

ALTINCI GRUP BİTKİ HORMONU: BRASSİNOSTEROİDLER

Yonca SURGUN, Emel YILMAZ, Bekir ÇÖL, Betül BÜRÜN*

Muğla Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 48000 Muğla, TÜRKİYE

Özet Bitki steroidleri, böcek, hayvan ve insan steroid hormonları ile yapısal benzerlik gösteren 70’den fazla bileşiği kapsamaktadır. Yeni bir bitki hormon sınıfı olan brassinosteroidler (BR’ler), bitkilerde sıklıkla rastlanan bitki steroidlerinin spesifik bir grubudur. BR’lerin çok düşük konsantrasyonlarda, hücre bölünmesi, uzaması ve genişlemesi, fotomorfogenezis, reproduktif organlarda gelişim, yaprak senesensi, toplam biyokütle ve verim artışı gibi bitki büyüme ve gelişmesinde düzenleyici görevlerinin yanı sıra çevresel streslere adaptasyonda da etkili oldukları tespit edilmiştir. Bu derlemede, özellikle son yıllarda yapılmış olan, brassinosteroidlerin fizyolojik fonksiyonları, BR sinyal iletim modeli, BR biyosentezi, BR’ler tarafından uyarılan genler ve BR mutantları ile ilgili araştırma bulguları hakkında bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler *Brassinosteroidler, fizyolojik etkiler, sinyal iletimi ve biyosentezi, BR mutantları, abiyotik stres.*

SIXTH CLASS OF PLANT HORMONES: BRASSINOSTEROIDS

Abstract Plant steroids include more than 70 compounds structurally similar to insect, animal and human steroid hormones. Brassinosteroids (BRs), a new class of plant hormones are frequently encountered in the plants and belong to a specific group of steroids. It has been found that BRs at very low concentrations are effective in cell division, elongation and expansion, photo-morphogenesis, development of reproductive organs, leaf senescence, the increase in total biomass and yield as well as regulatory functions such as growth and development of plant adaptation to environmental stresses. In this review, especially covering the recent years, the results obtained from the studies regarding the physiological functions of BRs, BR transduction pathway, BR biosynthesis, the genes induced by BRs and BR mutants are presented.

Keywords *Brassinosteroids, physiological effects, signal transduction, biosynthesis, BR mutants, abiotic stress*

1. GİRİŞ

Yakın zamana kadar, bitki büyüme ve gelişimini, oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen olarak adlandırılan 5 grup hormonun düzenlediği düşünülmekteydi. Ancak, son yıllarda bitki hormonlarının altıncı grubu olarak brassinosteroidi de göz önüne almayı gerektiren kanıtlar ortaya konmuştur [1]. Araştırmacılar ilk kez 1979 yılında, 227 kg kolza poleninden 4 mg en aktif olan brassin bileşiğini izole etmiş ve bunu **brassinolid** olarak isimlendirmişlerdir. X-ışını analizi ve spektrofotometrik çalışmalar sonucu, brassinolid (BL)'in kimyasal yapısı ortaya çıkarılmış ve hayvan steroid hormonlarının yapısına yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bitkilerden izole edilen steroidal maddeler olan brassinosteroidler (BR'ler), bitkilerde endojen bulunan bileşikler olarak, büyüme ve gelişmede birçok etkisi olmasına rağmen, o yıllar yeni bir bitki hormon sınıfı olarak kabul edilmemiştir. Ancak, 1990'lı yılların ortalarından sonra Arabidopsis'te yapılan genetik çalışmalar, brassinosteroidlerin yeni bir bitki hormon sınıfı olarak diğer hormonlarla birlikte bitki gelişiminde birçok olayın düzenlenmesinde, özellikle tohum çimlenmesinde, kök ve gövde gelişiminde, vasküler farklılaşma ve fertilitede etkili olduklarını ortaya koymuştur. Brassinosteroidlerin saflaştırma çalışmaları devam ederken iki temel deney yapılmıştır. Bunlardan ilki, fasulye “ikinci-internod biyolojik deneyi”dir. Fasulye bitkilerine ait ikinci internodlardan parçalar kesilmiş ve bu parçalar artan konsantrasyonlardaki BR çözeltilerine birkaç gün süreyle batırılmıştır. BR uygulaması yapılmayan parçalarda değişme olmazken, BR'in düşük konsantrasyonları uzamayı teşvik etmiş, yüksek konsantrasyonları ise gövdede kalınlaşma, bükülme ve yarılmaya sebep

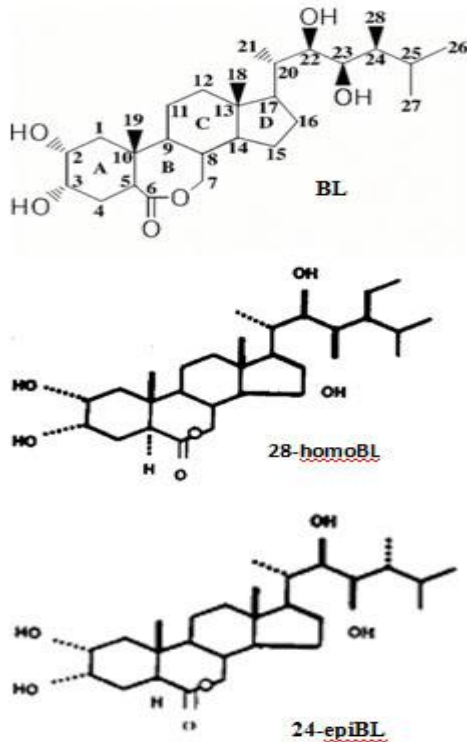
olmuştur. İkinci deney, “çeltikte yaprak eğilmesi biyolojik deneyi”dir. Bu deneyde ise çüce çeltik bitkilerinin 2. yaprak ayası ile 2. yaprak kınının birleşme noktasına etanol içinde çözülmüş bir damla brassinosteroid damlatılmıştır. Yüksek nem altında 2 günlük inkübasyon sonucunda yaprak ayası ve yaprak kını arasındaki (2. yaprak ayası ile 3. yaprak kını) dış açılı ölçülmüş ve dış açının uygulanan BR konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Yapılan bu deneyler, biyolojik aktif brassinosteroidler ile onların inaktif araçları ya da metabolitlerini ayırmış ayrıca, ne kadar miktar aktif bileşik kullanılması gerektiğini göstermiştir [2]. Bu derlemede, BR'lerin bitki hormonu olarak tanımlanmasını sağlayan genetik çalışmalar, biyosentezleri, taşınımları, günümüzde kabul edilen BR sinyal iletim modeli ile bitkilerdeki fizyolojik etkilerini tanımlamaya yönelik çalışmalar değerlendirilmiştir.

2. BR ÇEŞİTLERİ, BULUNDUĞU BİTKİLER VE BİYOSENTEZİ

2.1. Çeşitleri

Grove ve ark. (1979), ilk kez kolzadan brassinolidi [(22R, 23R, 24S)-2 α , 3 α , 22,23-tetrahidroksi-24-metil- β -homo-7-oksa-5 α -kolestan-6-on]] izole etmeyi başarmışlardır [3]. BR'ler kolestanın hidroksile edilmiş türevleridir ve BR'lerin yapısal varyasyonları, C17 yan zincirinin yanı sıra A ve B halkası üzerine farklı grupların gelmesi ile elde edilmektedir. Farklı BR'ler, yan zincir uzunluğuna (yan zincirdeki C sayılarına) göre, C₂₇, C₂₈ ve C₂₉ BR'leri olarak sınıflandırılmaktadır [4]. C₂₇, C₂₈ ve C₂₉ steroidlerini içeren BR'ler, benzer yan zincir yapılarına sahiptir ve genel olarak 5 α -kolestan iskeletini taşımaktadırlar [5]. C₂₇ BR'leri, C24 pozisyonunda alkil grubu içermemektedir ve kolesterolden üretilmektedir. C₂₈ BR'leri, C24 pozisyonunda bir metilen, α -metil veya β -

metil gruplarına sahiptir ve 24-metilenekolesterol, kampesterol ya da 24-epikampesteroldan türevlenebilmektedir. C₂₉ BR'leri, C₂₄'de etil veya α -etil grubuna sahiptir ve isofukosterol veya sitosterolden türevlenmektedir. Ayrıca, C₂₄'de bir metilen ve C₂₅'de ilave bir metil grubu içeren C₂₉ BR'leri, 25-metil-24-metilenekolesterolen türevlenmektedir [6]. C₂₈ BR'lerin ara bileşikleri, bitkilerde en yaygın bulunan formlardır [5]. Doğadaki BR'lere ardışık sayısal numaralandırma yapılmıştır. BR1, brassinolidi ifade etmekte ve diğerleri BR2, BR3, BR4...BRn olarak devam etmektedir. Bununla birlikte tüm BR'ler, daima biyolojik olarak aktif değildir. Brassinolid (BL), 24-epibrassinolid (24-epiBL) ve 28-homobrassinolid (28-homoBL) fizyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan biyolojik aktif brassinosteroidlerdir (Şekil 1) [1]. Biyolojik olarak en aktif BR olan BL, C₂₈ BR'leri içerisinde yer almaktadır [5].



Şekil 1. Brassinolid (BL) [19], 28-Homobrassinolid (28-homoBL) ve 24-Epibrassinolid (24-epiBL)'in kimyasal yapısı [1]

2.2. BR Varlığı Tespit Edilen Bitkiler

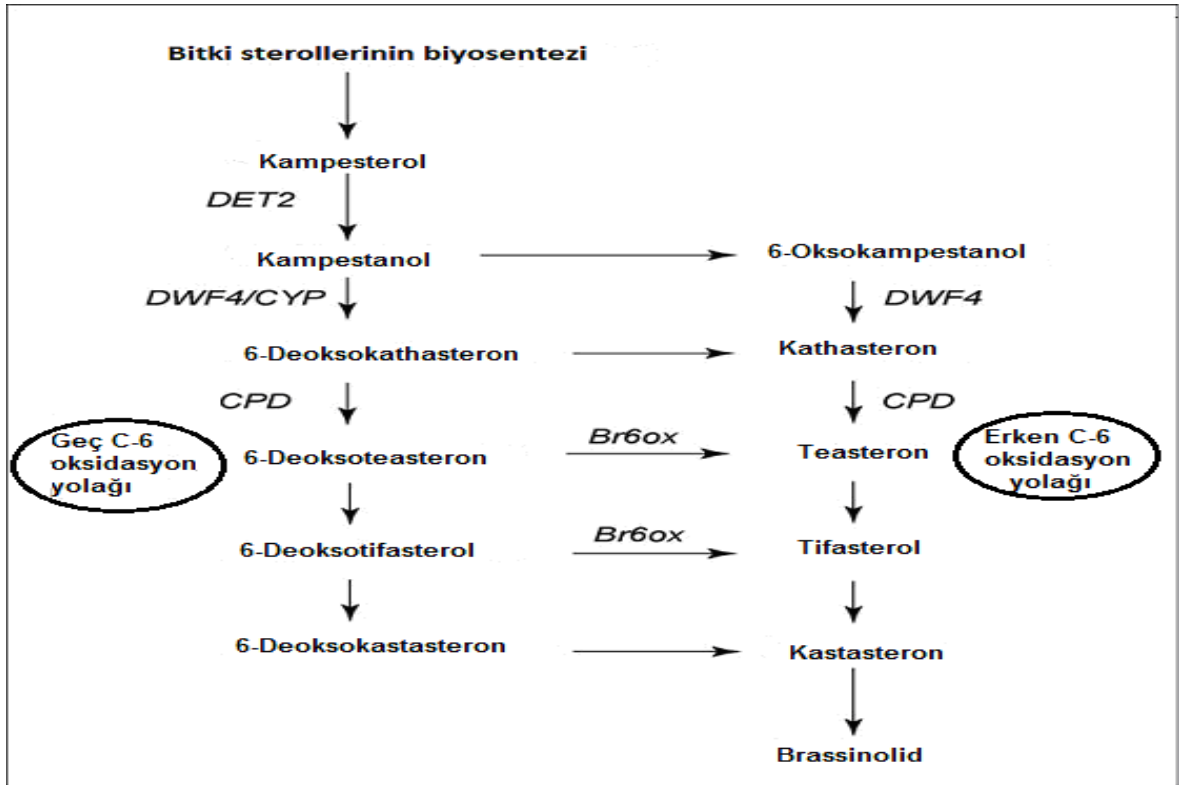
BR'lerin gymnospermlerde (3 familya) ve angiospermlerde (monokotlarda 15 familya ve dikotlarda 16 familyada) bulunmasının yanı sıra daha sonra alg ve eğreltilerde de varlıkları belirlenmiştir. Tüm bitki kısımlarında biyosentezi gerçekleştirilebilen BR'ler bitkilerde polen, tohum, yaprak, kök, gövde, çiçek gibi kısımlarda bulunabilmektedir [7]. Endojen BR düzeyleri, bitki dokuları ve kısımları arasında farklılık gösterebilmektedir. BR'ler en fazla polen ve tohumlarda yer alırken sürgün, meyve, gal, anter, çiçek tomurcukları ve kambiyal bölgelerde de bulunabilmektedir [8]. Farklı dokularda endojen BR düzeylerinin belirlenmesine yönelik moleküler çalışmalar da yapılmaktadır [9]. En yüksek konsantrasyon, 10⁻¹ nmol/g yaş ağırlık olarak *Brassica napus* ve *Vicia faba* polenlerinden izole edilen BL'ye aittir. En düşük konsantrasyon ise, 10⁻⁷ nmol/g yaş ağırlık olarak Çin lahanası olan *Brassica campestris* var. *pekinensis*'in olgunlaşmamış tohum ve sürgünlerinden elde edilen homokastasterona aittir. BL'nin orijinal kaynağı olan olgunlaşmamış polen ve tohumlar 1-10 ng/g yaş ağırlık olarak bitkisel hormonların en fazlasını içermektedir. Oysa yapraklar, 0.01–0,1 ng/g yaş ağırlık olarak daha düşük konsantrasyonları içermektedirler. *Arabidopsis thaliana*'nın olgun tohumlarındaki ortalama steroid içeriği, 3.9x10⁻³ nmol/g BL, 9.5x10⁻⁴ nmol/g kastasteron, 3x10⁻³ nmol/g tifasterol, 3.5x10⁻³ nmol/g 6-deoksokastasteron, 2.1x10⁻³ nmol/g 6-deksotifasterol, 1.2x10⁻³ nmol/g 6-deksoteasteron olarak belirlenmiştir [7].

2.3. Biyosentezi

BR biyosentezi ve BR biyosentezinden sorumlu genler, ilk olarak *Arabidopsis*, çeltik ve domateste tanımlanmıştır. BR'ler kampesterol, sitosterol ve kolesterolden

sentezlenmektedir. Kampesterol ve sitosterol hücre membranında fazla bulunurken, kolesterol oldukça az miktarda bulunmaktadır. Hücrede bulunan 3 sterolde bitki hücrelerinde fazla sayıda aracıyı metabolize etmektedir fakat bu metabolitlerden çok azı biyolojik olarak aktiftir [2]. BR'in en aktif formu olan brassinolid, kampesterolden birçok yol ile sentezlenmektedir. Basamak basamak yapılan metabolik çalışmalar, kampesterolden kastasterona erken ve geç C-6 oksidasyon yolağı olmak üzere 2 bağlantılı paralel yolak olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 2). Son basamaklarda, kastasteron B halkasının laktanizasyonu ile brassinolide

dönüştürülmektedir. BR biyosentezindeki oksidasyon basamakları sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri tarafından sentezlenmektedir. C-22, C-23 hidroksilasyon ve C-6 oksidasyon reaksiyonları BR biyosentezinde anahtar regülatör basamaklardır [10]. Karmaşık olan BR metabolik yolları; dehidrojenasyon, demetilasyon, epimerizasyon, esterifikasyon, glikozilasyon, hidroksilasyon ve sülfonasyon gibi metabolik süreçleri gerektirmektedir [4]. BR biyosentezinde birbiriyle bağlantılı iki yolak olması sentezin kompleksliğini arttırırken, çeşitli stres ortamları gibi farklı fizyolojik şartlarda avantaj sağlamaktadır [2].



Şekil 2. BR biyosentez yolunun basitleştirilmiş şekli [10]

Bitkilerde organa özel regülasyonda, BR biyosentez genlerinin ekspresyonuna bakıldığında *BR6ox* ve *DWF4* genlerinin ekspresyonunun maksimum olarak sürgün uçlarında ve sonrasında da meyvede olması, bu organlardaki endojen BR seviyeleri ile de

uyuşmasına bağlı olarak, BR'lerin genç ve gelişmekte olan organlarda oldukça aktif olarak sentez edildiğini göstermektedir [4, 10].

BR biyosentezinin subsellüler lokalizasyonu henüz tam olarak tanımlanmamıştır.

Gibberellin biyosentezinin endoplazmik retikulumda gerçekleşmesine benzer olarak brassinolid sentezinin de endoplazmik retikulumda gerçekleştiği düşünülmektedir [2].

2.3.1. BR Biyosentez İnhibitörleri

BR biyosentez yollarının belirlenmesine paralel olarak BR biyosentez inhibitörlerinin kimyasal yapıları ve biyolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu inhibitörler, BR'lerin bitki gelişimi yanında fotomorfogenezis, vasküler farklılaşma ve çeşitli hastalıklara karşı dayanıklılığın sağlanması üzerine olan etkilerini ortaya çıkarması bakımından önemlidir [9]. Ayrıca BR inhibitörleri, hem BR biyosentezinde hem de sinyal iletiminde rol oynayan yeni bileşiklerin belirlenmesine ve BR'lerin yeni fonksiyonlarının ortaya çıkarılmasına olanak sağlamaktadır. BR inhibitörleri, ilk olarak 1999 yılında yayınlanmıştır. Brassinozol (Brz), en yaygın olan BR biyosentez inhibitörü olup bitki hücrelerinde BR içeriğini azaltmaktadır. Bileşik, DWARF4 steroid hidroksilaz enzimine bağlanıp, BR biyosentezinde gerekli olan yan zincirlerin hidroksilasyonunu bloke ederek BR sentezini engellemektedir. Unikonazol ve çeşitli triazol bileşikleri, gibberellik asit biyosentez inhibitörleri olup aynı zamanda BR biyosentezini de engellemektedir. Paklobutrazol, triadimefon, fenarimol, propikonazol, Brz2001, Brz220, Brz22012 ve DPPM4 de diğer BR biyosentez inhibitörleridir [11].

BR'in bitkilerdeki yeni fonksiyonlarını ortaya çıkarmak için özellikle plastid farklılaşması, ksilem gelişimi ve karanlıkta fotomorfogenezis çalışmalarında brassinozol yaygın olarak kullanılmıştır. Plastid farklılaşmasındaki rolünü ortaya koymak amacı ile *Arabidopsis thaliana*'ya 0.1 ile 2 µM konsantrasyon aralığında brassinozol uygulanmış ve karanlıkta gelişen fideler, kısa

hipokotilli, uzamış kotiledonlu ve gerçek yapraklara sahip olarak ışıkta büyüyen bitkilerin morfolojik özelliklerini sergilemişlerdir. Karanlıkta büyütülen kontrol bitkilerinde (uygulanmaz bitkilerde) ise, yaprak taslakları gelişmemiştir. Oysa en düşük konsantrasyonda brassinozol uygulamasında, uzun hipokotilli ve yaprak tomurcukları gelişmiş bitkiler elde edilmiş; en yüksek konsantrasyonda brassinozol uygulamasında, kısa hipokotilli ve yapraklı bitkiler gözlenmiştir. Elektron mikroskobu çalışmaları plastidlerin, birkaç tilakoid membrana ve prolamellar yapıya sahip etioplastlar halinde olduğunu göstermiştir. Karanlıkta brassinozol uygulaması, tilakoid membranların gelişiminde öncül olan plastid farklılaşmasının ilk basamaklarını teşvik etmiştir. Sonuç olarak BR'lerin, plastid farklılaşmasında ve fotomorfogeneziste önemli rol oynadıkları belirlenmiştir [11].

Vasküler farklılaşmadaki rolünü belirlemek için, tere bitkisine brassinozol uygulanmış ve uygulamalı bitkiler, koyu yeşil ve kıvrık yapraklara sahip çüce fenotipler sergilemiş, normal gelişim ise BL uygulaması ile sağlanmıştır. Brassinozol uygulamasından 5 gün sonra tere hipokotillerinde primer floem ve ksilem gelişimi normal iken 40 gün sonra sekonder ksilem bölgesinin kontrol bitkilerine nazaran uygulamalı bitkilerde daha küçük olduğu belirlenmiştir [11].

Bitki savunmasında BR'lerin gerekliliği, Brz2001 kullanılarak yapılan deneylerle ispatlanmıştır. BR'lerin etilen biyosentezini arttırarak soğuk stresine karşı dayanıklılığı arttırmada rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca, bakteriyal patojen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* tarafından oluşturulan tütün vahşi ateş hastalığının ve fungal patojen olan *Oidium* sp. tarafından oluşturulan küllemenin etkilerini azalttığı ifade edilmiştir. BR biyosentez inhibitörleri, bitki gelişimi ile ilgili olarak özellikle internod uzaması ve yaprak gelişimini geciktirmiş dolayısı ile BR'lerin hem yaprak hem de çiçek oluşumu

ve gelişiminde rol oynadıkları belirlenmiştir [11].

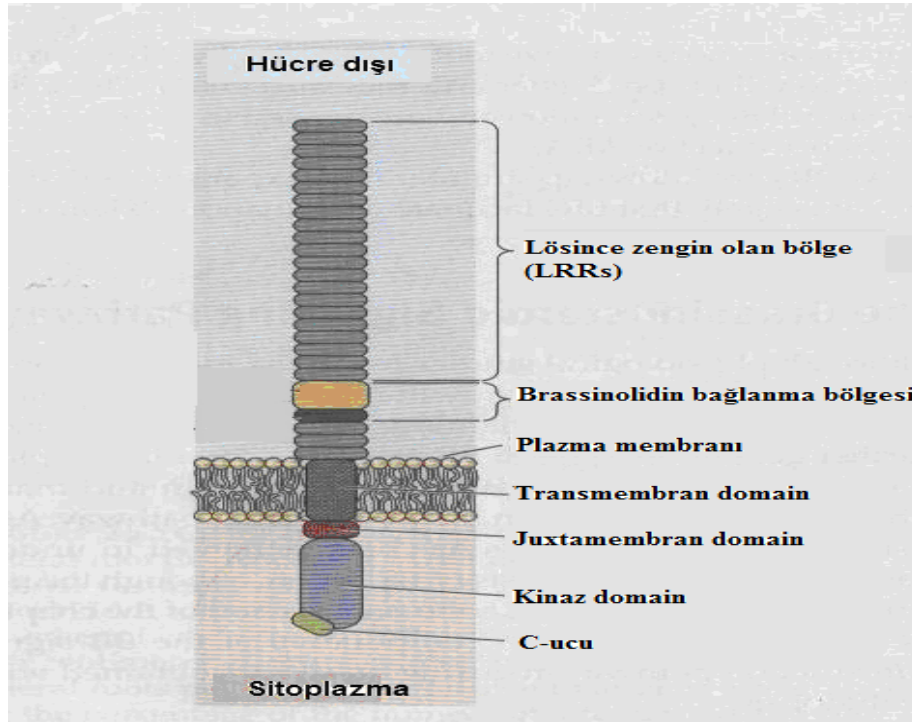
3. BR'LERİN TAŞINIMI

24-epiBL'in ekzojen uygulanması ile kökten gövdeye taşındığı saptanmıştır. Örneğin, salatalık, domates ve buğday köklerine radyoaktif (¹⁴C) olarak işaretlenmiş 24-epiBL uygulaması yapıldığında radyoaktivitenin gövdeye taşındığı bulunmuştur. Ayrıca BR sentezlemeyen Arabidopsis mutantlarının, BL içerikli agar ortamında yetiştirildiklerinde yabancı tip fenotipe dönmeleri sağlanmış ve yabancı tip (wild type) *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin yaprak sapları kök tarafından alınan BL'e bağlı olarak uzamıştır. Fakat ¹⁴C-24-epiBL uygulaması genç salatalık yapraklarının üst yüzeyine yapıldığında, yaprak tarafından hemen alındığı ama yaprak dışında diğer kısımlara yavaş taşındığı saptanmıştır. Uygulanan ¹⁴C - 24-epiBL'den sadece %6'sının daha genç yapraklara taşındığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ekzojen BR uygulamasının köklerden gövdeye ve yaprağa taşınıp diğer organlara taşınmadığı sonucunu desteklemiştir. Kökler tarafından alınan 24-epiBL'in gövdeye ksilem akışı ile hareket ettiği varsayılmaktadır. Ksilem akışının tek yönlü olmasından dolayı, yapraklara ekzojen uygulanan 24-epiBL'nin yapraktan diğer yapraklara sadece floem yoluyla taşındığı belirtilmektedir. Ekzojen uygulanan 24-epiBL'in kökten gövdeye taşınımında kanıtlar olmasına rağmen endojen BR'lerin kökten gövdeye taşınımının aynı şekilde olmadığı ispatlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile endojen BR'lerin sentez edildikleri bölgede lokal olarak rol aldığı sonucu desteklenmiştir. BR aracısı metabolitlerin dokulara dağılımı karşılaştırıldığında, farklı organlarda farklı metabolitlerin miktarlarının farklı olmasına rağmen tüm bitki dokularında

var olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; Arabidopsis, bezelye ve domateste yapılan çalışmalarda, erken aracı olan bileşikler kökte daha fazla bulunurken, kastasteron gibi geç aracılardan gövdede köke nazaran daha fazla biriktiği saptanmıştır. BR biyosentezi ile ilgili enzimlerin, çalışılan tüm dokularda eksprese edildiği fakat ekspresyon seviyelerinin dokudan dokuya değiştiği tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyelerindeki bu değişimlerin ise enzimlerin dokulardaki farklı görevleri ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Birbirine paralel olarak aynı anda birçok yerde gerçekleşen BR biyosentezi ve BR sinyal iletimi bileşenlerinin özellikle genç dokular başta olmak üzere tüm bitkide eksprese olduğu görülmüştür. Kanıtlar, her organın BR sentezlediğini ve kendi aktif BR'lerini kullandıklarını ortaya koymuştur [2].

4. BR SİNYAL İLETİM MODELİ

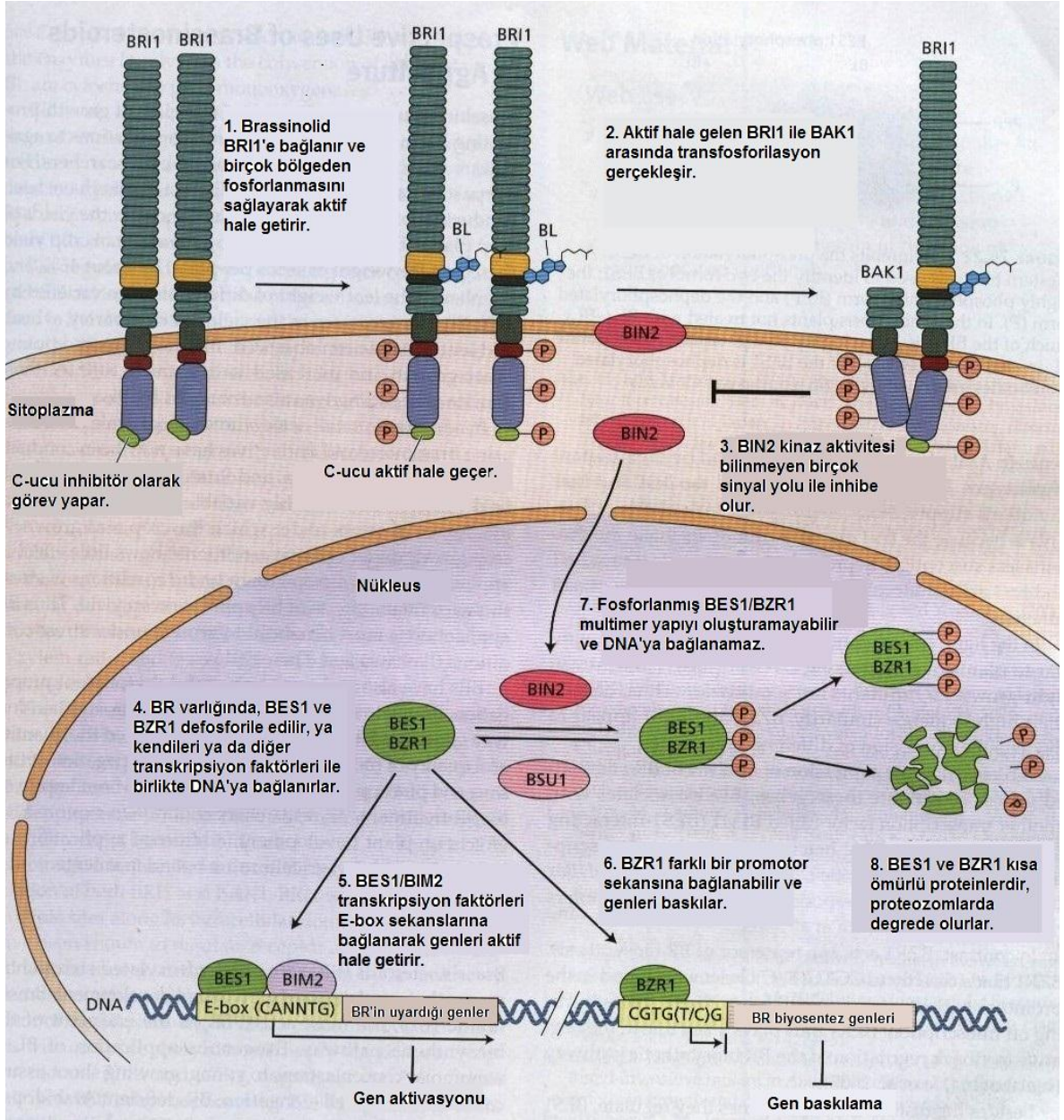
BR'lerin farklı mutantları ile yapılan moleküler genetik çalışmalar, bu hormon grubunun normal bitki gelişimi ve büyümesindeki önemini ortaya koymuştur [12]. Yapılan fizyolojik çalışmalar her ne kadar brassinosteroidlerin bitki büyüme regülatörü olarak tanımlanmasına izin verse de genetik çalışmalar, yeni bir bitki hormonu olduğunu ispatlamıştır. Plazma membranına lokalize olmuş BR-reseptörü ve sinyal iletiminde rol oynayan diğer elementlerin tanımlanması genetik çalışmalar ile sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu bugün kabul edilen BR'in sinyal iletim modeli şu şekildedir: Hücre yüzeyindeki BL, plazma membranına lokalize olmuş homooligomer yapıda olan lösün bakımından zengin (leucine-rich repeat-LRRs) reseptör - kinaz benzeri (receptor-like kinase-RLK) BRI1(Brassinosteroid Insensitive 1) tarafından algılanmaktadır (Şekil 3) [2].



Şekil 3. BR reseptörü BRI1'in domain yapısı. Plazma membranına lokalize olan BRI1, hücre dışı kısmında lösince zengin olan bölge (LRRs) ve brassinolid için bağlanma bölgesine sahip iken, hücre içi kısmında juxtamembran domain, kinaz domain ve C-uç kısımlarına sahiptir (Juxtamembran: Plazma membranının sitoplazmaya bakan yüzündeki reseptöre ait domain) [2]

Brassinolidin BRI1'e bağlanması ile BRI1'in C-uç domain otofosforilasyonu, inhibitör protein olan BKI1'in (BRI1 kinaz inhibitör 1) yapısının ayrılması ve BRI1'in hetero-oligomer yapıda olan ikinci LRR-RLK olan BAK1 (BRI1-associated reseptor kinase 1) ile transfosforilasyonu gibi bir seri biyokimyasal olayı teşvik etmektedir. BR varlığında, BRI1/BAK1'in aktivasyonu ile sinyal iletimi başlamakta ve fosfataz BSU1 (bri1-suppressor 1) defosforilasyon ile BZR1 ve BES1'i pozitif regüle etmektedir. BES1 ve BZR1'in aktif defosforilasyon formları

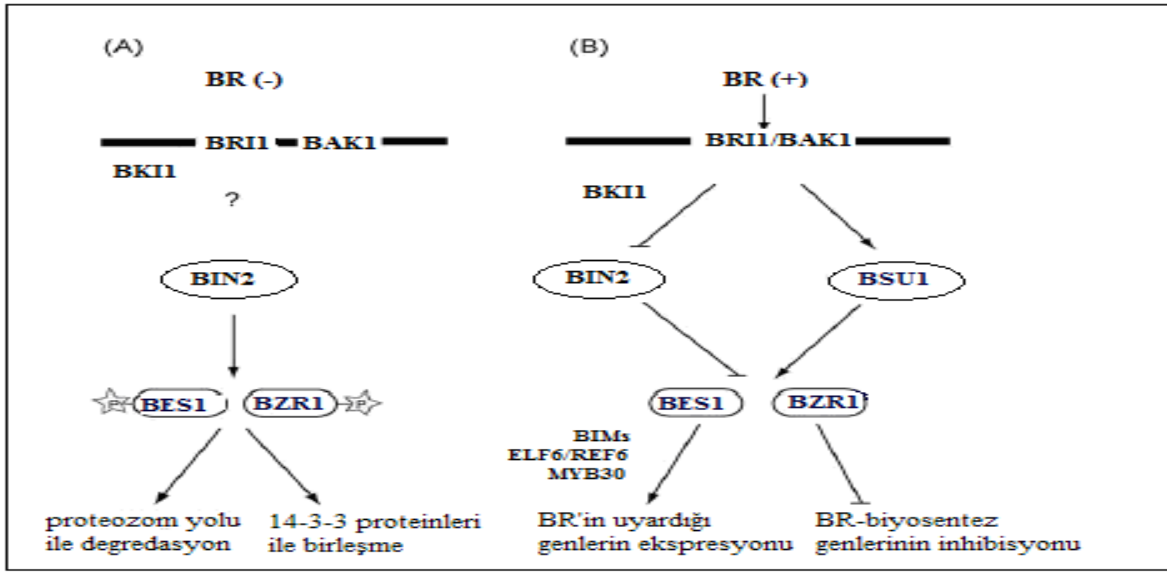
BR'ler tarafından uyarılan genlerin transkripsiyonuna (BES1) ve BR biyosentez genlerinin baskılanmasına (BZR1) neden olmaktadır. BR sinyalinde diğer bilinen komponentlerden biri de negatif regülatör olan BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), transkripsiyon faktörü olan BZR1 (brassinazole-resistant 1) ve BES1 (bri1-EMS-suppressor 1)'i bir çok bölgeden fosforlayarak negatif regüle etmektedir. BIN2, BZR1 ve BES1'in degrede olmasını sağlayarak DNA'ya bağlanmalarını önler (Şekil 4) [2, 10].



Şekil 4. Hücre yüzeyinde BR'in algılanması ve sinyalizasyonu [2]

Kısaca; BR varlığında (+), BR reseptörü olan BRI1, BAK1'e bağlanarak onu aktif hale getirirken BIN2'yi inaktif hale getirmektedir. BIN2'in inaktif hale gelmesiyle BSU1 aktif hale gelir ve bu aktivasyon sonucu BZR1 ve BES1'de aktive edilir. Aktive edilmiş BZR1, BR-biyosentez genlerinin inhibisyonuna sebep olurken, BES1'in ise diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte BR'in uyardığı genlerin ekspresyonlarını

etkilediğini söyleyebiliriz. BR yokluğunda (-) ise, BIN2 aktif hale geçerek, BZR1 ve BES1'in inaktivasyonunu sağlar. İnaktif hale geçen BZR1 ve BES1 ya proteozom yolu ile degrade olur ya da 14-3-3 proteinleri ile birleşme meydana gelir. Fakat ne BIN2'in ne de BSU1'in BRI1 ile interaksyonu ve BR'in sinyalini nasıl aktardığı şu ana kadar bilinmemektedir (Şekil 5) [10].



Şekil 5. BR sinyal yolu. (A) BR yokluğunda: BR(-) ve (B) BR varlığında: BR (+) BR sinyalizasyonu [10]

5. BR BİYOSENTEZ GENLERİ VE SİNYAL GENLERİ

BR'lerin bitki gelişimindeki önemli rolünün ortaya çıkarılması, tanımlanması ve BR sinyal iletim yolundaki birçok bileşenin karakterizasyonu, Arabidopsis'de BR-sentezlemeyen (BR-deficient) ve BR-yanıt vermeyen (BR-insensitive) mutantlarla yapılan moleküler genetik çalışmalar ile olmuştur [13]. Hormon-sentezlemeyen mutantlar; biyosentetik enzimleri kodlayan genlerde oluşturulan mutasyon olup hormon uygulaması sonucu değişmekte yani yabani tip fenotipe dönmektedir. Hormon-yanıt vermeyen mutantlar ise hormon-sentezlemeyen mutantlarla aynı fenotipe sahip olan fakat hormon uygulaması ile geri döndürülemeyen mutantlardır. Birçok BR-sentezlemeyen ve BR-yanıt vermeyen mutantlarda, hücre boyutu ve hücreler arası boşluklardaki düşüşten dolayı koyu yeşil renk, cücelik, sıkı rozet yapısı, çiçeklenmede gecikme, senesens ve indirgenmiş fertilitate gibi fenotipik değişiklikler gözlenmiştir [10]. Bu tip mutantların genelde hormon reseptör

ya da sinyal iletim yolağındaki elementlerini kodlayan genlerde mutasyon oluşturulmaktadır [14, 15]. 1970'lerde BR'lerin bitki büyüme ve gelişmesindeki fizyolojik etkilerinin bilinmesine rağmen, 1990'lı yıllarda BR-sentezlemeyen *det2* ve *cpd* mutantlarının elde edilmesi BR'lerin bitki gelişimindeki rolünü ispatlayan ilk genetik kanıt olmuştur. DET2 ve CPD proteinlerinin moleküler karakterizasyonu sonucu, DET2 proteinin steroid 5 α -redüktaz ve CPD proteinin steroid hidroksilaz ile sekans ve fonksiyonel olarak benzerlikleri steroid metabolizmasında bu proteinlerin rolünü göstermektedir. *det2* ve *cpd* mutantlarının doza-bağı ekzojen uygulamalar ile yabani tip fenotipe dönmesi BR biyosentezinde DET2 ve CPD'nin rollerini belirgin bir biçimde göstermiştir [10, 16].

Şu ana kadar farklı bitkilerde yapılan çalışmalar ile ortaya koyulan BR sinyali ve biyosentezinde sorumlu olan genler Çizelge 1'de özetlenmiştir [10].

Çizelge 1. Ekspresyonlarında ya da fonksiyonlarında modifikasyon yapılmış BR biyosentez ve sinyal genlerinin özeti [10]

	Gen ismi	Genin tanımı	Genetik modifikasyon	Bitki ismi	Gözlenen sonuç
BR biyosentezi	<i>DWF4</i>	<i>A. thaliana</i> sitokrom P450 monooksijenaz	Ektopik yüksek ekspresyon (ectopic overexpression)	Arabidopsis	Tohum veriminde artış
	<i>ZmDWF4</i>	<i>DWF4</i> 'ün mısır bitkisindeki benzeri (ortholog)	Ektopik yüksek ekspresyon	Mısır	Tohum, dal sayısı ve çiçek durumu sapının boyunda artış
	<i>CYP</i>	C-22 hidroksilaz	Gövde, kök ve yapraklarda yüksek ekspresyon	Çeltik	Fotosentez etkinliğinde ve tane veriminde artış
	<i>GhDET2</i>	<i>DET2</i> 'nin (steroid 5 α -redüktaz) pamuktaki benzeri	Tohum kabuğuna spesifik ekspresyon	Pamuk	Lif verimi ve kalitesinde artış
	<i>OsDWARF4</i>	<i>DWF4</i> 'ün çeltikteki benzeri	Genin ekspresyonunun engellenmesi (gene knockout)	Çeltik	Yarı cüce, dik yapraklar, sık dikim koşulları altında biyokütle ve tane veriminde artış, küçük tohumlar
BR sinyali	<i>OsBR11</i>	BR11'in çeltikteki benzeri (BR-reseptörü)	Eş-baskılama (Co-suppression)	Çeltik	Dik yapraklar, verim potansiyelinde artış
	<i>AtBAK1</i>	BR-eş reseptörü	Ektopik yüksek ekspresyon	Çeltik	Yarı cüce bitkiler
	<i>UZU (HvBR11)</i>	BR11'in arpadaki benzeri (BR-reseptörü)	Tek nükleotid değişimi (BR-yanıt vermeyen mutant)	Arpa	Yarı cüce, verimde artış ve yatmaya dayanıklılık
	<i>OsGSK1</i>	BIN2'in çeltikteki benzeri (GSK3/SHAGGY-protein kinaz benzeri, BR sinyalizasyonunda negatif regülatör)	Genin ekspresyonunun engellenmesi	Çeltik	Abiyotik stres toleransında artış
Kabul edilen steroid regülasyonu	<i>AtHSD</i>	11- β -Hidroksisterol dehidrogenaz	Ektopik yüksek ekspresyon	Arabidopsis	Büyümede, verimde ve tuz toleransında artış, BR'in aktive ettiği genlerin sürekli ekspresyonu

6. BR'LERİN FİZYOLOJİK ETKİLERİ

BR'ler, bitkilerde büyüme ve gelişme üzerinde çeşitli düzenleyici aktivitelere sahiptir (Çizelge 2) [6]. BR'lerin bitki gelişimindeki başlıca etkileri hücre bölünmesi ve genişlemesi, hücre

farklılaşma, lateral kök gelişimi, vasküler farklılaşma, polen tübü gelişimi, apikal dominansının sürdürülmesi, çiçeklenme, senesens ve stres toleransının artırılması olarak sıralanabilir [1, 2, 17, 18, 19, 20].

Çizelge 2. Bitkilerde BR'lerin fizyolojik etkileri [6]

Hücre Düzeyi	Tüm Bitki Düzeyi
<ul style="list-style-type: none">• Uzama ve bölünmenin teşviki• Hormonal dengenin sağlanması• Protein ve nükleik asit sentez aktivasyonu• Enzim aktivitesinin artması ve H⁺ pompası aktivitesinin düzenlenmesi• Membran bileşimi ve doymuş yağ asidi kompozisyonunu etkileme• Fotosentetik kapasitenin artırılması ve ürünlerin translokasyonu	<ul style="list-style-type: none">• Büyümenin teşviki• Döllenmenin artırılması• Vejetatif gelişim periyodunun kısaltılması• Meyve kalitesi ve boyutunun artırılması• Meyve kalitesi ve besinsel bileşenlerin içeriğini etkileme• Uygun olmayan çevresel faktörler, stres ve hastalıklara dayanıklılığının artırılması• Ürün verimliliğinin artırılması

BR'ler hücre genişlemesi ve hücre bölünmesini teşvik eder: BR'lerin büyüme destekleyici etkileri hücre uzaması ve bölünmesini hızlandırması ile gerçekleşmektedir. BR'lerin fizyolojik bu etkisi ilk kez fasulye ikinci internod deneyi ile gösterilmiştir. Diğer deney ise, çeltikte yaprak eğilmesi biyolojik deneyidir. Çeltikte yaprak ayasının eğilmesine BR'in teşvik ettiği hücre genişlemesi sebep olmuştur. Yaprak ayasının eğilmesi etilenin sebep olduğu epinastiye benzer bir durumdur. Fakat bu deneyde BR'ler, çeltik laminasının yaprak kınına değdiği bölgede üst yüzeyde bulunan hücreler, alt yüzeydeki hücrelere nazaran daha çok uzamış böylece yaprağın dikey olarak dış kısma doğru eğilmesine sebep olmuştur. BR-sentezlemeyen mutantlar ile yabancı tip bitkilerin yapraklarında yapılan mikroskopik çalışmada, mutantlarda hücre boyutunun yabancı tipe göre daha küçük olması BR'lerin gövdede önemli bir bitki büyüme hormon sınıfı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, BR biyosentezi ile ilgili *DWF4* geninin yüksek ekspresyonu bitki gelişiminde artışa sebep olmuştur. Böylece, BR'lerin en

önemli ve erken tanınmasını sağlayan özelliğinin hücre bölünmesini ve uzamasını teşvik ediyor olması sonucuna varılmıştır. Hücre uzaması için hücre duvarında gevşeme, turgor basıncını sürdürmek amacıyla osmotik taşınım ile hücreye su alınması ve hücre duvarı kalınlığının aynı kalması sentez ile gerçekleşmektedir. Her iki basamak da benzer şekilde BR'ler tarafından ayarlanmaktadır. BR'ler, aquaporinler ve vakuolar H⁺-ATPaz aktivitesi ile su alınımını etkilemektedirler. Arabidopsis mutanı olan *det3*, V-ATPaz'ın alt ünitelerinden birindeki mutasyon ile elde edilmiştir. *Det3* mutanı, BR-sentezlemeyen *det2* mutanı ile benzer fenotip göstermiş fakat ekzojen uygulamaya karşı *det3* mutantının daha az duyarlı olduğu saptanmıştır. BR'ler ayrıca hücre duvarında gevşemeyi artırmakta ve ksiloglukan endoglikozilaz/hidroksilaz (XTH'ler) ve hücre duvarında bulunan fakat enzimatik olmayan proteinler gibi hücre duvarını modifiye eden enzimlerin ekspresyonunu teşvik etmektedir. Hücre uzaması, mikrotübül organizasyonunun kontrolü ile de gerçekleşmektedir. Mikrotübül dizilimi, sentez sırasında selüloz mikrofibrillerin

düzenlenmesine yardım eder ve normal hücre uzamasında mikrofibriller hücre duvarında çapraz olarak dizilirler. Yapılan mikroskopik analizler sonucu, BR-sentezlemeyen Arabidopsis mutantlarının mikrotübüllerinin çok az olduğu ve bunların birbirine paralel dizildiği bulunmuştur. Mutantın BR ile muamelesi sonucunda, normal mikrotübül sayısının ve organizasyonunun eski haline geldiği görülmüştür. BR'lerin hücrede toplam tübülün protein miktarını arttırmadığı, fakat mikrotübül oluşumunu ve organizasyonunu düzenlemede rol aldığı bulunmuştur. Hücre uzamasına ek olarak BR'ler, hücre proliferasyonunu da uyarmaktadır. Sitokinin, hücre bölünmesini D-tip siklin (*CYCD3*) ekspresyonuna bağlı olarak teşvik etmektedir. Yapılan çalışmalarda 24-epiBL uygulamasının da *CYCD3* geninin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [2].

BR'ler kök gelişimini hem inhibe eder hem de teşvik ederler: BR-sentezlemeyen mutantlarda, tipik olarak kök gelişiminin indirgenmesi ve BR'lerin normal kök uzaması için gerekli oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte, oksine benzer olarak ekzojen uygulanan BR'ler, konsantrasyona bağlı olarak kök gelişimini negatif ya da pozitif olarak etkileyebilmektedirler. BR-sentezlemeyen mutantlara ekzojen BR uygulaması yapıldığında, düşük konsantrasyonlarda kök gelişiminin arttığı yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe olduğu görülmüştür. İnhibisyon için konsantrasyon sınırı, kullanılan BR analogunun aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Sonuç olarak BR'lerin kök uzaması ve dallanması gibi kök morfolojisinde güçlü etkileri olduğu ortaya koyulmuştur [2].

BR'ler vasküler gelişim boyunca ksilem farklılaşmasını teşvik ederler: BR'ler

ksilemi teşvik edip floem farklılaşmasını baskılayarak vasküler gelişimde önemli rol oynamaktadır. Buna kanıt, *det2* mutantlarındaki vasküler sistemlerin, yabani tip bitkilerden farklı olarak yüksek floem/ksilem oranının bozulması gösterilmiştir. BR-sentezlemeyen mutantlarda, vasküler demetlerin sayısında düşüş ve demetler arasında düzensiz boşluklar gözlenmiştir. Buna karşın mutant bitkilerde, BR reseptör proteininin fazla ekspresyonu sonucu yabani tip bitkilere nazaran daha fazla ksilem üretiminin gerçekleştiği bulunmuştur. Bununla birlikte, BR reseptör-protein benzeri kodlayan genlerin sadece vasküler dokularda eksprese olması, BR sinyal iletim yolunun vasküler sistem için spesifik olduğunu desteklemektedir [2].

BR'ler polen tübü gelişimi için gereklidirler: Polenler, BR'lerce zengin kaynaklar olup bu durum BR'lerin erkek fertilitesindeki önemini ortaya koymaktadır. BR'ler, polen tübü gelişimini (stigmadan embriyo kesesine ulaşmasına kadar) teşvik etmektedir. Örneğin, BR-sentezlemeyen Arabidopsis *cpd* mutanı ile yapılan çalışmada, stigma üzerinde çimlenme sonrası polen tübü uzamasının başarısız olduğu ve polen tübü uzamasının kısmen BR uygulamasına bağlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, BR-yanıt vermeyen mutantlarla yapılan çalışmada, mutantlar kendine tozlaştırılmış, polen tübü gelişimi başarısız olmuş ve sonuçta tohum elde edilememiştir. Bununla birlikte mutantlar ile yabani tip bitkilerin elle tozlaştırılması sonucu fertil tohumlar üretilmiştir. Böylece, normal polen tüp gelişimi için hem BR hem de BR sinyal iletimine ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır [2].

7. BR'LERİN DİĞER BİTKİ HORMONLARI İLE OLASI ETKİLEŞİMLERİ

BR'lerin gelişme üzerine uyarıcı etkileri özellikle genç ve gelişmekte olan gövde dokularında gerçekleşmektedir. Nanomolar konsantrasyonlarda brassinolidin etkisi olan hücre genişlemesinin kinetiği, oksinden farklı olmaktadır. Örneğin, soya fasulyesinin epikotil parçalarına brassinolid uygulaması yapılmış ve brassinolidin arttırdığı uzama oranı 45 dakika sonra başlamış ve uygulamadan birkaç saat sonra maksimum orana ulaşılmıştır. Buna karşın oksin, uzamayı 15 dakika sonra teşvik etmeye başlamış ve maksimum orana 45 dakika içinde ulaşmıştır. Araştırmacılar, BR'lerin büyümeyi gen transkripsiyonu kapsamında daha yavaş bir yolak ile gerçekleştirirken oksinin daha hızlı, belki gen transkripsiyonuna sebep olmadan ya da oksin tarafından indüklenen uyarıcı gen ekspresyonunun brassinolid tarafından indüklenen gen ekspresyonundan daha fazla olabileceğini düşünmüşlerdir. Aslında oksin ve BR'ler, gövde gelişimini sinerjik olarak ve birbirinden bağımsız arttırmakta ve optimum aktivite için her iki hormona da ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, oksinler ve BR'ler, vasküler farklılaşma, çiçek, meyve ile kök gelişimini içeren benzer gelişimsel süreçlerin çoğunda birbirleriyle bağlantılıdır [2, 21, 22]. Chung ve ark. (2011), oksinin *DWARF4* geninin ekspresyonunu teşvik ederek Arabidopsis'de BR biyosentezini arttırdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bir önceki çalışmalarında da Arabidopsis'de BR biyosentez enzimleri içerisinde *DWARF4*'ün sentez edilen BR'in oranını belirleyen enzim olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmalarında Arabidopsis *DWF4* genine promotör olarak GUS (*DWF4*pro:GUS) yerleştirilmiş böyle genin ekspresyon seviyesi ve lokalize olduğu bölgeler histokimyasal çalışmalarla belirlenmiş ayrıca, endojen BR seviyesi

ölçülmüştür. *DWF4*pro:GUS bitkisine farklı doz ve zaman aralıklarında oksin uygulanmış ve çalışmanın sonucunda BR'in biyosentezinin oksin tarafından arttırıldığı tespit edilmiştir. Çalışmada yapılan bir başka analiz ise mikrodizin (microarray) analizi olup, bu çalışmanın sonunda da Arabidopsis'de oksinin BR biyosentezini regüle ettiğini ve BR'lerin büyümeyi teşvik edici etkilerinin oksinler tarafından devam ettirildiği fikrini ortaya koymuşlardır [23]. BR'lerin kök gelişimindeki etkileri, oksin ve gibberellin etkisinden bağımsızdır. Yapılan çalışmada, polar oksin taşınımını engelleyen inhibitör (2,3,5-triiodobenzoik asit-TIBA) kullanılmış fakat BR'in teşvik ettiği kök gelişimi önlenememiştir. BR ve oksinler aynı zamanda uygulandığında her ikisinin de kök gelişiminde destekleyici ve inhibe edici etkileri eklemelidir. Diğer taraftan, BR-sentezlemeyen kök gelişimi indirgenmiş mutantlar gibberellin uygulaması ile normale döndürülemedi. Çalışmalar, BR'lerin kök gelişimini inhibe ederken oksin ya da gibberellin ile interaksyona girmediğini göstermiştir. Fakat oksin gibi BR'in yüksek konsantrasyonları etilen üretimini uyarmakta böylece, kök gelişimi üzerine BR'in inhibitör etkilerinin birkaçının etilen yolu ile olması durumunu olası kılmaktadır. BR'ler düşük konsantrasyonlarda, lateral kök oluşumunu teşvik edebilmektedir. Bu durumda, BR'ler ve oksin sinerjik rol oynamaktadır. Bugün desteklenen modelde, BR'ler lateral kök gelişimini arttırmakta ve bunun bir kısmı polar oksin taşınımı etkisiyle olmaktadır [2]. Tohumlar da polen tanecikleri gibi yüksek seviyede brassinosteroid içermekte ve böylelikle tohum çimlenmesini teşvik etmektedirler. Her ne kadar interaksyonların moleküler temeli bilinmese de diğer bitki hormonları ile interaksyon sonucu bu olayın gerçekleştiği bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile gibberellik asitin tohum çimlenmesinde pozitif, absisik asitin ise negatif etkileri olduğu bulunmuştur. Yapılan

çalışmada, tütünde çimlenmeyi gibberellik asitin sinyalizasyonundan bağımsız olarak BR'lerin arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, BR'lerin gibberellik asit mutantlarında da gecikmiş olan çimlenmeyi ortadan kaldırdığı ve BR mutantlarının ABA tarafından oluşturulan inhibisyona yabancı tip bitkilerden daha duyarlı oldukları saptanmıştır. Böylece, BR'lerin ABA'nın inhibitör etkisinin üstesinden gelmek için gerekli olduğu ve çimlenmeyi teşvik ettiği ortaya konulmuştur [2]. Bitkinin biyotik ve abiyotik streslere adaptasyonunda bitki büyüme düzenleyicilerinin (Absisik asit-ABA, etilen-ET, jasmonik asit-JA ve salisilik asit-SA) görevleri tanımlanmıştır. SA, JA ve ET hormonları patojenlere karşı savunmada ve böcek saldırısında önemli iken ABA'nın kuraklık ve tuz stresinde anahtar hormon olduğu tespit edilmiştir. SA, ET, ABA ve JA sıcaklık stresi ile ilişkilendirilmiş hormonlar olup, mutantlarla yapılan çalışmalar sonucunda bitkilere sıcaklık toleransının kazandırılmasında SA, ET ve ABA'nın etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bitkinin strese cevabında ABA'nın BR'lerin etkilerini inhibe ettiği fakat stres ortamında karşı cevabın oluşturulmasında BR'lerin SA, ET ve ABA'nın sinyal yolağında karşılıklı sinyal alış-verişi olabileceği belirtilmiştir [13].

8. BR'LER İLE İLGİLİ BAZI MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Clouse ve ark. (1996), BR'lerin bitki gelişimi ve büyümedeki rollerini araştırmak için BR-yanıt vermeyen *bri1* mutantını kullanmışlar ve *BRI1* gen lokusunda yapılan mutasyonun, bitkide birçok etkiye neden olması bu genin BR'in algılanması ve sinyal iletimindeki kritik rolünü ortaya koymuştur [24]. Başka bir çalışmada, Arabidopsis mutantına (*dwarf4*) yapılan ekzojen brassinolid uygulaması ile mutantın yabancı tip fenotipe dönmesi sağlanmıştır. *dwarf4* mutantları ışık-

mutantları ile aynı özellikleri gösterse de tamamıyla ve özellikle cücelik brassinosteroidine bağlı olup, diğer hormonların ekzojen uygulaması ile normale dönmemiştir. Buradan, hücre uzaması için brassinosteroidlere kesinlikle ihtiyaç duyulduğu sonucu çıkarılmıştır [25]. *sax1* bir Arabidopsis mutanı olup ABA ve oksine aşırı duyarlıdır. Mutant fidelere yapılan ekzojen BR uygulaması mutantın kısmen normale dönüşümünü sağlamıştır. Bu sonuç, BR ile diğer hormonlar arasında karşılıklı sinyal alış-verişinin (baskılama-indükleme) yanında BR ile ilgili *SAX1* geninin önemini ortaya koymuştur [26]. DNA mikrodizin analizi ile Arabidopsis'in yabancı tipi ile BR-sentezlemeyen *det2* mutantında, BR'in regüle ettiği genler tanımlanmaya çalışılmıştır. Bitkilere BR'in aktif formu olan brassinolid ve BR biyosentezinin spesifik inhibitörü olan brassinazol uygulanarak zıt etkinin, tanımlanan genlerin ekspresyonları üzerine olan etkileri ortaya çıkarılmıştır. BR tarafından regüle edilen genlerin listesinde, sitokrom ile ilgili transkripsiyon faktör genleri, oksinle ilgili genler, P450 genleri ile hücre uzaması ve hücre duvarı organizasyonu ile ilgili genler tespit edilmiştir [27]. Affymetrix Arabidopsis Genom çalışması ile BR tarafından regüle edilen genlerin ekspresyonu üzerinde durulmuştur. BR uygulamasında ve BR eksikliğinde eksprese olan tüm genlerin ekspresyon profilleri yabancı tip Arabidopsis ve mutanı *dwf1-6*'da belirlenmiştir [28]. Belkadir ve Chory (2006) BR sinyalizasyonunda, BR'lerin lösin bakımından zengin olan reseptör kinaza hücre yüzeyinde bağlandığı ve böylelikle hücre içinde sinyal transduksiyon basamaklarını başlatarak bunun sonucunda yüzlerce genin ekspresyonunu değiştirdiğini tespit etmişlerdir [29]. Liu ve ark. (2007), Arabidopsis'de *HSD1* genini tanımlamış olup bu genin kodladığı proteinin hayvanlarda

tanımlanan 11- β -Hidroksisterol dehidrogenaz (HSD) ile homolog olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışma, *AtHSD1*'in BR yolağı ile ilgili olduğunu ve bitkilerde ürün veriminin ve stres toleransının geliştirilmesinde potansiyel olabileceğini düşündürmüştür [30]. Deng ve ark. (2007), *Arabidopsis thaliana*'da 2 boyutlu jel kullanarak BR tarafından regüle edilen proteinleri tanımlanmaya çalışmıştır. Sinyalizasyon, sitoskeletin yeniden düzenlenmesi, hormonların ve vitaminlerin biyosentezi gibi spesifik hücresel proseslerde potansiyel görevleri olduğu öngörülen 42 adet BR tarafından regüle edilen protein tanımlanmıştır [31]. Clouse (2008) yaptığı çalışma ile BR'in sinyal transdüksiyonu ve biyosentezi arasında bir bağlantı olduğunu ve bu bağlantının çiçeklenmenin başlamasını kontrol ettiğini ayrıca, bu kontrolün BR-bağımlı gen ekspresyonunun gerekli kritik transkripsiyon faktörleri ile olduğunu ortaya koymuştur [32].

9. BR'LER VE ABİYOTİK STRES

Abiyotik stres bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere yol açmaktadır. Bitkinin strese verdiği yanıtta BR'lerin olumlu rolleri birçok çalışma ile doğrulanmıştır [13]. Tuz stresi altında yetiştirilen buğday yapraklarına 24-epiBL spreyleme yöntemi ile uygulanmış ve tuzlu şartlarda 24-epiBL'in büyüme ve besin elementlerinin birikimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 24-epiBL'nin ekzojen uygulaması, tuz stresi altında besin maddelerinin birikiminde etkisini göstermemiş fakat biyokütle ve büyümeyi arttırmıştır [33]. Kuraklık stresine maruz bırakılan domates bitkilerine 24-epiBL uygulaması, H₂O₂ içeriği ve lipit peroksidasyonunu azaltmış bununla birlikte prolin, çözülebilir protein içeriği ve antioksidatif enzim aktivitesini arttırmıştır [34]. Dhaubhadel ve ark. (1999) tarafından,

24-epiBL'nin stres koşulları altındaki etkisi, domates ve *Brassica napus* fidelerinde araştırılmış ve 24-epiBL uygulaması ile fidelerin kontrole nazaran letal sıcaklığa daha toleranslı oldukları bulunmuştur. Sıcaklık stresi altındaki *B. napus* fidelerinde, 24-epiBL uygulamalı örneklerde uygulamasız örneklere göre ısı şoku proteinleri birikiminin daha fazla olmasının, 24-epiBL'in stres proteinleri olan HSP'lerin ekspresyonunu indüklemesinden kaynaklandığı ortaya konmuştur [15]. Kabak fidelerine soğuk stresine karşı ekzojen uygulanan 28-homoBL büyümeyi ve fotosentezi maksimum iyileştirerek koruyucu etkisini göstermiştir [35]. Bazı çalışmalarda ise BR'lerin, kombine birden fazla abiyotik strese karşı etkileri de araştırılmıştır. 24-epiBL uygulaması, *A. thaliana* ve *B. napus* fidelerinde kuraklık ve soğuk stresine toleransı arttırmış ayrıca, tuz stresi nedeniyle tohum çimlenmesi inhibisyonunun aşılmasına yardımcı olmuştur. Sonuçta, 24-epiBL'in streslere karşı toleransı artırma yeteneği, kuraklık ve soğuk stres markör genlerinin analizi ile doğrulanmıştır [36]. Xia ve ark. (2009)'nın çalışmalarında amaç, BR'lerin stres toleransını nasıl arttırdığını anlamak olmuş ve salatalık bitkisinde endojen BR seviyesini manipüle ederek BR seviyelerinin fotoooksidatif toleransa, soğuk stresine ve salatalık mozaik virüsüne karşı dayanıklılıkla pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, BR uygulamasının regülatör genler (*RBOH*, *MAPK1* ve *MAPK3*) yanında savunma ve antioksidan yanıt genlerinin ekspresyonunu da teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır [37]. Ozmotik stres altındaki *Sorghum vulgare* bitkilerine 28-homoBL ve 24-epiBL uygulanması sonucu, çözülebilir protein ve prolin içeriğinin artmasına bağlı olarak tohum çimlenme yüzdesi ve fide gelişiminde olumlu etkiler gözlenmiştir [38]. BR'lerin tuzluluk, kuraklık, sıcak, soğuk ve oksidatif stres faktörlerine karşı bitki toleransını arttırması,

BR uygulamalı bitkilerde bu artışın ısı şoku protein genleri (heat shock protein (hsp) genes), *RD29A* ve *ERD10* gibi stres markör genlerinin ekspresyonunun korelasyonu ile kısmen açıklanmaktadır. Ayrıca, BR uygulamalı bitkilerde stres koşulları altında protein sentezinin sürdürüldüğü, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin ve osmotik koruyucuların birikiminin arttığı ve fotosentetik etkinin yükseldiği tespit edilmiştir. Fakat BR'lerin bitki stres yanıtlarını kontrol mekanizması ve stres cevap genlerinin ekspresyonunu nasıl regüle ettiği henüz bilinmemektedir. Farklı bitki hormonları bitkide benzer fizyolojik görevler yapmakta ve hormon biyosentezi seviyesinde, sinyal iletimi ya da gen ekspresyonunda hormonlar arasında sinyal alış-verişi olmaktadır. BR'lerin de diğer hormonlar ile sinyal alış-verişi yolu ile bitkinin strese verdiği yanıtı regüle ettiği düşünülmektedir [13].

9. 1. BR'ler ve Metal Stresi

Bajguz (2000), ağır metal (bakır, kurşun, kadmiyum ve çinko) stresine maruz ırakılan *Chlorella vulgaris*'de, 24-epiBL'in büyüme ve hücrelerdeki ağır metal birikimine olan etkisini araştırmış ve ağır metal ile kontamine olan *C. vulgaris*'de 24-epiBL'in anti-stres etki gösterdiği sonucuna varmıştır [39]. Hayat ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, 60 günlük *Brassica juncea* bitkilerinde kadmiyum ve/veya 28-homoBL'in bitki gelişimi, fotosentez, karbonik anhidraz, nitrat redüktaz ve antioksidatif enzimler üzerinde oluşturdukları değişimler araştırılmıştır. Kadmiyum ve 28-homoBL'nin birlikte yapıldığı uygulamalarda hem kök hem toprak üstü organlarda enzim seviyesi artmış ayrıca, kadmiyumun oluşturduğu toksik etkinin homoBL uygulamasıyla iyileştirildiği belirtilmiştir [12]. Diğer bir araştırmada, maş fasulyesi (*Vigna radiata* L.) fideleri farklı alüminyum

konsantrasyonlarına ve/veya 24-epiBL ya da 28-homoBL uygulamasına tabi tutulmuştur. Sadece epiBL veya homoBL uygulamaları normal gelişim parametrelerinin üzerinde olumlu sonuç verirken; epiBL veya homoBL ile birlikte uygulanan alüminyum ortamında gelişen bitkilerde antioksidan enzim ve prolin içeriği daha da artmıştır [40]. Anuradha ve Rao (2009) tarafından yapılan çalışmada, 24-epiBL'in kadmiyum stresi altında yetiştirilen *Raphanus sativus* L. üzerine olan etkileri bitki gelişimi, yaprakta net fotosentetik oran, karbonik anhidraz ve nitrat redüktaz aktivitelerindeki değişiklikler değerlendirilerek araştırılmıştır.

Kadmiyum bitki büyümesinde, fotosentetik pigment seviyesinde, net fotosentetik oran ve karbonik anhidraz ile nitrat redüktaz aktivitelerinde düşmeye neden olurken, tohuma yapılan 24-epiBL uygulamasının bitki gelişimi, pigment içeriği, fotosentez ve enzim aktivitelerinde ki artış nedeniyle toksik etkiyi azaltıcı etkisi gözlenmiş ve 24-epiBL'in iyileştirici etkisi vurgulanmıştır [41]. Bajguz (2010), *Chlorella vulgaris*'te ağır metal uygulaması sonucu konsantrasyona bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT, APX, GR, SOD), total askorbat ve indirgenmiş glutatyon seviyesinde artma gözlemiştir. Ağır metal uygulaması yapılmış *C. vulgaris* kültürlerinde brassinolid uygulaması ile enzimatik ve enzimatik olmayan sistemin aktif hale geldiği bulunmuştur [42]. Rady (2011)'nin çalışmasında, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkilerine NaCl ve/veya CdCl₂ ile birlikte 24-epiBL uygulaması yapılmıştır. Sadece NaCl ve/veya CdCl₂ uygulamaları ile bitki gelişiminde, pigment içeriğinde, meyve veriminde önemli oranda azalma tespit edilmiştir. Fakat 24-epiBL uygulaması ile oluşturulan toksik etki detoksifiye edilmiş ve araştırılan parametrelerde iyileşme gözlenmiştir [43]. Hasan ve ark. (2011) tarafından 2 farklı domates kültürüne (K25

ve Sarvodya) kadmiyumun farklı konsantrasyonları (0, 3, 6, 9, 12 mg/kg) ile birlikte 10^{-8} M 28-homoBL/24-epiBL uygulaması yapılmıştır. Sadece kadmiyum uygulamasında, konsantrasyona bağlı olarak fotosentetik parametreler, yaprak su potansiyeli, bazı enzim aktiviteleri (nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz) her iki kültürde da önemli oranda azalmıştır. Fakat kadmiyum ile birlikte homoBL/epiBL uygulamaları antioksidan enzim aktivitelerinde ve prolin içeriğinde artışa neden olmuştur. Ekzojen yapılan brassinosteroid uygulamalarının fotosentetik aktivitenin yanı sıra antioksidan savunma sistemini de her iki kültürde arttırması, brassinosteroidlerin metal stresinin bu parametreler üzerindeki etkisini geçersiz kıldığı sonucuna varmalarını sağlamıştır [44]. Yusuf ve ark. (2011), 6 günlük maş fasulyesi (*Vigna radiata*) fidelerine 7 gün boyunca 0.5, 1.0 ve 2.0 mM bor uygulamışlardır. Daha sonra bitkilere sprey yöntemi ile 10^{-8} M 28-homoBL uygulaması yapılmış, 21. günün sonunda büyüme, yaprakta gaz değişimi ve biyokimyasal parametreleri araştırılmıştır. Sadece bor uygulaması büyümeyi, su içeriğini, fotosentetik aktiviteyi, nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz aktivitelerini doza bağlı olarak azaltırken; lipid peroksidasyonu, elektrolit sızıntısı, H_2O_2 kadar prolin birikiminin ve farklı antioksidan enzim aktivitelerinin borun yüksek konsantrasyonlarında bitkilerin yapraklarında net bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Fakat bor stresine maruz bırakılan bitkilerde 28-homoBL uygulaması ile birlikte büyüme, su içeriği, fotosentetik aktivite ayrıca katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz ve prolin içeriğinin arttığı bulunmuştur. Araştırmacılar, brassinosteroidlerin sahip olduğu anti-stres etki sayesinde borun oluşturduğu iyonik stresin etkilerini azalttığı sonucuna varmışlardır [45].

10. SONUÇ

BR'ler, steroid hormonlar olup bitki büyümesini ve gelişmesini düzenlemektedir. Brassinolid en aktif BR olup, biyosentez yolağında son noktadır. Brassinolidin genç, gelişen gövde dokularına ekzojen olarak uygulanması sonucu, hücre uzamasını ve hücre bölünmesini kontrol ederek büyümeyi sağladığı ve büyüme üzerinde de en önemli etkisinin hücre genişlemesi üzerine olduğu tespit edilmiştir. BR'ler, ekzojen olarak nanomolar ya da mikromolar konsantrasyonlarda uygulamalar sonucu kompleks yollardan oksinler, sitokininler ve gibberelinlerle etkileşim içindedir. Ekzojen BR uygulamaları ile abiyotik strese karşı bitkilerin toleransının arttırıldığı ve verimin arttırıldığı ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar ile BR'lerin uyardığı birçok gen tanımlanmış ve tanımlanan bu genlerin çoğunun işlevi bitki büyümesi ve gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. BR'lerin etkilerinin moleküler temelini anlaşılmamasında başarı kaydedilmesine rağmen, BR sinyalinin hücre yüzeyinden sitoplazmaya nasıl geçtiği ve yüzlerce genin ekspresyonunu nasıl regüle ettiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat devam eden araştırmalar sayesinde yakın gelecekte birçok sorunun cevabının verileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1] Rao, S.S.R., Vardhini, B.V., Sujatha, E., Anuradha, S., "Brassinosteroids- a new class of phytohormones", Current Science, 82 (10): 1239-1245 (2002).
- [2] Savaldi-Goldstein, S., and Chory, J., "Brassinosteroids", Editors: Taiz, L., and Zeiger, E., "Plant Physiology, Fourth Edition", ISBN: 0878938567, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 617-634 (2006).
- [3] Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippenanderson, J.L., Cook, J.K., "Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen", Nature, 281: 216-217 (1979).

- [4] Bajguz, A., “Metabolism of brassinosteroids in plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 95-107 (2007).
- [5] Sakurai, A., “Brassinosteroid biosynthesis”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (5): 351-361 (1999).
- [6] Yokota, T., “The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids”, *Trends in Plant Science*, 2 (4): 137-143 (1997).
- [7] Ankudo F.T., “Immunomodulation of brassinosteroid function in seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.)”, Akademik Derece Tezi, Martin-Luther Üniversitesi, Matematik-Doğa Bilimleri-Mühendislik Bilimleri, Halle-Wittenberg, Almanya, 1-71 (2004).
- [8] Zullo, M.A.T., and Adam, G., “Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications”, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14 (3): 143-181 (2002).
- [9] Clouse, S.D., “Recent advances in brassinosteroid research: from molecular mechanisms to practical applications”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 273-275 (2003).
- [10] Divi, U.D., and Krishna, P., “Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance”, *New Biotechnology*, 26: 131-136 (2009).
- [11] Asami, T., Nakano, T., Nakashita, H., Sekimata, K., Shimada, Y., Yoshida, S., “The influence of chemical genetics of plant science: Shedding light on functions and mechanism of action of brassinosteroids using biosynthesis inhibitors”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 336-349 (2003).
- [12] Hayat, S., Ali, B., Hasan, A., Ahmad A., “Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*”, *Environmental and Experimental Botany*, 60: 33-41 (2007).
- [13] Divi, U.D., Rahman, T., Krishna, P., “Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways”, *BMC Plant Biology*, 10: 151-165 (2010).
- [14] Clouse, S.D., “Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development”, *The Plant Journal*, 10 (1): 1-8 (1996).
- [15] Dhaubhadel, S., Chaudhary S., Dobinson K.F., Krishna P., “Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings”, *Plant Molecular Biology*, 40: 333-342, (1999).
- [16] Krishna, P., “Brassinosteroid-mediated stress responses”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 289-297 (2003).
- [17] Clouse, S.D., and Sasse, J.M., “Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427-451 (1998).
- [18] Sasse, J.M., “Physiological actions of brassinosteroids: an update”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 276–288 (2003).
- [19] Amzalling, G.N., and Vaisman, J., “Influence of brassinosteroids on initiation of the root gravitropic response in *Pisum sativum* seedlings”, *Biologia Plantarum*, 50 (2): 283-286 (2006).
- [20] Ashraf, M., Akram, N.A., Arteca, R.N., Foolad, M.R., “The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29: 162-190 (2010).
- [21] Nemhauser, J.L., and Chory, J., “BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action”, *Journal of Experimental Botany*, 55 (395): 265-270 (2004).
- [22] Bajguz, A., and Hayat, S., “Effect of brassinosteroids on plant responses to environmental stresses”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1-8 (2009).
- [23] Chung, Y., Maharjan, P.M., Lee, O., Fujioka, S., Jang, S., Kim, B., Takatsuto, S., Tsujimoto, M., Kim, H., Cho, S., Park, T., Cho, H., Hwang, I., Choe, S., “Auxin stimulates *DWARF4* expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*”, *The Plant Journal*, 66: 564-578 (2011).
- [24] Clouse, S.D., Langford, M., McMorris, T.C., “A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development”, *Plant Physiology*, 111: 671-678 (1996).
- [25] Azpiroz, R., Yewen, W., LoCascio, C.J., Feldman, K.A., “An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation”, *The Plant Cell*, 10: 219-230 (1998).
- [26] Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D., Barbier-Brygoo, H., “The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially

- rescued by exogenous brassinosteroid”, *The Plant Journal*, 18 (3): 303-314 (1999).
- [27] Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., Yoshida, S., “Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, 130: 1319-1334 (2002).
- [28] Müssig, C., Fischer, S., Altman, T., “Brassinosteroid-regulated gene expression”, *Plant Physiology*, 129: 1241-1251 (2002).
- [29] Belkadir, Y., Chory, J., “Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface”, *Science*, 314: 1410-1411 (2006).
- [30] Liu, T., Zhang, J., Wang, M., Li, G., Qu, L., Wang, G., “Expression and functional analysis of *ZmDWF4*, an ortholog of *Arabidopsis DWF4* from maize (*Zea mays* L.)”, *Plant Cell Reports*, 26: 2091-2099 (2007).
- [31] Deng, Z., Zhang, X., Tang, W., Osés-Prietos, J.A., Suzuki, N., Gendron, J.M., Chen, H., Guan, S., Chalkley, N., Peterman, T.K., Burlingame, A.L., Wang, Z., “A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6 (12): 2058-2071 (2007).
- [32] Clouse, S.D., “The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in *Arabidopsis*”, *PNAS*, 105 (21): 7345-7346 (2008).
- [33] Shahbaz, M., Ashraf, M., “Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions”, *Pakistan Journal of Botany*, 39 (2): 513-522 (2007).
- [34] Behnamnia, M., Kalantari, K. M., Ziaie, J., “The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress”, *Turkish Journal of Botany*, 33: 417-428 (2009).
- [35] Fariduddin, Q., Yusuf, M., Chalkoo, S., Hayat, S., Ahmad, A., “28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress”, *Photosynthetica*, 49 (1): 55-64 (2011).
- [36] Kagale, S., Divi, U.K., Krochko, J.E., Keller, W.A., Krishna, P., “Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses”, *Planta*, 225: 353-364 (2007).
- [37] Xia, X-J., Wang, Y-J., Zhou, Y-H., Tao, Y., Mao, W-H., Shi, K., Asami, T., Chen, Z., Yu, J-Q., “Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber”, *Plant Physiology*, 150: 801-814 (2009).
- [38] Vardhini, B.V., and Rao, S.S.R., “Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum”, *Plant Growth Regulation*, 41: 25-31 (2003).
- [39] Bajguz, A., “Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 797-80 (2000).
- [40] Ali, B., Hasan, S.A., Hayat, S., Hayat, Q., Yadav, S., Fariduddin, Q., Ahmad, A., “A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek)”, *Environmental and Experimental Botany*, 62: 153-159 (2008).
- [41] Anuradha, S., and Rao, S.S.R., “Effect of 24-Epibrassinolide on the photosynthetic activity of radish plants under cadmium stress”, *Photosynthetica*, 47 (2): 317-320 (2009).
- [42] Bajguz, A., “An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress”, *Environmental and Experimental Botany*, 68: 175-179 (2010).
- [43] Rady, M.M., “Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress”, *Scientia Horticulturae*, 129: 232-237 (2011).
- [44] Hasan, S.A., Hayat, S., Ahmad, A., “Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars”, *Chemosphere*, 84: 1446-1451 (2011).
- [45] Yusuf, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A., “28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants”, *Chemosphere*, 85 (10): 1574-84 (2011).

Geliş Tarihi: 16.04.2012

Kabul Tarihi: 18.06.2012