uygulamalarında benzer sonuçlar karşımıza çıkmaktadır [125, 172-175].

Peptidil-prolil cis / trans izomeraz TLP20 (spot 4) proteini, tek bir PPIaz alanı içeren 20 kDa'lık bir kütleye sahiptir. PPIazların siklofilin ailesine dahil olan bu protein TPL40 ile tilakoid lümen üzerinde lokalize olmaktadır. Bitkilerde yapılan birçok çalışma sonucunda hem kloroplastik hem de sitosolik birçok siklofilin tanımlanmaktadır. TLP20, kloroplast tilakoid lümenindeki ana prolil izomeraz aktivitesinden sorumlu genel protein katlama katalizörlüğünü gerçekleştirmektedir. PPIazlar substrat bağlanma bölgesinin hidrofobik doğası sayesinde proline yüksek bağlanma kabiliyetine sahip olmaktadır. Stresle ilişkili proteinlerin katlanmasını kolaylaştırmak için ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Stres sonucu bozulan ozmotik denge ve oluşan reaktif oksijen türevleri, proteinlerde yapısal bozunmalara neden olmaktadır. Oluşan bu yapısal hasarların giderilmesi, yapısı bozulan proteinlerin degredasyondan korunması ve birikerek plak oluşturmalarını önlemektedir. Alves ve diğ. (2011), *Lupinus albus*'da yürüttükleri çalışmada TPL 20 proteinin sadece bor noksanlığında ifade edildiğini; diğer koşullar altında ise ifade edilmediğini belirtmişlerdir. Trivedi ve diğ. (2014) yürüttükleri çalışmada *Piriformospora indica* mantarından TPL 20 proteinini kodlayan PiCypA genini transgenik tütün bitkilerine klonlayarak yüksek derecede eksprese olmasını sağlamıştır. Yüksek ekspresyon sonucunda tuz stresine karşı toleransın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Alavilli ve diğ. (2018)'nin *Arabidopsis thaliana*'da gerçekleştirdikleri çalışmalarda TPL 20 proteininin soğuk, sıcak, kuraklık ve tuzluluk streslerinde rol oynadıkları gösterilmektedir [176-180]. Bizim çalışmamızda da TPL 20 proteinin ifadesi özellikle B2T1 ve B1T2 olarak yetiştirilen bitkilerde kontrole göre artış göstermişlerdir.

Peroksiredoksin (spot 5) peroksit türevlerini ayrıştırmak için katalitik bölgesindeki sistein rezidülerini kullanan bir antioksidan enzimdir. H_2O_2'nin suya detoksifiye edilmesinde anahtar enzimlerdendir. Metabolik ativiteler sonrası ya da stres sonucu oluşan hidrojen peroksit miktarını azaltmak için katalaz ve glutatyon peroksidaz ile etkili bir şekilde rekabet etmektedir. Fotosentetik elektron taşıyıcılarının redoks durumunu, fotosentetik moleküllerin hasar görmesini önlemek için dengelemekte

görevlidir. Fotosistem I tepkimeleri esnasında, ortaya çıkan süper oksit O_2^- molekülünün etkisiz hale getirilmesi için askorbat peroksidaz ile yarışmaktadır. Üretilen O_2^-, Ferredoksin veya süperoksit dismutaz tarafından H_2O üretmek amacıyla, H_2O_2 ya dönüştürülür. Peroksiredoksin proteini mitokondriyal matriste lokalizedir ve mitokondrinin anti-oksidatif mekanizmasında rol oynamaktadır. Bir antioksidan olarak hareket eder ve toksik peroksitlerin zararlarını azaltarak, bitki gelişim fonksiyonları, adaptasyon mekanizmaları ve savunma tepkilerinde önemli roller oynamaktadır. H_2O_2, Ferrodoksin bağımlı yolda PRx tarafından SOD bağımlı yolda ise askorbat peroksidaz tarafından ayrıştırılarak H_2O elde edilir. Tioredoksin (spot 14) veya diğer indirgeyiciler oksitlenmiş Prx konsantrasyonunu azaltmaktadır. Antioksidan aktivitesinde önemli bir bileşik olan Tioredoksin (Trx), oksitlenmiş proteinlerin disülfür bağlarını indirgeyip elektronlar kopartarak, bu elektronları H_2O_2 detoksifikasyonunda işlev gören diğer enzimlere donör olarak görev yapmaktadır. Trx m'nin oksidatif pentoz fosfat yolunun glikoz-6-P dehidrojenaz inhibitörü olarak işlev görmekte ve klorofil stabilitesinde önemli rol oynamaktadır. H_2O_2 protein tiyol grupları için güçlü bir oksitleyicidir. Tiyoredoksin M, peroksidaz (Prx) ve katalazla birlikte H_2O_2 inin hücre içerisinde indirgenmesi için rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda tiyoredoksin protein ifadesinin tuz stresine bağlı olarak arttığı bildirilmektedir. T0 deneme serisinde yüksek konsantrasyonda B uygulamasındaki bitkilerde Tiyoredoksin M protein ifadesinin kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir. T1 deneme serisinde ise B noksanlık ve B2 kombine uygulamalarındaki protein ifadelerinin de kontrolün üzerinde oldukları gözlenmiştir. T2 uygulamasında yetişen bitkiler arasında B noksanlık koşullarındaki bitkilerin protein ifadelerinin kontrole göre azalma gösterdiği ancak B1 ve B2 kombine uygulamalarında yetişen *P. distans* bitkilerinde protein ifadelerinin kontrole göre artış gösterdikleri belirlenmiştir [181, 182]. Bizim çalışmamızda da bozulan redoks aktivitesini düzenlemek ve ortaya çıkan H_2O_2 moleküllerinin zararından korunmak için protein ifadesinde artışın saptandığı düşünülmektedir.

Prx ise iyon homeastisizindeki değişiklerden çok çabuk etkilenen bir protein olduğu için protein ifadesinin tüm deneme koşullarında kontrole göre artış gösterdiği ancak deneme gruplarının kendi içlerinde değerlendirilmesiyle Bor konsantrasyonunun artması ile paralel olarak protein ifadesinin azaldığı ve bu durumun tuz stresi konsantrasyonundan bağımsız olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Chen ve diğ. (2014),

*Arabidopsis thaliana'*da bor noksanlık ve stres grupları oluşturmuşlardır ve yaptıkları analizler sonucunda bor noksanlığı ve bor stresi koşulunda Prx proteininin ifadesinin çalışmamız verileri ile benzer olarak artış gösterdikleri belirtilmiştir. Yüksek B ve tuz uygulaması olan B2T2 deneme grubunda ise protein ifadesinin kontrole göre ciddi oranda azalma gösterdiği ve hücresel iyon homeostazisinin yüksek oranda bozulmuş olması sebebiyle enzimin antioksidan aktivitesinin yetersiz kalması sebebiyle olabileceği düşünülmektedir Literatür taraması sonucunda peroksiredoksin ve tioredoksin M proteinlerinin bor stresi üzerine etkilerini inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır [172, 181, 183-187].

Karotenoidlerin oksidatif yarılmasından kaynaklanan apokarotenoidler, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli sinyal ve yardımcı moleküller olarak hizmet eder. Bu reaksiyonları katalize eden enzimler karotenazlar veya karotenoid oksijenazlar (spot 6) olarak adlandırılmaktadır. Karotenoid oksijenaz (CCD) ailesi oluşturan dokuz gene sahiptir. Yüksek bitkilerde karotenoid bölünme ürünleri sinyal görevi görmektedir. Çiçek kokusu, meyve rengi ve aromaya aracılık ederek, dağıtıcı tozlayıcıları ve vektörleri çekmektedir. Apokarotenoidler büyüme ve gelişmeyi düzenlemede önemli görevler üstelenmektedirler. Ksantoksin, sitoplazmada dehidrojenaz / redüktaz ile absisik aldehite dönüştürülmektedir. Absisik aldehid, aldehid oksidaz (AO) ile ABA' ya oksitlenir. Aşırı CCD1 ekspresyonu endojen ABA düzeylerini artırarak, stoma kapanmasını tetiklemektedir. Baba ve diğ. (2015)'nin Arabidopsis bitkilerinde yürüttükleri çalışmada, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde karotenoid oksijenazın anlatımının tuz stresi altında arttığı bildirilmiştir. Yine aynı ekip tarafından elde edilen transgenik bitkilerde karotenoid oksijenaza aşırı anlatım yaptırılmış ve bu aşırı ekspresyonun tuz stresi toleransında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kong ve diğ. (2017), *Gossypium hirsutum'*da (pamuk) artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak protein ifadesinin arttığını rapor etmişlerdir. Karotenoid oksijenaz, ABA biyosentezinde rol aldığı için abiyotik streslere karşı yanıtta rol oynayan önemli bir proteindir. Bizim çalışmamızda da ABA sentezinin düzenlenmesinde kritik bir adım olan karotenoid oksijenaz ifadesinin yüksek tuz ve yüksek bor koşullarında (B2T1 ve B2T1) kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında karotenoid oksijenaz enziminin ifadesinin tuz konsantrasyonuna nazaran daha çok B konsantrasyonundan etkilendiği elde edilen verilere göre düşünülmektedir. Guo ve diğ.

(2014) *Citrus grandis'*de bor stresinin karotenoid oksijenaz ifadesinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir [188-190].

Trioz-fosfat izomeraz (spot 7-15-17) (TPI veya TIM), trioz fosfat izomerleri dihidroksiaseton fosfat ve D-gliseraldehit 3-fosfatın tersinir dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. TPI glikolizde önemli bir rol oynar ve verimli enerji üretimi için gereklidir. Trioz fosfat izomeraz, fotosentetik karbon dioksit fiksasyonunda temel bir reaksiyon olan gliseraldehid-3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfatın geri dönüşümlü izomerizasyonunu katalize etmektedir. Sitosolik TPI izoenzimi öncelikle glikoliz ve glukoneogenezde etki gösterirken, plastid TPI bu yollarda işlev görmesine ek olarak fotosentezin üretken fazında da önemli bir role sahiptir. Reaktif oksidatif türleri (ROS) ve *S*- glutatyonilasyon, bitkilerde sitozolik triosefosfat izomerazlarının (cTPI) aktivitesini modüle etmektedir. Stres varlığında görülen Metil gikosal varlığında ekspresyonu kısa periyotta artış göstermektedir. Duan ve diğ. (2017), *Triticum aestivum* ile yaptıkları proteomik çalışmasında uygulanan tuz stresi sonucunda TIM ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir. Yousuf ve diğ. (2016) *Brassica juncea*'da (Hardal) da yaptığı çalışmada glikolizin önemli basamaklarından biri olan bu proteininin azalan fotosentez oranına bağlı olarak azaldığını belirtmektedir. Enerji metabolizması, abiyotik streslerden ilk etkilenen sistemlerden biridir. Wang ve diğ. (2011)'in *Brassica napus'*da (kanola) gerçekleştirdikleri transkriptomik analizlerde bor noksanlığı koşulları altında Trioz-fosfat izomeraz proteinini kodlayan genin ekspresyonunun azaldığı ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda bor noksanlığı koşulları altında protein ifadesinin kontrole göre azalış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bu genin ifadesinin tuz konsantrasyonundan bağımsız olarak bor noksanlık koşulları altında azaldığını desteklemektedir [191-195].

OEE1, OEE2 ve OEE3'ten oluşan oksijen geliştirici arttırıcı protein (OEE), PSII'de suyun ışık kaynaklı oksidasyonunda önemli roller oynamaktadır. EEO2 (spot 8) protein ailesinin üyeleri lokalizasyon ve işlevlerine göre; PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa) ve PsbQ (17 kDa) olmak üzere 3 çeşittir. Fotosistem II'nin lüminal tarafında bulunan PsbP, suyun oksidasyonundan sorumludur ve yan ürün olarak fotosistem II'de kullanılmak üzere moleküler oksijen üretmektedir. Abiyotik streslerin neden olduğu kloroplastların redoks durumundaki dengesizlik, aralarında serbest kalsiyum iyonları ve ROS gibi ikincil habercilerin üretilmesine yol açmaktadır. Bu moleküller,

kloroplastlardan çekirdeğe doğru sinyalizasyonda rol oynamakta; PsbP protein, artan kalsiyum iyonlarını kofaktör olarak kullanmakta ve kloroplastlarda sinyalin baskılanmasında görev almaktadır. Literatürde farklı çeşitler üzerinde yapılan çalışmalarda farklı ekspresyon profilleri ile karşılaşılmaktadır. Bandehagh ve diğ. (2011) *Brassica napus'*da yaptıkları çalışmalarda PsbP proteininin ifadesinin 175mM ve 350 mM tuz stresi altında azaldığını yaptıkları proteomik analizler ile göstermişlerdir. Bai ve diğ. (2017), *Avena sativa* üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında OEE1, OEE2 ve OEE3 proteinlerinin anlatımının azaldığını bildirmişlerdir. Özellikle OEE2'nin, NaCl varlığında PSII kompleksinden kolayca ayrılabileceği bilinmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan kombine stres denemelerinde kontrole göre protein ifadesinde büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Literatür taramaları sonucunda PsbP proteininin borla ilişkisini göstren yayınlar bulunmamaktadır [182, 196-198].

TATA bağlayıcı protein (spot 9) (TBP) ve transkripsiyon faktörü IIB (TFIIB), ökaryotik transkripsiyon başlatma komplekslerinin gerçekleşebilmesi için kilit görev oynamaktadır. RNA polimeraz II ve yardımcı faktörler için kalıp görevi gören daha kararlı kompleks oluşturmak için, TBP pozitif yüklü lizin ve arginin amino asit rezidüleri aracılığıyla DNA omurgasındaki negatif yüklü fosfatlarla bağlanmaktadır. DNA'daki keskin bükülme, fenilalanin rezidüsünün küçük oluğa bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. DNA büküldükçe TBP ile teması artar, böylece DNA-protein etkileşimi artar. Bunu, RNA polimeraz II ve RF2A gibi yardımcı faktörler için kalıp görevi gören daha kararlı bir üçlü kompleks oluşturmak için TBP promotör kompleksine TFIIB transkripsyon faktörü bağlanması gerçekleşerek transkripsyonu başlatmaktadır. Tuz stresine bağlı olarak bozulan osmatik denge ve hücresel hasarlar sonucunda, protein ifadesindeki artış tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azalmaktadır [199, 200]. Elde ettiğimiz analiz sonuçlarına göre TPB protein ifadesi, tüm deneme koşullarında kontrol grubuna göre azalma göstermiştir

Şaperoninler, çift halkalı bir yapı oluşturan oligomerik protein kompleksleridir. ATP'nin hidrolizi yoluyla yeni sentezlenmiş veya denatüre polipeptitlerin merkezi boşluklarında katlanmasını düzenlemektedir. Moleküler şaperonin oluşumu sırasında Rubisco büyük alt birim bağlama protein alfa (spot 10) ve beta (spot 11) alt üniteleri, 6 ila 8 özdeş alt birimden oluşan halkalar şeklinde bulunmaktadır, bu halka yapıları

Mg^{2+} ve ATP varlığında kendi kendini uyararak bir araya gelmektedir. Kloroplastlar tarafından yapılan yeni sentezlenmiş Rubisco büyük alt birimleri, Rubisco büyük alt birim bağlama protein (CPN60) olarak adlandırılan başka bir proteine kovalent olarak bağlanır. RbcL-Cpn60 ikili kompleksi, Rubisco holoenzimine birleştirilmeden önce zorunlu bir ara madde olarak kabul edilmektedir. Silindirik CPN60 tetradecamerin merkezi boşluğu, protein katlanması için izole edilmiş bir ortam olarak görev yapmaktadır. Alfa ve beta alt üniteleri, proteinlerin yeniden katlanmasında görev alan stres yanıtında rol alan önemli şaperonin proteinler olarak işlev görmektedir. Stres nedeniyle oluşan ROS türevlerinden etkilenerek yapısal bozukluğa uğrayan veya yanlış katlanan proteinlerin düzeltilmesi için alfa, beta alt üniteleri birlikte GroEL ve GroS benzeri kompleks oluşturmaktadır. Yüksek tuz ve bor konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan osmotik stres sonucunda artan reaktif oksijen türlerinin üretimi, D1 proteinini yeniden sentezini baskılayarak PSII'nin onarımını inhibe etmektedir. Shen ve diğ. (2018), *Avicennia marina*'da (mangrov) gerçekleştirdikleri proteomik analizlerinde 100 mM tuz uygulamasının ardından Rubisco Bağlama Proteini Alfa ve Beta Alt Ünitesinin protein ifadelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Wang ve diğ. (2016), *Kandelia candel* ile yaptıkları çalışmalarda RuBisCO Bağlayıcı Protein Alfa ve Beta Alt ünitesinin, RuBisCO kompleksinin oluşumunda çok önemli olduğunu ve tuz uygulaması sonucunda arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmamızda ise RuBisCO Bağlayıcı Protein Beta Alt ünitesinin tüm deneme koşullarında kontrol grubuna göre azalma gösterdikleri ancak RuBisCO Bağlayıcı Protein Alfa Alt ünitesinin ise yüksek bor ve yüksek tuz koşullarında kontrole göre artış gösterdikleri belirlenmiştir. Oksitatif stres sonucu oluşan hasarı engellemek ya da tersine çevirmek amacıyla protein ifadesi artmaktadır. Alves ve diğ. (2011), bor noksanlığına tabi tutulmuş *Lupinus albus* örneklerinde RuBisCO Bağlayıcı Protein alfa alt ünitesinin ilk defa ifade edildiğini normal koşullarda protein ifadesinin bulunmadığını belirtmektedir. Bizim çalışmamızda ise tam tersi bir etki görülmekte olup bor noksanlık koşulları altında protein ifadelerinin kontrole ve diğer dozlara göre son derece düşük oldukları görülmektedir [179, 201-204].

Özet olarak, yürütülen bu tez çalışması ile ekstrem B toleranslı bir bitki olan *P. distans* bitkilerinde B ve tuz kombine stres etmenleri altında farklı ifade olan protein profilleri ve özellikle B ilişkili proteinlerin saptanması hedeflenmiştir.

Uygulanan kombine stres koşullarında farklılık gösterdiği belirlenen proteinlerin stres tolerans mekanizmalarında en etkin metabolizma yollarının belirlenmesi amacıyla proteomik ve B ilişkili proteinlerin seçilmesi amacıyla da LIBS tekniği kullanılmıştır.

Tekli stres denemelerine ait litertaürde daha yaygın bilgi olmasına rağmen, çoklu stres koşullarında yetiştirilen *P. distans* bitkilerinden elde edilen bu verilerin literatüre katkı sağlayacağı ancak daha ileri analizler ile de verilerin değerlendirilerek *P. distans* bitkisinin tolerans mekanizmalarının aydınlatılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

1. Blevins, D.G. and K.M. Lukaszewski, *Boron in plant structure and function.* Annual review of plant biology, 1998. **49**(1): p. 481-500.
2. Landi, M., et al., *Boron toxicity in higher plants: an update.* Planta, 2019: p. 1-22.
3. Kobayashi, M., T. Matoh, and J. Azuma, *Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls.* Plant Physiology, 1996. **110**(3): p. 1017-1020.
4. Shorrocks, V.M., *The occurrence and correction of boron deficiency.* Plant and soil, 1997. **193**(1-2): p. 121-148.
5. Wei, Y., et al., *Prognosis of boron deficiency in oilseed rape (Brassica napus) by plant analysis.* Australian Journal of Agricultural Research, 1998. **49**(5): p. 867-874.
6. Gupta, U.C., *Boron and its role in crop production*. 1993: CRC press.
7. Sheoran, V., A. Sheoran, and P. Poonia, *Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review.* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2010. **41**(2): p. 168-214.
8. Sheoran, V., A.S. Sheoran, and P. Poonia, *Factors affecting phytoextraction: a review.* Pedosphere, 2016. **26**(2): p. 148-166.
9. Hasanuzzaman, M., K. Nahar, and M. Fujita, *Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages,* in *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. 2013, Springer. p. 25-87.
10. Alpaslan, M. and A. Gunes, *Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants.* Plant and Soil, 2001. **236**(1): p. 123-128.
11. Panta, S., et al., *Halophyte agriculture: success stories.* Environmental and Experimental Botany, 2014. **107**: p. 71-83.
12. Zhu, J.-K., *Plant salt tolerance.* Trends in plant science, 2001. **6**(2): p. 66-71.
13. Flowers, T.J. and T.D. Colmer, *Salinity tolerance in halophytes.* New Phytologist, 2008: p. 945-963.
14. Zhu, J.-K., *Salt and drought stress signal transduction in plants.* Annual review of plant biology, 2002. **53**(1): p. 247-273.
15. Redondo-Gómez, S., *Abiotic and biotic stress tolerance in plants*, in *Molecular stress physiology of plants*. 2013, Springer. p. 1-20.
16. Acosta-Motos, J.R., et al., *Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms.* Agronomy, 2017. **7**(1): p. 18.
17. Almeida, D.M., M.M. Oliveira, and N.J. Saibo, *Regulation of Na+ and K+ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants.* Genetics and molecular biology, 2017. **40**(1): p. 326-345.
18. Mahar, A., et al., *Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review.* Ecotoxicology and environmental safety, 2016. **126**: p. 111-121.
19. Vinichuk, M., A. Mårtensson, and K. Rosén, *Inoculation with arbuscular mycorrhizae does not improve 137Cs uptake in crops grown in the Chernobyl region.* Journal of environmental radioactivity, 2013. **126**: p. 14-19.

20. Sugiura, Y., et al., *Evaluation of radiocesium concentrations in new leaves of wild plants two years after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident.* Journal of environmental radioactivity, 2016. **160**: p. 8-24.
21. Fernández, S., et al., *Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain.* Journal of Geochemical Exploration, 2017. **174**: p. 10-20.
22. BABAOĞLU, M., et al., *Gypsophila sphaerocephala Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels.* Turkish Journal of Botany, 2004. **28**(3): p. 273-278.
23. Hamurcu, M., et al., *Extremely high boron tolerance in Puccinellia distans (Jacq.) Parl. related to root boron exclusion and a well-regulated antioxidant system.* Zeitschrift für Naturforschung C, 2016. **71**(7-8): p. 273-285.
24. Cristaldi, A., et al., *Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review.* Environmental Technology & Innovation, 2017. **8**: p. 309-326.
25. Warington, K., *The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants.* Annals of Botany, 1923. **37**(148): p. 629-672.
26. Reid, R., *Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley.* Plant and cell physiology, 2007. **48**(12): p. 1673-1678.
27. Loomis, W.D. and R. Durst, *Chemistry and biology of boron.* BioFactors (Oxford, England), 1992. **3**(4): p. 229-239.
28. Hunt, C.D. and S.L. Meacham, *Aluminum, boron, calcium, copper, iron, magnesium, manganese, molybdenum, phosphorus, potassium, sodium, and zinc: concentrations in common western foods and estimated daily intakes by infants; toddlers; and male and female adolescents, adults, and seniors in the United States.* 2001.
29. Fageria, N.K., *The use of nutrients in crop plants*. 2016: CRC press.
30. Brown, P.H. and B.J. Shelp, *Boron mobility in plants.* Plant and soil, 1997. **193**(1-2): p. 85-101.
31. Sarkar, D., B. Mandal, and M.C. Kundu, *Increasing use efficiency of boron fertilisers by rescheduling the time and methods of application for crops in India.* Plant and Soil, 2007. **301**(1-2): p. 77-85.
32. Camacho-Cristóbal, J.J., et al., *Plant response to boron deficiency and boron use efficiency in crop plants*, in *Plant Micronutrient Use Efficiency*. 2018, Elsevier. p. 109-121.
33. Brown, P., et al., *Boron in plant biology.* Plant biology, 2002. **4**(02): p. 205-223.
34. Reid, R.J., et al., *A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants.* Plant, Cell & Environment, 2004. **27**(11): p. 1405-1414.
35. Reid, R., *Understanding the boron transport network in plants.* Plant and soil, 2014. **385**(1-2): p. 1-13.
36. Tanaka, N., et al., *Roles of pollen-specific boron efflux transporter, OsBOR4, in the rice fertilization process.* Plant and cell physiology, 2013. **54**(12): p. 2011-2019.
37. Takano, J., et al., *Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(11): p. 5220-5225.

38. Bai, C., et al., *A novel method for removal of boron from aqueous solution using sodium dodecyl benzene sulfonate and D-mannitol as the collector.* Desalination, 2018. **431**: p. 47-55.
39. Seçkin, B., *Mannitolün tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinin antioksidant enzim düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması*. 2005, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
40. Mattos Jr, D., et al., *Soil boron fertilization: The role of nutrient sources and rootstocks in citrus production.* Journal of integrative agriculture, 2017. **16**(7): p. 1609-1616.
41. Rerkasem, B. and S. Jamjod, *Genotypic variation in plant response to low boron and implications for plant breeding.* Plant and Soil, 1997. **193**(1-2): p. 169-180.
42. Rerkasem, B., et al., *Grain set failure in boron deficient wheat.* Plant and soil, 1993. **155**(1): p. 309-312.
43. Blamey, F.P.C., D. Edwards, and C. Asher, *Nutritional disorders of sunflower.* 1987.
44. Gupta, U. and H. Solanki, *Impact of boron deficiency on plant growth.* International journal of bioassays, 2013. **2**(7): p. 1048-50.
45. Bould, C., E.J. Hewitt, and P. Needham, *Diagnosis of mineral disorders in plants. Volume 1. Principles*. 1983: Her Majesty's Stationery Office.
46. Li, C., et al., *Effects of boron starvation on boron compartmentation, and possibly hormone‐mediated elongation growth and apical dominance of pea (Pisum sativum) plants.* Physiologia Plantarum, 2001. **111**(2): p. 212-219.
47. Archana, N.P. and P. Verma, *Boron deficiency and toxicity and their tolerance in plants: a review.* J Global Biosci, 2017. **6**: p. 4958-4965.
48. Peñaloza, P. and P. Toloza, *Boron increases pollen quality, pollination, and fertility of different genetic lines of pepper.* Journal of Plant Nutrition, 2018. **41**(8): p. 969-979.
49. Boldingh, H., et al., *Carbohydrate and boron content of styles of 'Hass' avocado (Persea americana Mill.) flowers at anthesis can affect final fruit set.* Scientia horticulturae, 2016. **198**: p. 125-131.
50. Ferreyra, R.E., et al., *Behavior of 42 crop species grown in saline soils with high boron concentrations.* Agricultural Water Management, 1997. **34**(2): p. 111-124.
51. Peer, W.A., et al., *Phytoremediation and hyperaccumulator plants*, in *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*. 2005, Springer. p. 299-340.
52. Tanaka, M. and T. Fujiwara, *Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants.* Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008. **456**(4): p. 671-677.
53. Yau, S., et al., *Phenotypic variation in boron-toxicity tolerance at seedling stage in durum wheat (Triticum durum).* Euphytica, 1995. **83**(3): p. 185-191.
54. Yoshinari, A. and J. Takano, *Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants.* Frontiers in plant science, 2017. **8**: p. 1951.
55. Takano, J., K. Miwa, and T. Fujiwara, *Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters.* Trends in plant science, 2008. **13**(8): p. 451-457.

56. Mosa, K.A., et al., *Enhanced boron tolerance in plants mediated by bidirectional transport through plasma membrane intrinsic proteins.* Scientific reports, 2016. **6**: p. 21640.
57. Pang, Y., et al., *Overexpression of the tonoplast aquaporin AtTIP5; 1 conferred tolerance to boron toxicity in Arabidopsis.* Journal of Genetics and Genomics, 2010. **37**(6): p. 389-397.
58. Aibara, I., et al., *Boron-dependent translational suppression of the borate exporter BOR1 contributes to the avoidance of boron toxicity.* Plant physiology, 2018. **177**(2): p. 759-774.
59. Miwa, K., et al., *Plants tolerant of high boron levels.* Science, 2007. **318**(5855): p. 1417-1417.
60. Hu, H. and P.H. Brown, *Absorption of boron by plant roots.* Plant and soil, 1997. **193**(1-2): p. 49-58.
61. Camacho‐Cristóbal, J.J., J. Rexach, and A. González‐Fontes, *Boron in plants: deficiency and toxicity.* Journal of Integrative Plant Biology, 2008. **50**(10): p. 1247-1255.
62. Öztürk, S.E., et al., *Transcriptomic analysis of boron hyperaccumulation mechanisms in Puccinellia distans.* Chemosphere, 2018. **199**: p. 390-401.
63. Princi, M.P., et al., *Boron toxicity and tolerance in plants: Recent advances and future perspectives*, in *Plant metal interaction*. 2016, Elsevier. p. 115-147.
64. Daliakopoulos, I., et al., *The threat of soil salinity: A European scale review.* Science of the Total Environment, 2016. **573**: p. 727-739.
65. Zörb, C., C.M. Geilfus, and K.J. Dietz, *Salinity and crop yield.* Plant biology, 2019. **21**: p. 31-38.
66. Oria-Hernández, J., et al., *Pyruvate kinase revisited the activating effect of k+.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45): p. 37924-37929.
67. Barrett-Lennard, E., *Restoration of saline land through revegetation.* Agricultural Water Management, 2002. **53**(1-3): p. 213-226.
68. Munns, R. and M. Tester, *Mechanisms of salinity tolerance.* Annu. Rev. Plant Biol., 2008. **59**: p. 651-681.
69. Habib, S.H., H. Kausar, and H.M. Saud, *Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes.* BioMed research international, 2016. **2016**.
70. Dubois, O., *The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk*. 2011: Earthscan.
71. Yensen, N.P., *Halophyte uses for the twenty-first century*, in *Ecophysiology of high salinity tolerant plants*. 2008, Springer. p. 367-396.
72. Parida, A.K. and A.B. Das, *Salt tolerance and salinity effects on plants: a review*. Ecotoxicology and environmental safety, 2005. **60**(3): p. 324-349.
73. Sivritepe, H.Ö., et al., *The effects of NaCl pre-treatments on salt tolerance of melons grown under long-term salinity.* Scientia Horticulturae, 2005. **106**(4): p. 568-581.
74. Mansour, M., *Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress.* Biologia Plantarum, 2000. **43**(4): p. 491-500.
75. Ben-Gal, A., et al., *Is osmotic potential a more appropriate property than electrical conductivity for evaluating whole-plant response to salinity?* Environmental and Experimental Botany, 2009. **65**(2-3): p. 232-237.
76. KARABULUT, H. and M.Ş. GÜLAY, *Antioksidanlar*. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2016. **1**(1): p. 65-76.

77. Abyaneh, H.Z., et al., *Chloride estimation in ground water from electrical conductivity measurement.* Tarim bilimleri dergisi, 2005. **11**(1): p. 110-114.
78. Conde, A., M.M. Chaves, and H. Gerós, *Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress.* Plant and Cell Physiology, 2011. **52**(9): p. 1583-1602.
79. Roy, S.J., S. Negrão, and M. Tester, *Salt resistant crop plants.* Current opinion in Biotechnology, 2014. **26**: p. 115-124.
80. Mansour, M.M.F. and K.H.A. Salama, *Cellular Mechanisms of Plant Salt Tolerance*, in *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions*. 2019, Springer. p. 169-210.
81. Liang, W., et al., *Plant salt-tolerance mechanism: a review.* Biochemical and biophysical research communications, 2018. **495**(1): p. 286-291.
82. Deinlein, U., et al., *Plant salt-tolerance mechanisms.* Trends in plant science, 2014. **19**(6): p. 371-379.
83. Silva, P. and H. Gerós, *Regulation by salt of vacuolar H+-ATPase and H+-pyrophosphatase activities and Na+/H+ exchange.* Plant signaling & behavior, 2009. **4**(8): p. 718-726.
84. Reddy, I.N.B.L., et al., *Salt tolerance in rice: focus on mechanisms and approaches.* Rice Science, 2017. **24**(3): p. 123-144.
85. Bassil, E., A. Coku, and E. Blumwald, *Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na+/H+ antiporters in plant growth and development.* Journal of experimental botany, 2012. **63**(16): p. 5727-5740.
86. Ji, H., et al., *The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles.* Molecular plant, 2013. **6**(2): p. 275-286.
87. Muchate, N.S., et al., *Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance.* The Botanical Review, 2016. **82**(4): p. 371-406.
88. Tanveer, M. and S. Shabala, *Targeting redox regulatory mechanisms for salinity stress tolerance in crops*, in *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 1*. 2018, Springer. p. 213-234.
89. Macfarlane, T. and L. Watson, *The circumscription of Poaceae subfamily Pooideae, with notes on some controversial genera.* Taxon, 1980. **29**(5-6): p. 645-666.
90. Choo, M.K., R.J. Soreng, and J.I. Davis, *Phylogenetic relationships among Puccinellia and allied genera of Poaceae as inferred from chloroplast DNA restriction site variation.* American Journal of Botany, 1994. **81**(1): p. 119-126.
91. *https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/puccinellia/distans/*. 27.03.2020 17:58.
92. Bar, C., S. Doğanlar, and A. Frary, *Genetic relationships among Eurasian Puccinellia distans genotypes.* Biochemical Systematics and Ecology, 2015. **62**: p. 20-24.
93. *http://www.biopix.eu/puccinellia-distans-ssp-borealis_photo-82297.aspx*. 11.05.2020 15:30.
94. Stiles, A.R., et al., *Mechanisms of boron tolerance and accumulation in plants: a physiological comparison of the extremely boron-tolerant plant species, Puccinellia distans, with the moderately boron-tolerant Gypsophila arrostil.* Environmental science & technology, 2010. **44**(18): p. 7089-7095.
95. Rámila, C.D., et al., *Boron accumulation in Puccinellia frigida, an extremely tolerant and promising species for boron phytoremediation.* Journal of Geochemical Exploration, 2015. **150**: p. 25-34.

96. Tarasoff, C., C. Mallory-Smith, and D. Ball, *Comparative plant responses of Puccinellia distans and Puccinellia nuttalliana to sodic versus normal soil types.* Journal of Arid Environments, 2007. **70**(3): p. 403-417.
97. Peng, Y.H., et al., *Alkali grass resists salt stress through high [K+] and an endodermis barrier to Na+*. Journal of experimental botany, 2004. **55**(398): p. 939-949.
98. Stiles, A.R., et al., *Evaluation of the boron tolerant grass, Puccinellia distans, as an initial vegetative cover for the phytorestoration of a boron-contaminated mining site in southern California.* Environmental science & technology, 2011. **45**(20): p. 8922-8927.
99. Akın, F., *Farklı miktarlarda bor uygulanan Puccinellia distans bitkisinde enerji metabolizması ve taşıma ile ilişkili genlerin QRT-PCR analizi*. 2018, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
100. Horgan, R.P. and L.C. Kenny, *'Omic'technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics.* The Obstetrician & Gynaecologist, 2011. **13**(3): p. 189-195.
101. Beranova-Giorgianni, S., *Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(5): p. 273-281.
102. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes.* Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-846.
103. O'farrell, P., *High resolution two-dimentional electrophoresis of proteins.* J. biol. Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-4021.
104. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words.* Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1853-1861.
105. Lohnes, K., et al., *Combining high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry and isoelectric focusing gel electrophoresis for virtual 2D gel-based proteomics.* Methods, 2016. **104**: p. 163-169.
106. Lopez, J., *Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis.* Journal of chromatography B, 2007. **849**(1-2): p. 190-202.
107. Hirano, H., N. Islam, and H. Kawasaki, *Technical aspects of functional proteomics in plants.* Phytochemistry, 2004. **65**(11): p. 1487-1498.
108. Wang, Z.-J., et al., *Sample preparation for two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the identification of Streptomyces coelicolor cytoplasmic protein complexes.* Journal of biochemical and biophysical methods, 2007. **70**(4): p. 565-572.
109. Galazzi, R.M., J.R. de Jesus, and M.A.Z. Arruda, *Sample Preparation Focusing on Plant Omics*, in *Emerging Sample Treatments in Proteomics*. 2019, Springer. p. 161-185.
110. Jorrín-Novo, J.V., et al., *Proteomics Analysis of Plant Tissues Based on Two-Dimensional Gel Electrophoresis*, in *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. 2018, Springer. p. 309-322.
111. Rabilloud, T., *How to use 2D gel electrophoresis in plant proteomics*, in *Plant proteomics*. 2014, Springer. p. 43-50.
112. Mihr, C. and H.-P. Braun, *Proteomics in plant biology*, in *Handbook of proteomic methods*. 2003, Springer. p. 409-416.
113. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics.* Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.

114. Schubert, O.T., et al., *Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research.* Nature protocols, 2017. **12**(7): p. 1289.
115. Zhang, Y., et al., *Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics.* Chemical reviews, 2013. **113**(4): p. 2343-2394.
116. Gao, Y. and J.R. Yates III, *Protein Analysis by Shotgun Proteomics.* Mass Spectrometry‐Based Chemical Proteomics, 2019: p. 1-38.
117. Toby, T.K., L. Fornelli, and N.L. Kelleher, *Progress in top-down proteomics and the analysis of proteoforms.* Annual review of analytical chemistry, 2016. **9**: p. 499-519.
118. Gomes, F.P. and J.R. Yates III, *Recent trends of capillary electrophoresis‐mass spectrometry in proteomics research.* Mass spectrometry reviews, 2019. **38**(6): p. 445-460.
119. Armirotti, A. and G. Damonte, *Achievements and perspectives of top‐down proteomics.* Proteomics, 2010. **10**(20): p. 3566-3576.
120. Wu, C., et al., *A protease for'middle-down'proteomics.* Nature methods, 2012. **9**(8): p. 822.
121. Sidoli, S., et al., *Bottom-up and middle-down proteomics have comparable accuracies in defining histone post-translational modification relative abundance and stoichiometry.* Analytical chemistry, 2015. **87**(6): p. 3129-3133.
122. Yu, J., et al., *Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in Puccinellia tenuiflora.* Journal of proteome research, 2011. **10**(9): p. 3852-3870.
123. Yu, J., et al., *Comparative proteomic analysis of Puccinellia tenuiflora leaves under Na2CO3 stress.* International journal of molecular sciences, 2013. **14**(1): p. 1740-1762.
124. Bar, C., *Elucidation of boron hyperaccumulation and tolerance mechanisms in Puccinellia distans (Jacq.) Parl. using proteomics approach*. 2015, Izmir Institute of Technology.
125. Sang, W., et al., *An investigation of boron-toxicity in leaves of two citrus species differing in boron-tolerance using comparative proteomics.* Journal of proteomics, 2015. **123**: p. 128-146.
126. Wang, Z., et al., *Proteomic alterations of Brassica napus root in response to boron deficiency.* Plant molecular biology, 2010. **74**(3): p. 265-278.
127. Li, M., et al., *iTRAQ-based comparative proteomic analysis reveals tissue-specific and novel early-stage molecular mechanisms of salt stress response in Carex rigescens.* Environmental and Experimental Botany, 2017. **143**: p. 99-114.
128. Méchin, V., C. Damerval, and M. Zivy, *Total protein extraction with TCA-acetone*, in *Plant Proteomics*. 2007, Springer. p. 1-8.
129. Wu, F.-S. and M.-Y. Wang, *Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues.* Analytical biochemistry, 1984. **139**(1): p. 100-103.
130. Carpentier, S.C., et al., *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two‐dimensional gel electrophoresis analysis.* Proteomics, 2005. **5**(10): p. 2497-2507.
131. Hishamuddin, M.S., et al., *Time-based LC-MS/MS analysis provides insights into early responses to mechanical wounding, a major trigger to agarwood formation in Aquilaria malaccensis Lam.* RSC Advances, 2019. **9**(32): p. 18383-18393.

132. Tan, H.S., *Proteomics analysis of somatic embryogenesis in oil palm (Elaeis guineensis Jacq)*. 2016, University of Nottingham.
133. Çakir, B. and İ. Gülseren, *Identification of Novel Proteins from Black Cumin Seed Meals Based on 2D Gel Electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS Analysis.* Plant Foods for Human Nutrition, 2019. **74**(3): p. 414-420.
134. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
135. Nałęcz, D., M. Dziuba, and I. Szerszunowicz, *Isolation of oat (Avena sativa L.) total proteins and their prolamin fractions for 2D electrophoresis*, in *Oat*. 2017, Springer. p. 225-234.
136. Schägger, H., *Tricine–sds-page.* Nature protocols, 2006. **1**(1): p. 16.
137. Rath, A., et al., *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(6): p. 1760-1765.
138. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.* Nature protocols, 2006. **1**(6): p. 2856.
139. Wiśniewski, J.R. and M. Mann, *Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis.* Analytical chemistry, 2012. **84**(6): p. 2631-2637.
140. André, M. and M. Karas, *Investigation of sample-purification procedures for MALDI-based proteomic studies.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2007. **389**(4): p. 1047-1053.
141. Crossay, T., et al., *New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-16.
142. Jurinke, C., P. Oeth, and D. van den Boom, *MALDI-TOF mass spectrometry.* Molecular biotechnology, 2004. **26**(2): p. 147-163.
143. Šebela, M., *Solid mixed matrices and their advantages in matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry.*
144. Giakoumaki, A., K. Melessanaki, and D. Anglos, *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in archaeological science—applications and prospects.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2007. **387**(3): p. 749-760.
145. Lee, D.-H., et al., *Highly sensitive analysis of boron and lithium in aqueous solution using dual-pulse laser-induced breakdown spectroscopy.* Analytical chemistry, 2011. **83**(24): p. 9456-9461.
146. Gasda, P.J., et al., *In situ detection of boron by ChemCam on Mars.* Geophysical Research Letters, 2017. **44**(17): p. 8739-8748.
147. Abdallah, C., et al., *Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance.* International journal of plant genomics, 2012. **2012**.
148. Swift, M.L., *GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing.* Journal of chemical information and computer sciences, 1997. **37**(2): p. 411-412.
149. Markiewicz-Keszycka, M., et al., *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review.* Trends in Food Science & Technology, 2017. **65**: p. 80-93.
150. Agrawal, G.K., et al., *Translational plant proteomics: a perspective.* Journal of Proteomics, 2012. **75**(15): p. 4588-4601.

151. Jorrin-Novo, J.V., et al., *Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics!* Journal of proteomics, 2019. **198**: p. 1-10.
152. Takáč, T., O. Šamajová, and J. Šamaj, *Integrating cell biology and proteomic approaches in plants.* Journal of Proteomics, 2017. **169**: p. 165-175.
153. Kerry, R.G., et al., *Proteomic and genomic responses of plants to nutritional stress.* Biometals, 2018. **31**(2): p. 161-187.
154. Takáč, T., T. Pechan, and J. Šamaj, *Differential proteomics of plant development.* Journal of Proteomics, 2011. **74**(5): p. 577-588.
155. Xiong, L., et al., *HOS5 – a negative regulator of osmotic stress‐induced gene expression in Arabidopsis thaliana.* The Plant Journal, 1999. **19**(5): p. 569-578.
156. Sun, J., et al., *The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in Arabidopsis.* Plant and cell physiology, 2007. **48**(8): p. 1148-1158.
157. Jiang, M., et al., *Over-expression of a C3H-type zinc finger gene contributes to salt stress tolerance in transgenic broccoli plants.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017. **130**(2): p. 239-254.
158. Wang, D., et al., *Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice.* BMC genomics, 2008. **9**(1): p. 44.
159. Bogamuwa, S.P. and J.-C. Jang, *Tandem CCCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response.* Plant and Cell Physiology, 2014. **55**(8): p. 1367-1375.
160. Kim, W.C., et al., *AtC3H14, a plant‐specific tandem CCCH zinc‐finger protein, binds to its target mRNAs in a sequence‐specific manner and affects cell elongation in Arabidopsis thaliana.* The Plant Journal, 2014. **80**(5): p. 772-784.
161. Lu, Y.-B., et al., *Long-term boron-deficiency-responsive genes revealed by cDNA-AFLP differ between Citrus sinensis roots and leaves.* Frontiers in plant science, 2015. **6**: p. 585.
162. Guo, Y.H., et al., *GhZFP1, a novel CCCH‐type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5.* New Phytologist, 2009. **183**(1): p. 62-75.
163. Kayıhan, C., et al., *Physiological, biochemical, and transcriptomic responses to boron toxicity in leaf and root tissues of contrasting wheat cultivars.* Plant molecular biology reporter, 2017. **35**(1): p. 97-109.
164. Koops, P., et al., *EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in Arabidopsis thaliana.* Journal of experimental botany, 2011. **62**(15): p. 5547-5560.
165. Song, J.B., et al., *miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner.* BMC plant biology, 2013. **13**(1): p. 210.
166. Lu, Y.-B., et al., *Identification of boron-deficiency-responsive microRNAs in Citrus sinensis roots by Illumina sequencing.* BMC plant biology, 2014. **14**(1): p. 1-16.
167. Mishra, S., et al., *Effects of boron deficiency on geranium grown under different nonphotoinhibitory light levels.* Journal of the American Society for Horticultural Science, 2009. **134**(2): p. 183-193.

168. Tränkner, M., E. Tavakol, and B. Jákli, *Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection.* Physiologia plantarum, 2018. **163**(3): p. 414-431.
169. Atik, A.E., et al., *Proteomic changes during boron tolerance in barley (Hordeum vulgare) and the role of vacuolar proton-translocating ATPase subunit E.* Turkish Journal of Botany, 2011. **35**(4): p. 379-388.
170. Zurawski, G., et al., *The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA.* Nucleic Acids Research, 1981. **9**(14): p. 3251-3270.
171. Knight, S., I. Andersson, and C.-I. Brändén, *Crystallographic analysis of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2· 4 Å resolution: Subunit interactions and active site.* Journal of molecular biology, 1990. **215**(1): p. 113-160.
172. Chen, M., et al., *Proteomic analysis of Arabidopsis thaliana leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis.* Journal of plant physiology, 2014. **171**(3-4): p. 235-242.
173. Kore-eda, S., et al., *Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in Mesembryanthemum crystallinum.* Gene, 2004. **341**: p. 83-92.
174. Matsumoto, K.i., et al., *Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)-mediated de novo synthesis of glycolate-based polyhydroxyalkanoate in Escherichia coli.* Journal of bioscience and bioengineering, 2019. **128**(3): p. 302-306.
175. Sobhanian, H., et al., *Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress.* Proteome science, 2010. **8**(1): p. 19.
176. Joseph, E., V. Radhakrishnan, and K. Mohanan, *Differential Expression of Cyclophilin1 and Cyclophilin2 Genes under Salinity Stress in Some Native Rice Cultivars of North Kerala, India.* International Journal of Plant Breeding and Genetics, 2016. **10**: p. 1-11.
177. Ruan, S.-L., et al., *Proteomic identification of OsCYP2, a rice cyclophilin that confers salt tolerance in rice (Oryza sativa L.) seedlings when overexpressed.* BMC plant biology, 2011. **11**(1): p. 34.
178. Kumari, S., et al., *Cyclophilins: proteins in search of function.* Plant signaling & behavior, 2013. **8**(1): p. e22734.
179. Alves, M., et al., *The analysis of Lupinus albus root proteome revealed cytoskeleton altered features due to long-term boron deficiency.* Journal of proteomics, 2011. **74**(8): p. 1351-1363.
180. Trivedi, D.K., et al., *Response of PiCypA tobacco T2 transgenic matured plant to potential tolerance to salinity stress.* Plant signaling & behavior, 2014. **9**(1): p. e27538.
181. Martí, M.C., et al., *Response of mitochondrial thioredoxin PsTrx o 1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (Pisum sativum L.) leaves.* Journal of Experimental Botany, 2011. **62**(11): p. 3863-3874.
182. Fatehi, F., et al., *The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress.* Molecular Biology Reports, 2012. **39**(5): p. 6387-6397.
183. Du, J., et al., *Proteomic and physiological analyses reveal the role of exogenous spermidine on cucumber roots in response to Ca (NO 3) 2 stress.* Plant molecular biology, 2018. **97**(1-2): p. 1-21.

184. Dietz, K.-J., et al., *The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism.* Journal of experimental botany, 2006. **57**(8): p. 1697-1709.
185. Svara, A., et al., *Temporal and spatial assessment of defence responses in resistant and susceptible hop cultivars during infection with Verticillium nonalfalfae.* Journal of plant physiology, 2019. **240**: p. 153008.
186. Low, F.M., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn, *Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte.* Antioxidants & redox signaling, 2008. **10**(9): p. 1621-1630.
187. Fernández-Trijueque, J., et al., *Plastid thioredoxins f and m are related to the developing and salinity response of post-germinating seeds of Pisum sativum.* Plant science, 2012. **188**: p. 82-88.
188. Kong, X., et al., *Soaking in H 2 O 2 regulates ABA biosynthesis and GA catabolism in germinating cotton seeds under salt stress.* Acta Physiologiae Plantarum, 2017. **39**(1): p. 2.
189. Baba, S.A., et al., *Overexpression of Crocus carotenoid cleavage dioxygenase, CsCCD4b, in Arabidopsis imparts tolerance to dehydration, salt and oxidative stresses by modulating ROS machinery.* Journal of plant physiology, 2015. **189**: p. 114-125.
190. Guo, P., et al., *cDNA-AFLP analysis reveals the adaptive responses of citrus to long-term boron-toxicity.* BMC plant biology, 2014. **14**(1): p. 284.
191. DUAN, J.-Y. and J.-F. CHEN, *Response of Wheat Seedling Root Proteome to Salt Stress.* 2017.
192. Yousuf, P.Y., et al., *Salt stress-induced modulations in the shoot proteome of Brassica juncea genotypes.* Environmental Science and Pollution Research, 2016. **23**(3): p. 2391-2401.
193. Wang, Z., et al., *Proteomics reveals the adaptability mechanism of Brassica napus to short-term boron deprivation.* Plant and soil, 2011. **347**(1-2): p. 195-210.
194. López-Castillo, L.M., et al., *Structural basis for redox regulation of cytoplasmic and chloroplastic triosephosphate isomerases from Arabidopsis thaliana.* Frontiers in plant science, 2016. **7**: p. 1817.
195. Castro‐Torres, E., et al., *Structural basis for the modulation of plant cytosolic triosephosphate isomerase activity by mimicry of redox‐based modifications.* The Plant Journal, 2019. **99**(5): p. 950-964.
196. Bandehagh, A., et al., *Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress.* Proteomics, 2011. **11**(10): p. 1965-1975.
197. Bai, J., et al., *Proteomic response of oat leaves to long-term salinity stress.* Environmental Science and Pollution Research, 2017. **24**(4): p. 3387-3399.
198. Pawłowicz, I., et al., *Remodeling of chloroplast proteome under salinity affects salt tolerance of Festuca arundinacea.* Photosynthesis research, 2018. **137**(3): p. 475-492.
199. Pan, S., E. Czarnecka-Verner, and W.B. Gurley, *Role of the TATA binding protein–transcription factor IIB interaction in supporting basal and activated transcription in plant cells.* The Plant Cell, 2000. **12**(1): p. 125-135.
200. Zhu, Q., et al., *Rice TATA binding protein interacts functionally with transcription factor IIB and the RF2a bZIP transcriptional activator in an enhanced plant in vitro transcription system.* The Plant Cell, 2002. **14**(4): p. 795-803.

201. Shen, Z.-j., et al., *Proteomic analysis on mangrove plant Avicennia marina leaves reveals nitric oxide enhances the salt tolerance by up-regulating photosynthetic and energy metabolic protein expression.* Tree physiology, 2018. **38**(11): p. 1605-1622.
202. Wang, L., et al., *Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove Kandelia candel during short-term stress.* PLoS One, 2014. **9**(1).
203. Bracher, A., et al., *Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco.* Annual review of plant biology, 2017. **68**: p. 29-60.
204. Suzuki, K., et al., *Plastid chaperonin proteins Cpn60α and Cpn60β are required for plastid division in Arabidopsis thaliana.* BMC plant biology, 2009. **9**(1): p. 38.

EKLER

Tablo 5.1 Kullanılan Cihazların Listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	A111	Thermo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences

Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo
Dondurucu (-80ºC)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad

Tablo 5.2 Kullanılan Kimyasalların Listesi

ADI	**ÜRÜN KODU**	**FİRMA ADI**
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptoetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem

Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK

Tablo 5.3 %12' Lik SDS-PAGE Jel İçeriği

	Yığma Jeli %4 (1jel için)	**Ayırma Jeli %12 (1 jel için)**
Distile Su	1,5 mL	3,4 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30, %0,8 w/v)	0,335 mL	4 mL
%10 SDS	0,025 mL	0,1 mL
1.5 M Tris-HCL, pH 8,8	-	2,5 mL
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	0,625 mL	-
TEMED	5 µl	10 µl
%10 APS	50 µl	80 µl

Tablo 5.4 4X Laemmli İçeriği

Tris (1.0 M, pH 6.8)	10 mL
SDS	4.0 g
Gliserol	20 mL
β-Merkaptoetanol	10 mL
Bromofenol Mavisi	0.1 g
Distile Su	50 mL'e tamamlanır.

Tablo 5.5 Fiksasyon Solüsyonu İçeriği

Etanol	%50
Fosforik Asit	%2

Tablo 5.6 Boyama Solüsyonu İçeriği

Metanol	%34
Fosforik Asit	%2
Amonyum Sülfat	%17
Comasie mavisi	%0.05

Tablo 5.7 Rehidrasyon/Protein Çözme Tamponu ve Dengeleme Tampon İçeriği

Rehidrasyon/Protein Çözme Tamponu	**Dengeleme tamponu 1**	**Dengeleme tamponu 2**
8 M üre	6 M üre	6 M üre
%2 CHAPS	%2 SDS	%2 SDS
50 mM DTT (Diklorodifeniltrikloroetan)	0.375 M Tris-HCL pH 8.8	0.375 M Tris-HCL pH 8.8
%0,2 amfolit pH 3-10	%20 gliserol	%20 gliserol
Bromofenol mavisi	%2 DTT	%2,5 iodoasetamid

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Tamer GÜMÜŞ

İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBIGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: +90 546 492 09 06

E-posta: tamergumus11@gmail.com

2. **Doğum Tarihi:** 07.08.1993

3. **Ünvanı:** Araştırma Görevlisi

4. **Öğrenim Durumu:**

Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2011-2015
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2017-2020

5. **Yönetilen Lisans ve Yüksek Lisans Tezleri**

5.1 Lisans Tezi

"Nikotin Bağımlılığının Moleküler Mekanizması" İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge Çelik.

5.2 Yüksek Lisans Tezi

"Ekstrem Toleranslı *Puccinellia Distans* Bitkisinde Proteomik Analizler" İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özge Çelik.

6. Ulusal ve Uluslararası Projeler

1. "Domates bitkisinde tuz stresinin antioksidan enzim aktiviteleri/izoenzim profilleri üzerine etkisinin gösterilmesi" (TÜBİTAK 2209 Projesi, 2013-2014, Proje Yürütücüsü)
2. Bor' a ekstrem toleranslı *Puccinella distance* bitkisinde NHX ve Na-H antiporterlarının karakterizasyonu (TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje numarası: 116Z343, 2017-2020, Proje Bursiyeri)

7. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. E.E. Hakki, A. Pandey, M.K. Khan, M. Hamurcu, O. Celik, S. Gezgin, E. Atmaca, M. Inanc1, **T. Gumus**, O. Cakir, C. Tarhan, M. Sameeullah "*Puccinellia distans*- A potential plant to reveal boron toxicity and salt tolerance mechanisms," *J. Biotechnol.*, 2019, doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.078.
2. **T. Gümüş**, Ö. Çelik, A. Ayan, S. Meriç, Ç. Atak "ROS Scavenging Differences of Tomato Cultivars Under Salt Stress" II.International Green Biotechnology Congress Abstract Booklet, Ottoman Archive Complex, 9-11 Eylül 2019, İstanbul- Türkiye

8. Çalışma ve Araştırma Deneyimleri

1. 06.2014-08.2014 Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye, Yaz Stajı.
2. 2015-2016 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul-Türkiye, Staj.

9. Ödüller ve Burslar

1. TUBİTAK, 1001 Araştırma Projesi, Bursiyer (2017-2020)

10. Katıldığı Bilimsel Kongre/Seminer/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

1. II.International Green Biotechnology Congress, Ottoman Archive Complex, 9-11 Eylül 2019, İstanbul- Türkiye
2. International Workshop On Molecular Spectroscopy And Biological Applications, İstanbul Kültür Üniversitesi, 17-18 Haziran 2019, İstanbul-Türkiye
3. Project Writing Camps For Smes-3, Horizon 2020 Phase-II, 24 Ocak 2020, İstanbul- Türkiye

11. Referanslar

1. Prof. Dr. Çimen ATAK Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul Kültür Üniversitesi e-mail: c.atak@iku.edu.tr
2. Prof. Dr. Özge ÇELİK Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul Kültür Üniversitesi Tel: 05325232430 e-mail: ocelik.@iku.edu.tr