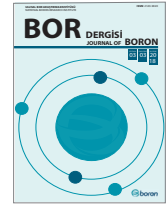




# BOR DERGİSİ

## JOURNAL OF BORON

<http://dergipark.gov.tr/boron>



## Bor stresi altında *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh'da süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi

Yonca Surgun-Acar<sup>1\*</sup>, Rabia İşkil<sup>2</sup>, Yavuz Erden<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 17000, Çanakkale, Türkiye, ORCID ID [orcid.org/0000-0002-8684-329X](http://orcid.org/0000-0002-8684-329X)

<sup>2</sup>Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 7410, Bartın, Türkiye, ORCID ID [orcid.org/0000-0002-1920-7867](http://orcid.org/0000-0002-1920-7867)

<sup>3</sup>Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 74100, Bartın, Türkiye, ORCID ID [orcid.org/0000-0002-2807-6096](http://orcid.org/0000-0002-2807-6096)

### MAKALE BİLGİSİ

#### Makale geçmişi:

İlk gönderi 25 Mart 2018  
Revize gönderi 22 Mayıs 2018  
Kabul 24 Temmuz 2018  
Online 30 Kasım 2018

#### Araştırma Makalesi

DOI: [10.30728/boron.409349](https://doi.org/10.30728/boron.409349)

#### Anahtar kelimeler:

*Arabidopsis thaliana* L.,  
Bor eksikliği,  
Bor toksisitesi,  
Gen ekspresyonu,  
Süperoksit dismutaz

### ÖZET

Boron topraktaki eksikliği veya yüksek konsantrasyonda bulunması önemli bir abiyotik stres faktörü olabilmektedir. *Arabidopsis thaliana*'da *Cu/ZnSOD* (*CSD1*, *CDS2*, *CSD3*), *FeSOD* (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*) ve *MnSOD* (*MSD1*) genlerinden oluşan 7 farklı süperoksit dismutaz (SOD) izoformu tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada amaç bor (B) eksikliği veya toksisite koşulları altında *Arabidopsis thaliana* (L.)'nın yaprak ve kök dokusunda antioksidan sistemin anahtar enzimi olan süperoksit dismutazı kodlayan genlerin ifade düzeylerini Real-Time PCR ile belirlenmesidir. *Arabidopsis* bitkileri altı hafta süreyle hidroponik kültür sisteminde yetiştirilmiş ve 48 saat borik asit (BA) içermeyen (0 µM) veya yüksek konsantrasyonda BA (3000 µM) içeren besin ortamlarında inkübe edilmiştir. B stres uygulamaları *CSD1* ve *FSD3* genlerinin ekspresyonunu yaprak dokusunda artırmıştır. *MSD1* geninin mRNA seviyesi yaprak dokusunda B toksisite uygulaması sonucu artarken, kök dokusunda B eksikliğinde artış göstermiştir. B eksikliği ve toksisitesi uygulamaları *CSD2*, *FSD1* ve *FSD2* genlerinin ekspresyon düzeyini dokuya bağlı olarak değiştirmiştir. Sonuç olarak, B stresinin kök ve yapraklarda farklı hücresel kompartimanlarda antioksidatif savunmayı tetiklediği ortaya konulmuştur.

## Determination of expression profiles of superoxide dismutase genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh under boron stress

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 March 2018  
Revised form 22 May 2018  
Accepted 24 July 2018  
Online 30 November 2018

#### Research Article

DOI: [10.30728/boron.409349](https://doi.org/10.30728/boron.409349)

#### Keywords:

*Arabidopsis thaliana* L.,  
Boron deficiency,  
Boron toxicity,  
Gene expression,  
Superoxide dismutase.

### ABSTRACT

Deficiency or excess of boron in the soil may be an important abiotic stress factor. Seven different superoxide dismutase (SOD) isoforms including *Cu/ZnSOD* (*CSD1*, *CDS2*, *CSD3*), *FeSOD* (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*), and *MnSOD* (*MSD1*) genes have been identified in *Arabidopsis thaliana*. The aim of this study is to determine the expression levels of the genes encoding superoxide dismutase, which is the key enzyme of the antioxidant system, in leaf and root tissues of *Arabidopsis thaliana* (L.) under boron (B) deficiency or toxicity conditions using Real-Time PCR. *Arabidopsis* plants were grown in hydroponic culture system for six weeks and incubated for 48 hours in mediums excluding boric acid (BA) (0 µM) or including high concentration of BA (3000 µM). B stress treatments increased the expression levels of the *CSD1* and *FSD3* genes in leaf tissue. mRNA level of *MSD1* gene is increased in result of B toxicity application in leaf tissue, while B deficiency application increased the mRNA level in root tissue. B deficiency and toxicity treatments altered the expression levels of the *CSD2*, *FSD1*, and *FSD2* genes depending on the tissue. In conclusion, it has been revealed that B stress triggers antioxidative defense mechanisms in different cellular compartments in roots and leaves.

### 1. Giriş (Introduction)

Boron toprakta eksikliği veya yüksek konsantrasyonda bulunma durumu bitkilerin gelişimini sınırlandırmakta ve bor (B) stresi dünya genelinde ürün kalitesi ve verimini azaltmaktadır [1-3]. B eksikliği ve toksisitesi arasındaki konsantrasyon aralığı oldukça dardır [4]. B eksikliğinin bitkilerde kök uzaması, indolasetik asit (IAA) oksidaz aktivitesi, şeker translokasyonu, karbonhidrat metabolizması, nükleik asit sentezi ve polen tüpü büyümesi

gibi çok çeşitli süreçlerde farklı etkilere neden olduğu bilinmektedir [5]. B toksisitesi ise bitkilerde kök hücre bölünmesinde azalma, düşük klorofil içeriği ve fotosentetik hız ile birlikte lignin ve suberin seviyelerinin değişimini kapsayan geniş bir fizyolojik yelpazede etki göstermektedir [6,7].

Bor stresinin de dahil olduğu abiyotik stres koşulları altında bütün aerobik organizmalar süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), lipid peroksitler (ROO<sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve

\*Sorumlu yazar: [yoncasurgun@gmail.com](mailto:yoncasurgun@gmail.com)

hidroksil radikali (OH·) gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'ne maruz kalmaktadır [8]. ROS konsantrasyonunun kontrol edilemeyen üretimi bitkiler için zararlı olabilmektedir. ROS, biyomolekülleri inaktifleştirebilme, membran ve fotosentetik pigmentlerin yanı sıra protein, lipid ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin otokatalitik peroksidasyonunu başlatabilmekte ve bu durum membran bütünlüğünün ve bazı fonksiyonel yapıların kaybedilmesi ile sonuçlanmaktadır [9]. Bitkiler ROS'ların hücrel bileşenlere zarar vermesini önlemek amacıyla, süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11), guaiacol peroksidaz (POD EC 1.11.1.7), glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2), katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), dehidroaskorbat redüktaz ve monodehidroaskorbat redüktaz gibi çeşitli enzimatik ve askorbik asit (ASA), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve prolin sentezi gibi enzimatik olmayan birçok detoksifikasyon mekanizması geliştirmişlerdir [10,11].

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda B eksikliği ve toksitesinin farklı bitkilerde oksidatif strese neden olduğu rapor edilmiştir [12,13]. Yusuf ve ark., *Vigna radiata* bitkisinde B konsantrasyonunda artışa bağlı olarak kök ve gövde yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve uzunluğu yanı sıra yaprak alanı gibi büyüme parametrelerinde azalma tespit ederken, SOD, CAT ve GR enzim aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır [14]. *Morus alba*'da yapılan bir çalışmada ise B eksikliğin bitki yüksekliği, yaprak uzama alanı ve kuru madde veriminde azalmaya neden olduğu, bununla birlikte lipid peroksidasyonu, SOD, CAT, APX ve POD aktivitelerini arttırdığı belirtilmiştir [15]. Fakat şu ana kadar yapılan çok az çalışmada antioksidan enzimleri kodlayan gen ya da genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada amaç B eksikliği veya toksite koşulları altında yaprak ve kök dokusunda antioksidan sistemin anahtar enzimi olan süperoksit dismutazı kodlayan genlerin (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*, *FSD1*, *FSD2*, *FSD3* ve *MSD1*) ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR ile belirlenmesidir.

## 2. Malzemeler ve yöntemler (Materials and methods)

### 2.1. Bitki materyali ve uygulamalar (Plant material and treatments)

Çalışmada *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Columbia (*Col 0*) tohumları materyal olarak kullanılmıştır. *A. thaliana* bitkileri hidroponik ortamda altı hafta boyunca kontrol besin ortamında [16] (150 µM borik asit içermektedir) yetiştirilmiştir. Altı haftanın sonunda, bitkiler 0 veya 3000 µM borik asit (BA) [17] içeren besin ortamlarına aktarılmış ve 48 saat boyunca bor stresine maruz bırakılmıştır. Her uygulama için üç hidroponik tank kullanılmış olup, her tankta 20 bitki yetiştirilmiştir. Uygulamalara ait rozet yaprak ve kök örnekleri alınarak sıvı nitrojen içinde dondurulmuş ve RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma boyunca tüm bitkiler 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 22±2 °C, 16 saat gündüz/8 saat gece fotoperiyodik koşullarda inkübe edilmiştir.

### 2.2. RNA izolasyonu (RNA isolation)

Rozet yaprak ve kök örneklerinden RNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin miktarları ve saflıkları Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. İzole edilen RNA'ların bütünlüğü ve kalitesi yatay jel elektroforezi kullanılarak tespit edilmiştir.

### 2.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi (Complementary DNA (cDNA) synthesis)

İlk aşamada, RNA örneklerinden DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla DNazI (Thermo Scientific, ABD) uygulaması yapılmıştır. Daha sonra, tüm örneklerden 1µg RNA kullanılarak RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ABD) ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler 1/10 oranında seyreltilmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 2.4. Real-Time PCR (RT-PCR) reaksiyonu (Real-Time PCR (RT-PCR) reaction)

Tüm Real Time-PCR (RT-PCR) reaksiyonları BioRad CFX Connect™ Real-Time PCR cihazında (BioRad, ABD) gerçekleştirilmiştir. *A. thaliana*'da tanımlanan süperoksit dismutaz (SOD) genlerine ait primerlerin sekansları Çizelge 1'de verilmiştir. RT-PCR reaksiyonu 0,375 µl forward primer (10 pmol), 0,375 µl revers primer (10 pmol), 5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı (Thermo Scientific, ABD), 3 µl cDNA (1/10 seyreltilmiş cDNA) ve 1,25 µl ddH<sub>2</sub>O içermektedir. Optimize edilen PCR koşulları ise 94 °C'de 3 dak. (ön denatürasyon), 35 döngü 94 °C'de 30 s (denatürasyon), 54,5 °C (*CSD2*, *FSD1*, *FSD2*) – 56 °C (*Aktin2*, *CSD1*, *CSD3*, *FSD3*, *MSD1*) 30 san. (bağlanma) ve 72 °C'de 45 s (uzama)'dir. Her RT-PCR reaksiyonunda *Aktin2* geni internal kontrol olarak tekrar edilmiştir.

### 2.5. Data değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz (Data evaluation and statistical analysis)

Ekspresyon seviyesi araştırılan hedef genlerin mRNA düzeylerinin nisbi değişimleri 2<sup>-ΔΔCq</sup> formülü kullanılarak hesaplanmıştır [18]. Her gen için hesaplanan bu değer uygulama örneklerinin kontrol örneklerine göre mRNA düzeyini ifade etmektedir. İnternal kontrol olan *Aktin2* geni kullanılarak diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde normalizasyon yapılmıştır. RT-PCR her uygulama grubuna ait 3 bağımsız tekerrürde 3 kere tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analizlerde SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) istatistik yazılım paketi kullanılmıştır. Gen ekspresyon değerleri varyans analizine tabi tutulmuş ve her bir gen bakımından kontrol ile uygulama grupları arasındaki farklılık Dunnet testi kullanılarak P < 0,05 düzeyinde değerlendirilmiştir. Grafiklerin çiziminde Sigma Plot 12.0 (Systat Software, ABD) programı

**Çizelge 1.** *A. thaliana*'da süperoksit dismutaz genlerinin primer sekansları. (The primer sequences of superoxide dismutase genes in *A. thaliana*).

Gen lokus numarası	Gen ismi	5' - 3'	Genin tanımı
At1g08830	<i>CSD1</i>	F- AAGTAACAATGGCGAAAGGAG R- GATGTTTCCTAGATCACCAG	Cu/Zn süperoksit dismutaz1
At2g28190	<i>CSD2</i>	F- TCGTATCACTGGTCTCACTC R- ACTATTGTTGTTTCTGCCAC	Cu/Zn süperoksit dismutaz2
At5g18100	<i>CSD3</i>	F- GGGAAGATCTCAGGACTCTC R- TCCTGCAAGAATGTTACCCA	Cu/Zn süperoksit dismutaz3
At4g25100	<i>FSD1</i>	F- GTGGACAACCTCAAGAAACAG R- CAAGAAGCTCTCCTGATGGT	Fe süperoksit dismutaz1
At5g51100	<i>FSD2</i>	F- TTGTTATAGTGAAGACGCC R- ACCTTGTGCTTACAGTTTCC	Fe süperoksit dismutaz2
At5g23310	<i>FSD3</i>	F- AACAGTGGGAGGAACATGAG R- AGACCGTAGTAAGCTTCAACC	Fe süperoksit dismutaz3
At3g10920	<i>MSD1</i>	F- GAAGAAGCTAGTTGTTGACAC R- CCTCGCTTGCATATTTCCAG	Mn süperoksit dismutaz1
At4g02330	<i>Aktin2</i>	F- TGCCAATCTACGAGGGTTTC R- TTCTCGATGGAAGAGCTGGT	Internal kontrol

kullanılmış olup, sütunlarda ortalama değerler ile birlikte standart hata (SE) değerleri gösterilmiştir.

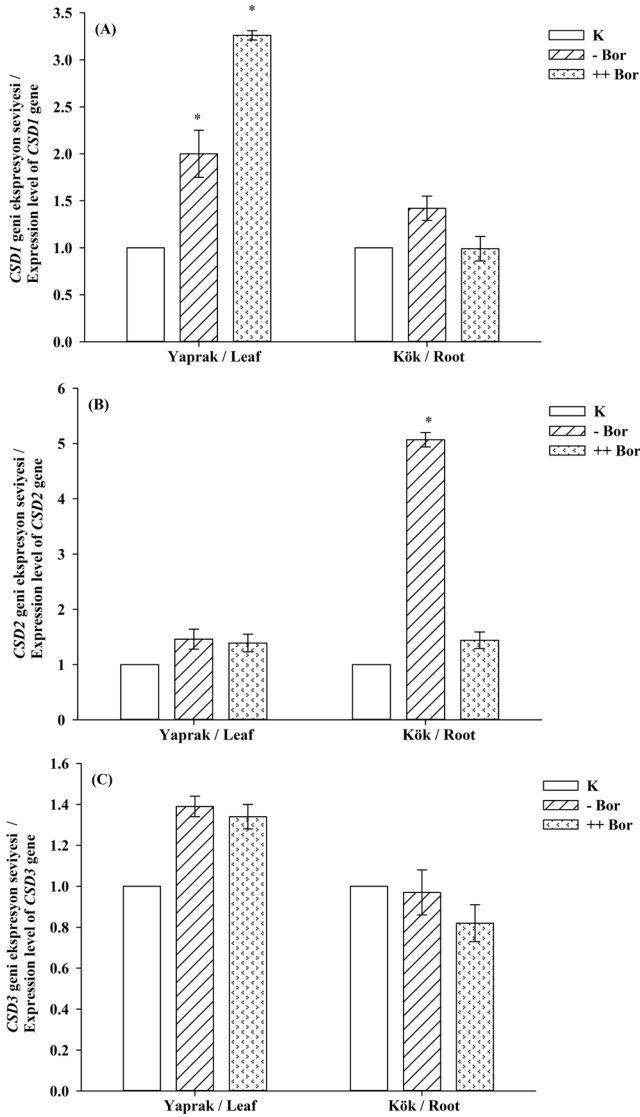
### 3. Sonuç ve tartışma (Results and discussion)

Bitkiler yaşamları boyunca büyüme ve üretkenliklerini etkileyen birçok biyotik ve abiyotik stresle karşı karşıya kalmaktadır. ROS konsantrasyonlarının antioksidan sistem ile sıkı kontrolü bitki hücrelerinde oksidatif hasarın üstesinden gelmek için kritiktir [8]. Bu sistem, farklı tip ROS'ları etkisizleştirerek hücrel redoks homeostasisini korumak için koordinasyon içinde çalışmaktadır [19]. Birçok çevresel stres bitki dokularında süperoksit radikali ( $O_2^-$ )nin üretiminin artmasına yol açmaktadır. Bitkilerin ROS'lara karşı ilk savunma hattı olan SOD bir grup multimerik metaloenzimden oluşmakta ve farklı hücrel kompartımanlarda  $O_2^-$ 'in  $H_2O_2$ 'ye indirgenmesini sağlamaktadır [20, 21]. Bitkilerde antioksidan enzimlerin çeşitli izoformları tanımlanmıştır. SOD'lar aktif bölgelerindeki metal prostetik gruba (Cu/Zn, Fe, Mn) ve subselüler lokalizasyona göre üç sınıfa ayrılmıştır [19]. İzoform değişikliklerinin analizleri, bitkilerde antioksidan yanıtlarla ilgili önemli bir bilgi kaynağı olmasına rağmen, antioksidan enzimlerin izoformları üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu kapsamda doku-spesifik karşılaştırmalı çalışmalar ayrıca önem taşımaktadır. Mevcut çalışmada bor eksikliği ve toksisitesi altında SOD enzimini kodlayan izoformların (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*, *FSD1*, *FSD2*, *FSD3* ve *MSD1*) ekspresyon seviyesi doku-spesifik olarak belirlenmiştir.

*Arabidopsis thaliana*'da Cu/ZnSOD (*CSD1*, *CSD2*, *CSD3*), FeSOD (*FSD1*, *FSD2*, *FSD3*) ve MnSOD (*MSD1*) genlerinden oluşan 7 farklı SOD izoformu tanımlanmıştır [22]. Tipik olarak MnSOD izoenziminin mitokondrilerde, FeSOD izoenzimlerinin plastidlerde ve Cu/ZnSOD izoenzimlerinin plastid veya sitosolde lokalize olduğu belirtilmektedir [20]. Farklı stres koşulları çeşitli subselüler kompartımanlarda farklı bir oksidatif strese yol açmaktadır ve hücre içinde bu

kompartımanların korunması için SOD izoform(larını) kodlayan SOD genlerinin ekspresyonu gerekmektedir [23]. Yapılan çalışmada *CSD1* geninin ekspresyonu yaprak ve kök dokularında farklı ekspresyon profilleri göstermiştir (Şekil 1A). Bor eksikliği *A. thaliana* bitkilerinin yapraklarında *CSD1* geninin ekspresyonunu 2 kat, bor toksisitesi ise 3,26 kat arttırmıştır. Kök dokusunda ise bor stresi *CSD1* geninin ekspresyonunu değiştirmemiştir (Çizelge 2). Sharma ve Davis ozon uygulamasına maruz bırakılan *A. thaliana*'nın fidelinin yaprak dokusunda RNA blot analizleri sonucu stres ile ilgili genlerin yanı sıra *CSD1* geninin mRNA seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir [24]. Kliebenstein ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı stresler altında SOD izoformlarının ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve rozet yapraklarda *CSD1* geninin ekspresyonunun ozon, UV-B ve farklı ışık uygulamaları sonucu artış gösterdiği ortaya koyulmuştur [22]. Bizim çalışmamızda benzer şekilde *CSD1* geninin ekspresyonunun artması bu genin genel bir stres tepki enzimi olabileceğini fikrini vermektedir. Çalışmanın diğer bir bulgusu ise kök dokusunda bor eksikliği koşulları altında *CSD2* geninin ekspresyonunun 5 kat artmasıdır (Şekil 1B, Çizelge 2). Arsenik stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde mikroarray analizleri sonucu *CSD1* ve *CSD2* genlerinin ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir [25]. Ayrıca benzer sonuçlar farklı çalışmalardan da elde edilmiştir [26]. 48 saat boyunca yapılan bor stres uygulamaları yaprak ve kök dokusunda *CSD3* geninin ekspresyonunu değiştirmemiştir (Şekil 1C). Bu sonuca göre *CSD3* geninin bor stresine toleransa aktif olarak katılmadığı öngörülmektedir.

Çalışmadan elde edilen diğer bir bulgu, *FSD1* geninin ifade düzeyinin doku spesifik ekspresyon profili göstermesidir. Yaprak dokusunda *FSD1* geninin ekspresyonu bor içermeyen veya yüksek konsantrasyonda bor içeren ortamlarda benzer oranlarda (sırasıyla 2,10 ve 2,42 kat) artış göstermiştir (Çizelge 2). Bu durum stresin hücrenin farklı lokasyonlarında oluşturduğu



**Şekil 1.** Bor stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde *Cu/Zn süperoksit dismutaz* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (- Bor: 0  $\mu$ M BA, ++ Bor: 3000  $\mu$ M BA). (A) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *CSD1* geninin ekspresyon düzeyi, (B) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *CSD2* geninin ekspresyon düzeyi ve (C) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *CSD3* geninin ekspresyon düzeyi. Kontrol ile uygulama grupları arasındaki farklar Dunnet testi kullanılarak  $P < 0,05$  düzeyinde belirlenmiş ve “\*\*” ile gösterilmiştir ( $\pm$  standart hata değerleridir). (Expression level graphics of *Cu/Zn superoxide dismutase* genes in *A. thaliana* plants exposed to B stress (- Bor: 0  $\mu$ M BA, ++ Bor: 3000  $\mu$ M BA). (A) Expression level of *CSD1* gene in rosette leaves and roots, (B) Expression level of *CSD2* gene in rosette leaves and roots, and (C) Expression level of *CSD3* gene in rosette leaves and roots. Differences between control and treated groups determined using Dunnet test at  $P < 0,05$  level and showed with “\*\*” ( $\pm$  standard error values)).

serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında *FSD1* geninin rolü olduğunu göstermektedir. Sharma ve ark. çeltiğe yüksek konsantrasyonda tuz uygulaması yaptıkları çalışmada *FeSOD* geninin mRNA seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir [27]. Farklı bir çalışmada ise sıcaklık stresi altında kabak türlerinde antioksidan enzim aktivitesi ile birlikte antioksidan genlerin ekspresyonları araştırılmış ve çalışmanın bulguları stres koşulları altında *FeSOD* geninin transkript seviyesinin

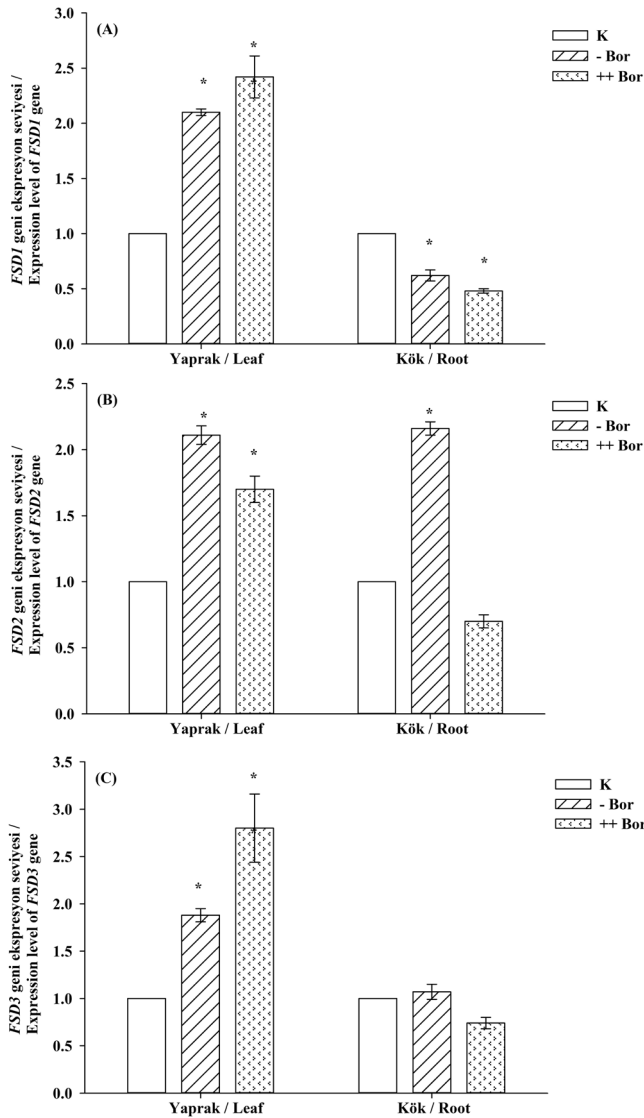
arttığı ortaya koymuştur [28]. Bununla birlikte kök dokusunda *FSD1* geninin ekspresyonu her iki bor stres uygulaması sonucu azalmıştır (Şekil 2A). Arsenik uygulamasına transkripsiyonel cevapların araştırıldığı bir çalışmada mevcut çalışma ile uyumlu sonuçlar alınmış ve *FSD1* geninin transkript seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir [25]. Tran ve ark. bazı stres koşullarının *NAC81* gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu baskıladığını ve bu durumda *FSD1* genini de kapsayan bazı genlerin mRNA seviyesinin azaldığını belirtmiştir [29].

*FSD2* geninin ekspresyonu yaprak dokusunda bor eksikliği ve toksisitesinde sırasıyla 2,11 ve 1,70 oranında artış gösterirken, kök dokusunda ise sadece bor eksikliğinde artış tespit edilmiştir (Şekil 2B, Çizelge 2). *FSD3* genin ekspresyon profili ise *FSD1* ve *FSD2* genlerinin ekspresyon profilinden farklılık göstermiştir. Yaprak dokusunda her iki bor stresi de *FSD3* geninin mRNA seviyesini arttırır iken, kökte ekspresyonu değiştirmemiştir (Şekil 3B). Remans ve ark. tarafından yapılan çalışmada *A. thaliana* bitkileri artan konsantrasyonlarda çinko (Zn) uygulamasına maruz bırakılmış ve bazı antioksidan sistem genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir [30]. Araştırmacılar, *FSD2* ve *FSD3* genlerinin ekspresyonlarının Zn uygulamaları sonucu kökte değişmez iken yaprak dokusunda azaldığını ortaya koymuşlardır [30]. *MSD1* geninin mRNA seviyesi yapraklarda yüksek konsantrasyonda bor uygulaması sonucu artarken, kökte ise bor eksikliğinde artış tespit edilmiştir. Smeets ve ark. Cd stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* bitkilerinde kök dokusunda *MSD1* geninin ekspresyonu arttığı fakat yaprakta değişmediğini ortaya koymuşlardır [31]. Vanhoudt ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 100  $\mu$ M uranyum uygulamasına maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde *MSD1* ekspresyonunun yaprak ve kökte değişiklik göstermediği ortaya koyulmuştur [32].

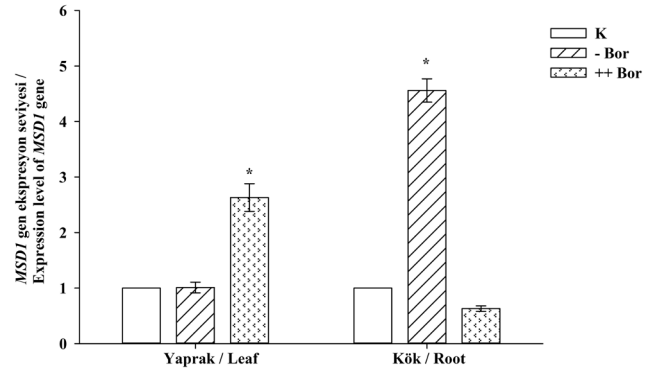
Mevcut çalışmada genel olarak SOD'un farklı izoformlarının ekspresyon seviyesinin yaprak ve kökte farklı olduğu tespit edilmiştir. Apel ve Hirt SOD izoform aktivitesinde kök ve gövdede tespit edilen farklılıkların doku farklılığından kaynaklanabileceği belirtilmişlerdir [33]. Bununla birlikte çalışmanın sonuçları diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer sonuçların yanı sıra farklı sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir. Sharma ve ark. SOD izoformlarının farklı hücresel kompartımanlarda lokalize olmasından dolayı farklı streslere farklı yanıtlar oluşturduğunu belirtmiştir [27]. *Nicotiana plumbaginifolia*, domates ve mısırdaki yapılan çalışmalar SOD genlerinin bitki gelişim dönemlerinde ve stres koşulları altında farklı regüle olduğunu göstermektedir [34]. Kliebenstein ve ark. ozon fumigasyonu ve UV-B stres uygulamalarının SOD izoformlarını kodlayan mRNA'ları farklı etkilediğini ortaya koymuştur [22]. Sonuç olarak bu genlerin bağımsız olarak regüle olduklarını ve farklı oksidatif streslere karşı bitkileri korumada rol aldıkları belirtilmiştir. Bununla birlikte SOD enzim aktivitesi, kapsamında birçok izoenzim olması nedeniyle komplike olduğu vurgulanmıştır [22].

**Çizelge 2.** Bor eksikliği (0 µM) veya toksisitesine (3000 µM) 48 saat süreyle maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerine ait rozet yaprak ve kök örneklerinde süperoksit dismutaz genlerinin kontrole göre kat değişimleri. (Fold changes of superoxide dismutase genes compared to control in rosette leaves and root samples of *A. thaliana* plants exposed to boron deficiency (0 µM) and toxicity (3000 µM) for 48 hours).

Gen isimleri	Kontrol	Rozet Yaprak		Kök	
		- BOR	++ BOR	- BOR	++ BOR
<i>CSD1</i>	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,25	3,26 ± 0,05	1,42 ± 0,13	-1,01 ± 0,13
<i>CSD2</i>	1,00 ± 0,00	1,46 ± 0,18	1,39 ± 0,16	5,07 ± 0,13	1,44 ± 0,15
<i>CSD3</i>	1,00 ± 0,00	1,39 ± 0,05	1,34 ± 0,06	-1,03 ± 0,11	-1,21 ± 0,09
<i>FSD1</i>	1,00 ± 0,00	2,10 ± 0,03	2,42 ± 0,19	-1,61 ± 0,05	-2,00 ± 0,02
<i>FSD2</i>	1,00 ± 0,00	2,11 ± 0,07	1,70 ± 0,10	2,16 ± 0,05	-1,42 ± 0,05
<i>FSD3</i>	1,00 ± 0,00	1,88 ± 0,07	2,80 ± 0,36	1,07 ± 0,08	-1,35 ± 0,06
<i>MSD1</i>	1,00 ± 0,00	1,01 ± 0,09	2,64 ± 0,25	4,56 ± 0,21	-1,58 ± 0,05



**Şekil 2.** Bor stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinde *Fe süperoksit dismutaz* genlerinin ekspresyon seviye grafikleri (- Bor: 0 µM BA, ++ Bor: 3000 µM BA). (A) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *FSD1* geninin ifade düzeyi, (B) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *FSD2* geninin ifade düzeyi ve (C) Rozet yaprak ve kök örneklerinde *FSD3* geninin ifade düzeyi. Kontrol ile uygulama grupları arasındaki farklar Dunnet testi kullanılarak P < 0,05 düzeyinde belirlenmiş ve “\*\*” ile gösterilmiştir (± standart hata değerleridir). (Expression level graphics of *Fe superoxide dismutase* genes in *A. thaliana* plants exposed to B stress (- Bor: 0 µM BA, ++ Bor: 3000 µM BA). (A) Expression level of *FSD1* gene in rosette leaves and roots, (B) Expression level of *FSD2* gene in rosette leaves and roots, and (C) Expression level of *FSD3* gene in rosette leaves and roots. Differences between control and treated groups determined using Dunnet test at P < 0,05 level and showed with “\*\*” (± standard error values)).



**Şekil 3.** Bor stresine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin yaprak ve köklerinde *Mn süperoksit dismutaz1* geninin ekspresyon seviye grafiği (- Bor: 0 µM BA, ++ Bor: 3000 µM BA). Kontrol ile uygulama grupları arasındaki farklar Dunnet testi kullanılarak P < 0,05 düzeyinde belirlenmiş ve “\*\*” ile gösterilmiştir (± standart hata değerleridir). (Expression level graphic of *Mn superoxide dismutase1* gene in leaf and root of *A. thaliana* plants exposed to B stress (- Bor: 0 µM BA, ++ Bor: 3000 µM BA). Differences between control and treated groups determined using Dunnet test at P < 0,05 level and showed with “\*\*” (± standard error values)).

#### 4. Sonuçların değerlendirilmesi (Conclusion)

Bor stresi bitkilerde fizyolojik ve moleküler düzeyde olumsuz değişikliklere neden olmaktadır. Bu çalışmada bor eksikliği ve toksisitesinin oluşturduğu oksidatif strese yanıtın daha kapsamlı değerlendirilmesi amacıyla antioksidatif savunmanın anahtar enzimi olan ve farklı hücrel kompartımanlarda lokalize olan SOD izoformları transkripsiyonel düzeyde değerlendirilmiştir. Çalışmanın bulguları bor stresinin kök ve yapraklarda farklı hücrel kompartımanlarda antioksidatif savunmayı tetiklediğini ortaya koymuştur. Antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklerin altındaki gen ekspresyon çalışmaları bitkilerin bor stresine moleküler adaptasyon mekanizması hakkında önemli ve yeni fikirler sağlamaktadır.

#### Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2017-FEN-A-017 nolu proje ile desteklenmiş olup, desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar (References)

- [1] Camacho-Cristobal J. J., Rexach J., Gonzalez-Fontes A., Boron in plants: deficiency and toxicity, J. Integr. Plant Biol., 50 (10), 1247-55, 2008.

- [2] Güneş A., Gezgin S., Kalınbacak K., Özcan H., Çakmak I., Bor elementinin bitkiler için önemi, *Boron*, 2 (3), 168-174, 2017.
- [3] Horuz A., Özcan C., Kireçli topraklarda mısır bitkisine (*Zea mays everta*) uygulanan borun verim ve bor kapsamına etkileri, *Boron*, 2 (1), 37-42, 2017.
- [4] Takano J., Miwa K., Fujiwara T., Boron transport mechanisms: Collaboration of channels and transporters, *Trends Plant Sci.*, 13 (8), 451-7, 2008.
- [5] Goldbach H. E., Wimmer M. A., Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure?, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170 (1), 39-48, 2007.
- [6] Nable R. O., Bañuelos G. S., Paull J. G., Boron toxicity, *Plant Soil*, 193 (1), 181-198, 1997.
- [7] Reid R. *Physiology and Metabolism of Boron in Plants*, Dordrecht, Springer Netherlands, 2007.
- [8] Mittler R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7 (9), 405-10, 2002.
- [9] Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M., Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *J. Bot.*, 2012, 26, 2012.
- [10] Cadenas E., Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79-110, 1989.
- [11] Halliwell B., Gutteridge J. M., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.*, 186, 1-85, 1990.
- [12] Mukhopadhyay M., Ghosh P. D., Mondal T. K., Effect of boron deficiency on photosynthesis and antioxidant responses of young tea plantlets, *Russ. J. Plant Physiol.*, 60 (5), 633-639, 2013.
- [13] Surgun Y., Çöl B., Bürün B., 24-Epibrassinolide ameliorates the effects of boron toxicity on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh by activating an antioxidant system and decreasing boron accumulation, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (3), 71, 2016.
- [14] 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.
- [15] Tewari R. K., Kumar P., Sharma P.N., Morphology and oxidative physiology of boron-deficient mulberry plants, *Tree Physiol.*, 30 (1), 68-77, 2010.
- [16] Fujiwara T., Hirai M. Y., Chino M., Komeda Y., Naito S., Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia, *Plant Physiol.*, 99 (1), 263-8, 1992.
- [17] Kasajima I., Fujiwara T., Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron, *Plant Biotechnol J.*, 24, 355-360, 2007.
- [18] Livak K. J., Schmittgen T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (4), 402-8, 2001.
- [19] Gill S. S., Tuteja N., Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 48 (12), 909-30, 2010.
- [20] Bowler C., Montagu M. V., Inze D., Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43 (1), 83-116, 1992.
- [21] Rubio M. C., Bustos-Sanmamed P., Clemente M. R., Becana M., Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*, *New Phytol.*, 181 (4), 851-9, 2009.
- [22] Kliebenstein D. J., Monde R. A., Last R. L., Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization, *Plant Physiol.*, 118 (2), 637-50, 1998.
- [23] Tsang E. W., Bowler C., Herouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M., Inze D., Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress, *Plant Cell*, 3 (8), 783-92, 1991.
- [24] Sharma Y. K., Davis K. R., Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, 105 (4), 1089-1096, 1994.
- [25] Abercrombie J. M., Halfhill M. D., Ranjan P., Rao M. R., Saxton A. M., Yuan J. S., Stewart C. N., Jr., Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress, *BMC Plant Biol.*, 8, 87, 2008.
- [26] Abdel-Ghany S. E., Pilon M., MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, 283 (23), 15932-45, 2008.
- [27] Sharma I., Ching E., Saini S., Bhardwaj R., Pati P.K., Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1, *Plant Physiol. Biochem.*, 69, 17-26, 2013.
- [28] Ara N., Nakkanong K., Lv W., Yang J., Hu Z., Zhang M., Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species ("*Cucurbita maxima*" and "*Cucurbita moschata*") and their interspecific inbred line "Maxchata", *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (12), 24008-28, 2013.
- [29] Tran L. S., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S.D., Fujita Y., Maruyama K., Fujita M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter, *Plant Cell*, 16 (9), 2481-98, 2004.
- [30] Remans T., Opendakker K., Guisez Y., Carleer R., Schat H., Vangronsveld J., Cuypers A., Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature, *Environ. Exp. Bot.*, 84, 61-71, 2012.
- [31] Smeets K., Ruytinx J., Semane B., Van Bellegheem F., Remans T., Van Sanden S., Vangronsveld J., Cuypers A., Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress, *Environ. Exp. Bot.*, 63 (1), 1-8, 2008.
- [32] Vanhoudt N., Vandenhove H., Smeets K., Remans T., Van Hees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A., Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol. Biochem.*, 46 (11), 987-996, 2008.
- [33] Apel K., Hirt H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-99, 2004.
- [34] Inze D., Montagu M.V., Oxidative stress in plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6(2), 153-158, 1995.