

Mayada Bor Dirençliliği Sağlayan Genlerin Bitki Homologlarının Fonksiyonel Analizi

Proje No: 108T523

Yrd. Doç. Dr. Çağlar Karakaya

Yrd.Doç.Dr. Alper Arslanoğlu

Iřıl Erbařol

Çiđdem Çakıođlu

MART 2011

İZMİR

ÖNSÖZ

Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) yaptığımız ön çalışmalarda, bor transferinden ve borun hücre dışına atılmasından sorumlu bazı genler bulunmuştur. Bu projede, mayada bulduğumuz genlerin bitkilerdeki homologları araştırılmış, bir genin mayada bor toleransı sağladığı gösterilmiştir. Bu gen *Arabidopsis thaliana* bitkisinde aşırı ifadelendirildiğinde, toksik seviyedeki borlu ortamda genin baskılanmasından dolayı dayanıklılık göstermemiştir. Ancak mayada bulduğumuz ATR1 geni, Arabidopsis'de aşırı ifadelendeğinde 6mM bora dayanıklılık göstermiş ve potansiyel olarak bu genin bora dayanıklı bitkiler yapmak için kullanılabileceğini gösterilmiştir.

Bu proje TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından desteklenmiş ve Yrd.Doç. Dr. H.Çağlar Karakaya yürütücülüğünde tamamlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
ABSTRACT	6
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	7
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
2.1. Biyoinformatik Çalışma.....	10
2.2.RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZR.....	10
2.3.Gateway Klonlama İşlemleri	11
2.4. Mayaya Transformasyon İşlemleri.....	13
2.5. Bor Ölçüm İşlemleri.....	14
2.6.Gen ekspresyonu analizleri.....	14
2.7. 2At116 ve ATR1 Geninin Arabidopsis'e Transformasyonu.....	16
2.8.Bitkide ICP-MS ile Bor Ölçümü.....	17
3.BULGULAR.....	18
3.1.2At116 ve ATR1 Geninin Arabidopsis e Transformasyonu.....	25
3.2.ATR1 Geninin T2 Generasyonu Bitkilerde Ekspresyon Analizi.....	27
3.3.T3 Generasyonundaki Bitkilerin Bor Dirençliliği.....	29
4.TARTIŞMA/SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	34
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	37

Şekil Listesi

Şekil 1) a) RNA izolasyon örneği.....	10
Şekil 2. 2at116 geninin kesimi.....	12
Şekil 3. 2At116 geninin p426GPD kesimi.....	13
Şekil 4) RNA'lardan, "Reverse transcriptase" reaksiyonu.....	22
Şekil 5. p426GPD ekspresyon vektöründen klonlandıktan sonra kesilerek çıkarılan gen.....	22
Şekil 6. Bor tolerans testi.....	23
Şekil 7. 2At116 bor tolerans testi.....	23
Şekil 8. Kontrol ve 2At116 geni içeren maya hücrelerindeki bor miktarları.....	24
Şekil 9. 2At116 geninin Arabidopsis bitkisinin yaprak dokusundaki ekspresyon analizi.....	24
Şekil 10. Transformasyonu yapılmış bitkiler.....	25
Şekil 11. Basta herbisid uygulanmamış T1 generasyonu.....	25
Şekil 12. Basta herbisid uygulanmış T1 generasyonu.....	26
Şekil 13. Borik asitin toksisite seviyesini gösteren MS	27
Şekil 14. ATR1 geninin Arabidopsis T2 generasyonu	28
Şekil 15. 2At116 geninin gerçek zamanlı PCR resmi.....	28
Şekil 16. 6mM borlu YT, 2AT ve ATR1 genine sahip bitkilerin büyüme resimleri.....	29
Şekil 17. 6mM borlu YT, ATR1 genine sahip bitkilerin büyüme resimleri.....	30
Şekil 18. Yabani tip ve ATR1 geni içeren bitkilerdeki bor miktarları.....	30

ÖZET

Bor canlılar için gerekli olan bir mineraldir ve biyolojik sistemlere sıvı ortamdan borik asit şeklinde alınır. Bor eksikliği veya fazlalığı hem bitkiler ve hemde hayvanlarda gelişme bozukluğuna sebep verir. Yapılan araştırmalar borun bitkilerde hücre duvarı yapısına katıldığı, pollen tüpünün oluşmasında rol oynadığını, hayvanlarda ise hormonal regülasyon, üreme ve bazı minerallerin barsaklardan emiliminde rol oynadığını göstermiştir.

Türkiye dünyadaki bor rezervlerinin % 60'ına sahip bir ülke konumundadır. Ülke genelinde 3 milyon hektar tarım arazisinde bor fazlalığı görülmektedir. Orta Anadoludaki toprakların %18 bitkiler için toksik seviyede bor içermektedir. Bu gerçek ülkemizde tahıl ürünlerinin yetişmesinde verim kaybına sebep olmaktadır.

Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) yaptığımız ön çalışmalarda, bor transferinden ve borun hücre dışına atılmasından sorumlu bazı genler bulunmuştur. Bu projede, mayada bulduğumuz ATR1 geninin bitkilerdeki homologları araştırılmış ve bir genin (2At116) mayada bor toleransı sağladığı bulunmuştur. Bu gen, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde aşırı ifadelendirildiğinde ise genin baskılanmasından dolayı bitkiyi bora dirençli hale getirmemiştir. Aynı zamanda, ATR1 genide *Arabidopsis*'de aşırı ifadelendirilmiş ve 6mM bora dayanıklı bitkiler elde etmemizi sağlamıştır. ATR1 geninin daha güçlü promotörler kullanılarak daha yüksek seviyedeki bor toleransı sağlayan bitkiler elde edilmesi mümkün olabilir.

Anahtar Kelimeler:

Bor, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* (Maya)

ABSTRACT

Boron is an essential mineral for living systems which can be taken up from liquid media as boric acid. High or low levels of boron lead to growth failure in both animals and plants. Studies showed that boron is incorporated in cell wall structure in plants and plays role in the formation of pollen tube. In animals, boron is involved in hormonal regulation, reproduction and absorption of some minerals through intestines.

Turkey owns 60% of world boron reserves. Three million hectares of agricultural land throughout the country has high boron levels. 18% of mid-Anatolian soil contains toxic levels of boron. This leads to considerable crop production losses.

Recently, we identified several yeast genes responsible for the export of boron across the yeast cell membrane. In this project, we identified and cloned plant homologs of ATR1 gene. One gene (2At116) showed boron tolerance in yeast. When 2At116 gene overexpressed in Arabidopsis, it did not show boron tolerance due to possible gene silencing. ATR1 gene also overexpressed in Arabidopsis and helped plant tolerant to 6mM boron. ATR1 gene could be good candidate to make plant boron tolerant if stronger promoter used.

Keywords:

Boron, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*

Giriş ve Genel Bilgiler

Bor, hem bitkiler hem de hayvanlar için gerekli bir mikro besin maddesidir. Çin ve Avustralya'da borlu topraklar tahıl ürünlerinin yetişmesinde oldukça sorun yaratmaktadır. Türkiye dünyadaki bor rezervlerinin % 60'ına sahip bir ülke konumundadır. Ülke genelinde 3 milyon hektar tarım arazisinde bor fazlalığı görülmektedir. Orta Anadoludaki toprakların %18 bitkiler için toksik seviyede bor içermektedir.

Şu ana kadar ki çalışmalar, bitkilerde bor taşınımı ve toleransı ile ilişkisi olan birçok genin varlığını göstermiştir (Sutton, 2007; Takano 2002), buna rağmen, hayvan hücrelerindeki bor taşınım mekanizması hala bir gizemdir. Uzun yıllarca borun borik asit şeklinde pasif olarak taşındığı teorisi ileri sürüldü isede son fizyolojik çalışmalar borun aktif olarak taşındığı göstermiştir (Dannel ve ark. 2002, Brown 2002, Stangoulis 2001). Takano ve arkadaşları (2002)) tarafından yayınlanan son çalışmada bir bor (transporter) taşıyıcısı olan BOR1 geninin *Arabidopsis thaliana*'dan klonlandığı bildirilmiştir. BOR1 mutasyonuna sahip *A.thaliana* bitkilerinin köklerinde yeterli seviyede bor olduğu halde yapraklarda daha az bor saptanmış, bununda borun ksilem sayesinde yukarı bölgedeki organlara taşınmadığını ve bor taşınma mekanizmasındaki mutasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir. Yapılan positional klonlama sonucu, BOR1 geninin bir hücre zarı proteini kodladığı ve hayvanlardaki bikarbonat taşıyıcısı olan genlerle homoloji gösterdiği açıklanmıştır. Bitkilerde bor, hücre membranında bulunan ramogalakturanon – II için çapraz-bağlayıcı işlevi görmektedir (Kobayashi, 1996; O'Neill, 2001; Iwai, 2002). BOR1 geninin homologları maya, arpa ve insan da dahil olmak üzere birçok organizmada bulunmaktadır (Takano, 2006; Sutton, 2007). Yüksek bor seviyesi, *A. thaliana*'da, kendi taşıyıcısı olan Bor1'in yıkımına sebep olmaktadır (Takano, 2005) ve bu nedenle AtBor1, boron toksisite sorunu olan topraklarda büyüyebilecek genetik modifiye bitkilerin üretiminde kullanılamaz. Buna rağmen, BOR1'in 'paralog'larından birisi olan

BOR4 genini ifade eden transgenik bitkiler, toksik bor seviyelerine karşı tolerans göstermişlerdir (Miwa, 2007). Ayrıca, bir BOR1 'ortoloğu' olan BOT1 geninin çoklu kopyaları, arpada, toksik bor seviyelerine tolerans sağlayabilmiştir (Sutton, 2007).

Saccharomyces cerevisiae maya türü, çoğu bitki bor tolerans genlerinin karakterizasyonunda kullanılmıştır (Sutton, 2007; Takano, 2006; Nozawa, 2006; Takano, 2007;). Maya, yüksek bor konsantrasyonlarında büyüebilmektedir ve yüksek bor-toleranslı bir organizma olarak bilinmektedir. Arabidopsis cDNA kütüphanesi yeast içinde ekspres edilerek 5 cDNA (polyadenylate-binding protein, ribosomal small subunit protein, RNA-binding protein, Myb transcription factors) maya hücrelerini bora tolerans hale getirmiştir. Ancak bu cDNAların bor transporter proteini olmayıp regülasyonla ilişkili oldukları belirtilmiştir. (Nozawa ve ark, 2006). Maya BOR1 geni detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. BOR1 proteini hücre plazma membranında lokalize olmuş (Zhao, 2001) ve hücre membranında borik asit taşıyıcısı olarak iş görerek, hücrenin, bor toksisitesine karşı tolerans göstermesine yardım ettiği gösterilmiştir (Takano, 2007). $\Delta bor1$ mutantları hücre içinde yüksek miktarda bor tutmaktadırlar (Takano, 2002; Nozawa, 2006), BOR1 genini aşırı ifade eden hücreler ise düşük hücre içi bor seviyesine sahiptirler ve bor uygulanmasına direnç göstermektedirler (Nozawa, 2006). Şimdiye kadar bulunmuş olan bor taşınımından sorumlu bitki ve maya genlerinin aşırı ifadelenmesi ile 100 mM bor konsantrasyonuna dayanıklı hücreler elde edilmiştir. Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) yaptığımız ön çalışmalarda, bor transferinden ve borun hücre dışına atılmasından sorumlu bazı genler bulunmuştur. Bu genler mayada aşırı ifadelenildiğinde, normal tolerans seviyesinin 3 katı bor içeren besi yerinde yaşayabildikleri gözlenmiştir.

Amaçlanan bu projede, mayada bulduğumuz genlerin bitkilerdeki homologları araştırılıp, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde aşırı ifadelendirilmeye çalışılarak, toksik seviyedeki bor içeren ortamlara dayanıklılık gösterip göstermeyeceği araştırılmıştır. Diğer bir deyişle toksik seviyede bor taşıyan ortamlarda yetişebilecek bitkileri geliştirmek için kullanılacak maya genlerinin bitki homologlarının, maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve *Arabidopsis* deki fonksiyonel analizleri yapılmıştır.

Mayada bulduğumuz bor taşınımından sorumlu genlerin *Arabidopsis* homologlarının biyoinformatik yöntemlerle araştırması sonucu aşağıdaki 7 gen bölgesi ortaya çıkartılmıştır. At2g29650, At2g38060, At3g46980, At4g00370, At5g20380, At5g44370, At5g65687. Bu gen ürünlerinin yapısı incelendiğinde hepsinde, küçük moleküllerin taşınımından sorumlu yapısal protein bölgelerinin olduğu görülmektedir. *Arabidopsis*'deki bu 7 genin cDNA'ları klonlanarak E.coli ve maya hücrelerinde çoğalabilme özelliğine sahip mekik (shuttle) ekspresyon vektörlerine aktarılmış. Ekspresyon vektöründeki bu cDNA'lar maya hücrelerine transfer edildikten sonra yüksek borlu besiyerlerine ekilerek *Arabidopsis* cDNA'ların borun hücre dışına atılmasına, böylelikle bor dirençliliği sağlayıp sağlamadıkları araştırılmıştır. Literatürde şimdiye kadar bitkilerde bulunan bor taşıyıcıları mayada 100mM bor konsantrasyonuna dirençlilik sağladıkları gösterilmiştir. Yakın zamanda yaptığımız çalışmalarımızda, mayada bulduğumuz bazı genler ise 200mM bor konsantrasyonuna dirençlilik sağlamıştır. Bu maya genlerinin bitki homologlarının bazılarının da bitkilerde aşırı ifadelenmesiyle toksik seviyelerdeki bor konsantrasyonlarına dayanıklılık sağlayabilecekleri bu proje kapsamında çalışılmıştır.

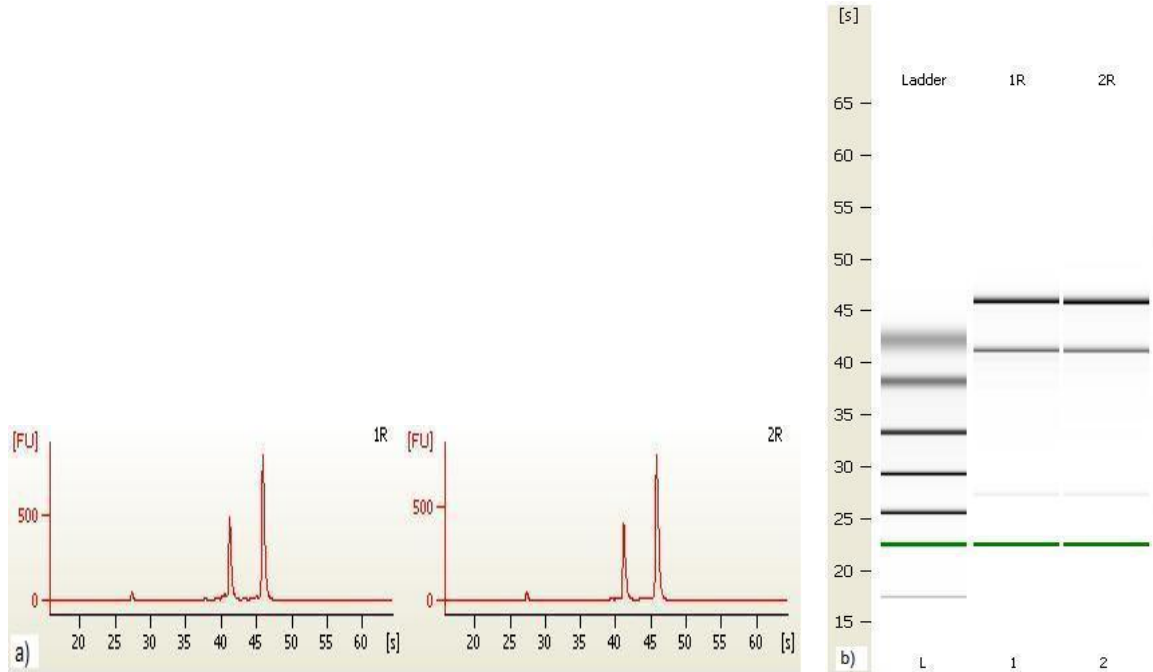
2.Gereç ve Yöntem

2.1.Biyoinformatik Çalışma

Mayada bulunan ATR1 geninin *Arabidopsis* homologlarının biyoinformatik yöntemlerle araştırması sonucu 7 gen ortaya çıkartılmıştır. Homolojisi bulunan bu genlerin (At2g29650, At2g38060, At3g46980, At4g00370, At5g20380, At5g44370, At5g65687) *Arabidopsis*'deki cDNA dizileri, www.arabidopsis.org adresindeki veriler baz alınarak kaydedildi ve bu sekanslara göre primerler dizayn edildi. Primer dizaynının önemli bir noktası primerlerin gen spesifik dizileri yanında *attB* bölgesi adını içeren özel sekansları da içermeleridir. Bu özel sekanslar ileride rekombinasyon reaksiyonuna dayalı klonlama işlemlerinde “BP ve LR clonase” enzimlerinin tanıyacağı sekansları oluşturacaklar ve mekik vektör ve ekspresyon vektörüne aktarmada iş göreceklendir.

2.2.RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZR

Arabidopsis bitkisinden, total RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların kalitesi bölümümüzde bulunan “Bioanalyser” aleti ile kontrol edildi (Şekil 1).



Şekil 1) a) RNA izolasyonu iki örnek olarak yapılmış ve 1R ve 2R olarak adlandırılmıştır. Şekildeki grafikte RNA'ların herhangi bir parçalanmaya uğramadığı ve kaliteli bir şekilde izole edildiği görülmektedir. **b)** RNA izolasyonunun jel görüntüsüdür. L kuyucuğunda DNA

“marker”ı, 1 ve 2 kuyularında ise yine 1R ve 2R olarak adlandırdığımız RNA örnekleri görünmektedir. a ve b’de görülen iki belirgin bant ve “peak”ler 18S ve 28S RNA’ları göstermekte olup, RNA’nın kaliteli olması durumunda belirgin bir şekilde görülmelidirler.

Bu işlemde elde edilen RNA’lar RT-PCR reaksiyonunda örnek (template) olarak kullanıldı. Roche firmasına ait “cDNA synthesis” kiti kullanılarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak total RNA örneği içerisindeki mRNA’lar, kitin içinde bulunan (ve poly-A bölgelerine bağlanan) oligo-dT primerlerin kullanımıyla cDNA’ya çevrildi. Ardından bu cDNA havuzunda bulunan kendi homolog genimizin cDNA’sı, daha önceden dizayn ettiğimiz 2At116 genine ait primer dizileri ile, “Fermentas” firmasının Pfu Taq Polymerase enzimi ile çoğaltıldı. Primer dizileri ektedir.

2At116GWF :
GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAATCTGACAGCGAAAGACAGAG
2At116GWR:
GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGACTAAGGAATTATTTGGTCGTGTAG

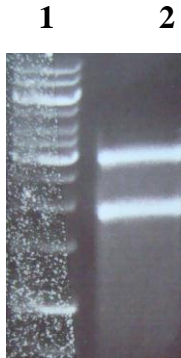
Pfu enzimi ile gerçekleşen PCR reaksiyonu koşulları: 5 µl (2mM) dNTP karışımı, 5 µl Pfu tampon çözeltisi, 5 µl MgCl₂, 1 µl (10 pmol) reverse primer, 1 µl (10 pmol) forward primer, 2 µl örnek (sentezlenen cDNA karışımı), 0,5 µl Pfu taq polymerase enzimi, 30,5 µl dH₂O şeklinde 50 µl son hacme tamamlanarak, 94°C’de 30 sn., 57°C’de 30 sn., 68°C’de 1.5 dk. ve toplamda 30 adım (cycle) olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ile çoğaltılan 2At116 geni 1,6 kb boyutunda olup jelden “Gel Extraction kiti” kullanılarak izole edildi.

2.3.Gateway Klonlama İşlemleri

Bir sonraki adımda, sentezlenen cDNA’lar rekombinasyon reaksiyonu temeline dayanan Gateway teknolojisi kullanılarak ekspresyon vektörüne atıldı. Bu işlemde, öncelikle *attB* primer sekanslarını içeren cDNA’lardan 5 µl, hedef vektör olan pDONR’dan 1 µl, ve reaksiyonun gerçekleşeceği TE tampon çözeltisinden 2µl alındı. pDONR vektörü ile cDNA’lar arasındaki rekombinasyon reaksiyonunu *attB* sekansına spesifik olarak gerçekleştiren ve BP Clonase II enzim karışımından 2 µl alınarak, reaksiyon enzimin aktivasyon sıcaklığı olan 25°C’de 3 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Reaksiyonun sonlanması için Proteinase K çözeltisinden 2 µl eklenerek 10 dakika 37 °C’de ve 15 dakika 70 °C’de inkübe edildi. Reaksiyon sonrası elde edilen pDONR-cDNA giriş (entry) klonu ısı şoku yöntemi kullanılarak E.Coli OmniMAX ırkı bakteri hücrelerine aktarıldı. Seçimlilik için gen aktarımı sonrası hücreler 50µg/ml kanamisin antibiyotiği içeren katı LB besiyerlerine yayıldı ve

37°C’de bir gece büyümeye bırakıldılar.

Büyüyen, yani vektörleri ve cDNA’ları (2At116) içeren hücrelerden, plasmid izolasyon kiti kullanarak plasmid izolasyonu yapıldı ve bir ileri klonlama aşaması olan ekspresyon vektörü pAG426GPD’ye klonlamak için, LR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon, pDONR-cDNA (At116 ve 2At116) vektöründen 5 µl, hedef vektörden (pAG426GPD) 1 µl, TE tampon çözeltisinden 2 µl ve LR Clonase II enzim karışımından 2 µl alınarak 25°C’de 3 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Proteinase K ile rekombinasyon reaksiyonu yukarıda anlatıldığı biçimde sonlandırıldıktan sonra, cDNA’ları içeren ekspresyon vektörlerinin seçimi için OmniMAX hücrelere ısı şoku yöntemi ile transforme edildi, bu sefer katı LB-amfisilin (pAG426GPD vektörü amfisilin-karşıtı gen bölgesini içermektedir) içeren besiyerlerine yayıldı ve 37°C’de 1 gecelik inkübasyon sonrasında büyüyen hücrelerden, istenilen homolog genleri içeren ekspresyon vektörleri yine aynı Invitrogen Miniprep plasmid izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. pDONR ve p426GPD plasmidleri içinde 2AT116 geninin klonlandığını tespit etmek için attb bölgesine spesifik enzimle kesilerek doğru uzunluktaki bant şekil 2 ve 3 de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2at116 geninin kesimi. d1. sırada 1kb’lık DNA marker’ı ve 2. sırada ise yaklaşık 1,6 kb boyutunda 2At116 ve üstünde pDONR vektörü görülmektedir.



Şekil 3. 2At116 geninin p426GPD kesimi. 1. sırada 1kb'lık DNA marker'ı ve 2. sırada ise yaklaşık 1,6 kb boyutunda da 2At116 ve üstündeki bantda p426GPD ekspresyon vektörü görülmektedir.

Ayrıca DNA 2At116 geninin dizi analizleri yapılmış olup klonlama işlemi başarı ile bitirilmiştir. Sonuç olarak mayada (*Saccharomyces Cerevisiae*) bulduğumuz bor taşınımından sorumlu genlerin Arabidopsis homologlarından birisi tarafımızdan diğerleri de Dr. Versaw'dan istenilerek, bor taşımadaki rolleri araştırılmaya hazır hale getirilmiştir.

2.4. Mayaya Transformasyon İşlemleri

pAG426GPD-cDNA vektörünün mayaya transformasyonu için, lityum asetat yöntemi kullanılmıştır. Agarlı besiyerinden alınan yabani tip maya hücreleri bir gece 30⁰ C'de sıvı YPD besiyerinde büyütülerek, ardından, hücreler santrifüj ile çöktürülüp besiyeri uzaklaştırılmış ve steril su ile yıkanmıştır. Hücreler 5 saniye yüksek hızda santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Oluşan hücre çökeltisi 0.1 M derişimli Li-Ac çözeltisi ile tekrar süspansiyon haline getirilerek ve aynı yöntem ile tekrardan çöktürülmüştür. Son olarak, hücre çökeltisi sırasıyla, 240 µl %50 derişimli PEG, 36 µl 1M Li-Ac, 5 µl taşıyıcı tek zincirli somon sperm DNA'sı, 5 µl pAG426GPD-cDNA vektörü ve 45 µl steril dH₂O ile tekrardan çözelti içine alınmıştır. Çözelti kuvvetli bir şekilde vortekslendikten sonra 30 dakika 30⁰ C'de inkübe edilip, ardından da, 42°C'de 25 dakika ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Transformasyonu gerçekleştirilen hücreler 100-150 mM borik asit ve seçimlilik için de metiyonin, histidin, lösin içerip urasil içermeyen YNB^{URA} besiyerinde yetiştirilmiştir. Kontrol içinse ilgilendiğimiz genleri içermeyen boş pAG426GPD vektörünü içeren maya hücreleri de aynı besiyerlerine mikropipet yardımı ile ekilmiştir.

2.5. Bor Ölçüm İşlemleri

Bora dirençlilik sağlayan 2AT116 geninin bora dirençlilik mekanizmasını aydınlatmak için borlu ortamda büyüyen mutantların hücre içi bor konsantrasyonları ölçüldü. Normal hücreler (yabani tip) için 75 mM in üzerindeki borik asit konsantrasyonları hücreleri öldürdüğü için bu konsantrasyon, mutantların içinde büyüyeceği ve hücre içi bor analizlerinin yapılabileceği bor konsantrasyonu olarak belirlendi. Zengin besi ortamında büyütülen yabani tip ve mutant hücreler, logaritmik büyüme aşamasında iken ortamın bor konsantrasyonu 75 mM olacak şekilde borik asit ilave edildi ve hücreler normal bir hücre bölünmesi için gereken zaman kadar (90 dakika) bu ortamda inkübe edildi. Santrifuj ile çöktürülen hücreler ortamdaki bordan arıtılmak için dört defa saf su ile yıkandı. Daha sonra homejenizasyon çözeltisi içerisinde, küçük cam boncukları (glass beads) yardımı ve boncuk dövücü (bead beater) ile parçalandı. Homejenizasyon çözeltisi içerisine hücre ekstraktlarındaki proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla uygun miktarlarda protease inhibitörleri ilave edildi. Hücre ekstraktları ya direk olarak bor tayin deneylerinde kullanıldı ya da - 80 °C de tayin zamanına kadar bekletildi. Çıkacak bor sonuçlarını normalize etmek için her bir hücre ekstraktındaki total protein miktarı Bradford testi ile belirlendi. Ticari olarak satın aldığımız bor miktar tayin testi (Merck, Boron Cell Test) ile hücre ekstraktlarındaki bor analizleri yapıldı.

2.6. Gen ekspresyonu analizleri

Mayada bor toleransı gösteren 2AT116 geninin bitkideki mRNA ekspresyonuna bakmak için aşağıdaki işlemler yapıldı.

Beş mM borlu ortamda yetişen ve yetişmeyen Arabidopsis'deki yaprak ifadenme seviyelerine gerçek zamanlı PZR (Real Time PCR) tekniği ile bakıldı. Bu işlem için elimizdeki Arabidopsis tohumları % 0,15 oranında agaroz içeren besiyerine yerleştirilerek ve 4 gün boyunca 4°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra su ile temas eden steril kaya yününe eşit sayıda yerleştirildi. Çimlenme gerçekleştirildikten sonra iki ayrı plastik beherde bulunan bitkiler bitkilerin ihtiyacı olan mikro ve makro elementleri içeren Hoagland solusyonunda yetiştirildi. Hoagland Solusyonu son hacmi 1 litre olmak üzere, 3,5 ml Ca(NO₃)₂, 2,5 ml KNO₃, 1 ml KH₂PO₄, 1 ml MgSO₄, 0,5 ml Fe EDTA ve 0,5 ml iz elementleri içerecek şekilde hazırlanmıştır. Yeterli büyüme gerçekleştikten sonra örnek kaplarından birindeki Hoagland çözeltisine 5 mM bor uygulandı. Bor uygulanmış ve uygulanmamış Arabidopsis örneklerinden 0, 6, 24, 48 ve 144 saat sonra yaprak dokuları toplandı. Bu örneklerden RNA

izolasyonu yapıp DNase uygulamasından sonra, cDNA izolasyonu için RNA'lar Fermentas firmasının "First strand cDNA synthesis" kiti kullanarak cDNA'ya çevrildi. Bu işlem için, öncelikle, her bir RNA örneğinden 2 µg RNA alınarak ve bunlara sırasıyla 1 µl random hexamer ve distile su ilave edildi. Reaksiyon karışımı 70⁰C'de 5dk inkübe edilerek buza alındı. Reaksiyon karışımına daha sonra sırasıyla 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl ribolock ribonükleaz inhibitörü ve 10mM dNTP karışımı eklenmiştir. Karışım 25⁰ C'de 5 dakika inkübe edilerek, karışıma 1 µl reverse transkriptaz enzimi ilave edilmiştir. Sonra karışım sırasıyla 25⁰ C'de 10 dakika, 42⁰ C'de 60 dakika, 70⁰ C'de 10 dakika inkübe edilip cDNA elde edilmiştir. RT-PCR için aşağıdaki primerler kullanılmıştır.

2At116RTF GGGTGTTCGAATGCCTGCTATGAA

2At116RTR ACAGGTTCCCTTGGTTTGCTACCT

internal control için Arabidopsis *EF-1-α* geni kullanılmıştır.

AteifF TCGTTATGATCGACTCTCTTATGG

AteifR CCAAAAAGGAGGGAGAGAGAAAG

RT-PZR'da, örneklerin amplifikasyonu için gerekli olan karışım aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

İQ SYBR Green Supermix	12,5 µl
Pirimer 1	1 µl
Pirimer 2	1 µl
Distile su	9,5 µl
cDNA	1 µl

Real-Time PCR'in koşulları ise aşağıdaki gibidir.

Döngü 1	Döngü 2 40x
95 ⁰ C 1:30 dk	94 ⁰ C 0:50 sn
	58 ⁰ C 0:45 sn
	72 ⁰ C 0:45 sn

İstatistik hesaplamalar IQ5 real time (BIO-RAD) cihazındaki program kullanılarak ve normalizasyon işlemi yaptırılarak hesaplanmıştır.

2.7. 2At116 ve ATR1 Geninin Arabidopsis'e Transformasyonu

2At116 ve ATR1 cDNAları Gateway klonlama yöntemi ile pE-35S-HA-GW vektörü içine klonlanmıştır.

2At116 ve ATR1 içeren vektörler *Agrobacterium* GV3101(pMP90RK) suşu ile çiçeklere transformasyon yapılacağı için gerekli kompetent hücreler aşağıdaki yöntem sırası izlenerek üretilmiştir:

Agrobacterium kompetent hücrelerin hazırlanması için hücreler, öncelikle 5 ml YEP besiyeri (10 gr yeast extract, 10 gr pepton, 5 gr sodyum klorür (NaCl) pH 7 olarak 1 litre) 150 µg/ml rifampisin ve 100 µg/ml gentamisin antibiyotiklerini içeren ortama gliserol stoğundan alınarak 28° C sıcaklık ve 250 rpm devirle çevrilerek 15 saat inkübe edilmiştir. Sonraki gün, 2 ml gece boyu bekleyen kültür 50 ml taze YEP besiyerine eklenerek ve 600nm dalga boyunda 0.5-1.0 arası soğurum değerine ulaşana kadar yine 28° C sıcaklıkta büyütülmüştür. Sonrasında bakteri kültürü, 10 dakika buz içinde inkübe edilerek hücreler 5,000 rpm değerinde santrifüjle çöktürülüp, 1 ml soğuk 20 mM CaCl₂ ile tekrar sıvı forma alınmıştır. Elde edilen kompetent hücreler ilgili genimizi içeren 35S vektörleri ile gerektiğinde transforme edilmek üzere 1.5 ml ependorf tüplerinde 100'er µl olarak saklanmıştır.

2At116 ve ATR1 plasmidlerini ısı şoku yöntemi ile *Agrobacterium*'a transforme edildi. Transformantlar rifampicin, carbenicillin, gentamycin, ve kanamycin antibiyotiği içeren besiyerinde seçildikten sonra tek koloni seçilerek 250ml sıvı YEB besiyerinde büyütüldü. Silwet L-77 ve %5 sukroz katılmış *Agrobacterium* solüsyonu genişçe bir kaba alındı. Transformasyon için tomurcukları oluşmuş ancak daha çiçekleri açmamış olan Columbia Col-0 yabancı tür bitkileri seçildi. Daha sonra bitkiler bu solüsyona daldırıldı ve solüsyona tamamen bulanana tomurcuklar (bitkinin diğer kısımları hariç) 1-2 saniye bekletilip, solüsyondan çıkartıldı. Uygulama sonrasında, transformasyonun etkinliğinin artırılması için, bitkiler plastik poşetlere geçirildi ve uygun nem ortamı sağlandı (Şekil 1). Bir saatlik nem

uygulamasý sonrasýnda, bitkiler büyüme odalarına alýnarak, normal büyüme koullarýna geri döndürüldü. Büyüme odasýna alýnan bitkiler, baklalarý yeilden sarýya dönünceye kadar sulanmaya devam edildi. Baklalar içerisinden tohumlar dökülmeye balamadan, baklalar belirgin bir Őekilde kahverengi olunca hasat edildi.

Hasat edilen tohumlar topraĝa ekilerek, transgenik olanlarý anlamak için 2mM Basta herbisidi püskürtülerek yaşayan bitkilerden tohumlar elde edildi (Őekil2 ve 3). Bu tohumlar T1 olarak adlandırýldý.

2.8.Bitkide ICP-MS ile Bor lm

Onbe gün 6mM borlu MS besiyerinde büyütülmüş bitkiler yıkandıktan sonra 60 C de 60 saat kurutuldu. 0,5 mg örnek 0,3mL konsantre nitrik asite alýnıp 120 C kuruyana kadar paralandý. Kuruyan rnekler 0,08 M nitrik asit de çözülerek ICP-MS cihazýnda bor ölçümü yapıldý.

3.Bulgular

Mayada bulunduğumuz bor taşınımından sorumlu genin (Kaya ve ark 2009) *Arabidopsis* homologlarının biyoinformatik yöntemlerle araştırması sonucu 7 gen bölgesi ortaya çıkartılmıştır. Genler sırasıyla : At2g29650, At2g38060, At3g46980, At4g00370, At5g20380, At5g44370, At5g65687. Aşağıda, mayada bulunduğumuz gen ile *Arabidopsis thailana*'da ki dizi analizi sonrasında, protein dizisi bakımından en fazla benzerlik gösteren genler çoklu karşılaştırma programı T-COFFEE ile yapılarak gösterilmiştir.

```
At2g29650      MNARALLCSSNIHSLYTSNRPPEKTSSRS-----L-RNLKPSPKSL-----R-
At5g44370_1    MALGGLISNRNFGSFIGSGNGCQRLGKSGAEVSKLFPNALLC-RNHQPLQASL-----HH
At2g38060      MATVGSL-----KPLHHSSCSSS-----FPRNPIVNRKAL--LGFVF
At3g46980      -----MCYSLSIQSSIDFHN-----RNALKIHGDRAIL-TS---NLPTL--RRIPF
At5g20380      MARLTLR-----PHNHFFSSPI-----YA-HKQPFLSVYTIFPHHH
At5g44370      MKLSN-----
atr1           -----MGNQSLV-----VLTESKGEYEN-----ETE
At5g65687      MTRVGQRD-----SPAKEEAPPATK--KRFLTPG-----

At2g29650      -----VW---IYPRNRSS-----VFRVLVRSSDKSE--SSNSYYVEGDKVSGNN
At5g44370_1    ESGHMRRSFGCF---LQPRMDSVIRFRNSIKINRSRAYKSE--ESDITEGVVPSADGSA
At2g38060      ---DSARKNQIRCENLRYSESSESGKRRNA-----AAKRNQSPERC--AA
At3g46980      LPERDRRRKLVLC---TGRVNVSLKFTGNTSVDLCGIPRHRLRVSCSDARRTPEE--TAA
At5g20380      QNPLI--KSRVKCSAS-----GTERVRESKKL-PPKDPIEDPKPQ-LP-IP
At5g44370      -----
atr1           LPVKKS-----SRDN--NIGESLTATAFTQS
At5g65687      -----RFVTILCIINLINYVDRG-----VIASNGVNGSSKVC--DA

At2g29650      D--VVSDSPSSIVLPWWEF--PKRWVIVLLCFSAFLCNMDRVNMSIAILP-MSAEYGW
At5g44370_1    E-AILVEGNLQNASPWWQQF--PRRWVIVLLCFSSFLCNMDRVNMSIAILP-MSQEYNW
At2g38060      EGVLTGGGGSEAI AEVRTMM--PERIKVVILTACMMCLCNADRVVMSVAVVP-LADKLGW
At3g46980      EL-----TAQPNFSEFITSERVKVAVMLALALALCNADRVVMSVAIVP-LSLSRGW
At5g20380      EV-LSTETGFEQNWPPWKNI--PQRYKLIGATSLAFVICNMDKVNLSIAIIP-MSHQFGW
```

```

At5g44370      -----I--PQRYVIVFLTFLSTCVCYIERVGFSAIYTV-AADAAGI
atr1          ED-EMVDSNQKWQNPNYFKYAW-QEYLFIFTMISQLL-NQAGTQTLSIMNILSDSFGS
At5g65687     KGVCSAGTG-----IQGEFNL
.
At2g29650     NPATVGLIQSSFFWGYLLTQIAGGIWADTVGGKRVLGFG---VIWWSIATILTPVAAKLG
At5g44370_1   SSATVGLIQSSFFWGYLLTQILGGIWADKFGGKVVLGFG---VVWWSFATIMTPIAARLG
At2g38060     SSSFLGVVQSSFLWGYIFSSVIGGALVDRYGGKRVLAWG---VALWSLATLLTPWAAHNS
At3g46980     SKSFSGIVQSSFLWGYLISPIAGGTLVDRYGGKVVMAWG---VALWSLATFLTPWAADSS
At5g20380     SSSVAGLVQSSFFWGYALSQPLGGWLSKIFGGKRVLEIG---VFTWSFATALVPLLAFG-
At5g44370     NQSSKGTILSTFFVGYACSQVPGGWAAQKIGGRKVLVLLS---FVLWSSTCFLVPLDPNR-
atr1          EGNSKSWLMASFPLVSGSFILISGRLDIYGLKKMLLVGYVLVI IWSLICGITKYSGSD-
At5g65687     TNFEDGLLSSAFMVGLLVASPIFAGLSKRFNPFKLVIGV---LTVWTIAVIGCGFSYNFW
. : : :* . . . : : . . * :
At2g29650     LPYLLVVRAFMGVGEVAMPAMNNILSKWVPVQERSRSLALVYSGMY--LGSVTGLAFSP
At5g44370_1   LPFLLVVRAFMGIGEGVAMPAMNNMLSKWIPVSESRSLALVYSGMY--LGSVTGLAFSP
At2g38060     TLALLCVRAFFGLAEGVAMPSTTLRSRWFPMDERASAVGISMAGFH--MGNVVGLLLTP
At3g46980     LWALLAARAMVGVAEGVALPCMNMVARWFPPTERSRAVGIAMAGFQ--LGNVVGLMLSP
At5g20380     MPGLIFSRILVIGEGVSPSAATDLIARTIPVKERSRAVGFVFGGLS--LGSVMGLLLAP
At5g44370     VGLLVVARLLVGV AQGFIFPSIHTVLAQWVPPHERSRLVSIITSGMY--LGAALGMWLLP
atr1          -TFFIISRAFQGLGIAFVLPNVLGIIGNIYVGGTFRKNIVISFVGAMAPIGATLGCLFAG
At5g65687     M--IAVFRMFVGVGEASFISLAAPYIDDSAPVARKNFWLGLFYMCIP--AGVALGYVFGG
. : * : * : . . : : * . * :
At2g29650     FLIHQ--FGWPSVFYSFGSLGTVWLTWLTWTKAESSPL-EDPTLLPEE-----RKLIAD-
At5g44370_1   MLITK--FGWPSVFYSFGSLGSIWFLWLKFAYS SPK-DDPDLSEEE-----KKVILG-
At2g38060     LMLSS--IGISGPFILFASLGLLWVSTWSSGVTNNPQ--DSPFITRSE-----LRLIQA-
At3g46980     IILMSQ--GGIYGPFVIFGLSGFLWLLVWLSATSSAPD-RHPQITKSELEYIKQKQIST-
At5g20380     PI IET--FNWESVFYLFGLLGWGFVGFQFLNEEEVS-YKGNEISTSH-----KSENAT-
At5g44370     ALVEL--RGPESVFLAEALAGVIWSSLWIRYATDPPRSEHPKAAAAG-----FGGALL--
atr1          LIGTEDPKQWPWAFYAYSIAAFINFLVLSIYAI PSTI-PTNIHHFSMDW-----IGSVLGV
At5g65687     YIGNH--LGWRWAFYIEAIAAMAVFVILSF--CIKPPQQLKGFADKDKSKPSTS-----I

```

```

:          *          .          .

At2g29650      -----NCASKEPVKSIP-----WRLI
At5g44370_1    -----GSKPREPVTVIP-----WKLI
At2g38060      -----GKPVQPSTISPKPN-----PSLRLI
At3g46980      -----MENKRISTSGI-----PPFGRL
At5g20380      -----KEELGSSLKEIP-----WKSF
At5g44370      -----PTNVNHHKVTHIP-----WKKI
atr1           IGLILLNFVWNQAPISGWNQAYIIVILIIISVIFLVVFIIEIRFAKTPL----LPRAVI
At5g65687      ETV-----APTDAEASQIKTKTPKSKNLVVLFGKDLKAL

```

:

```

At2g29650      LSKPPVWALISCHFNWGTFILLTWMPYYHQVLKFNLMESGLLSVFPWMTMAISANAG
At5g44370_1    LSKPPVWALIIISHFNWGTFILLTWMPYYNQVLKFNLTESGLLCVLPWLTMAVFANIG
At2g38060      LSKLPTWAIIFANVTNNWGYFVLLSWMPVYFQTFVFNVLKQAAWFSALPWATMAISGYA
At3g46980      LSKMPTWAVIVANSMSHWGFFVILSWMPIYFNSVYHVNLKQAAWFSAVPWSMMAFTGYIA
At5g20380      FQSPAVWAMIYTHFCGSWGHYTCLSWLPYFSEALSLNLTEAAWVSILPPLASIVVTSLA
At5g44370      MLSLPVWAIIVNNFTFHYALYVLMNWLPTYFELGLQISLQGMDSKMPYLNMFVFSIVG
atr1           KDRHMIQIM--LALFFGWGSGFIFTFY--YFQQLNIRQYTALWA-GGTYFMFLIWGIIA
At5g65687      FSEKVFIVNVLGYITYNFVIGAYSYWGPKAGFGIYK--MKNADMIFGGLTIICGIIIGTLG

```

: : . .

```

At2g29650      GWIADTLVS-RGFSVT-----NVRKIMQSIGFLGPAFF--LTQLKHIDSPTMAVLCM
At5g44370_1    GWIADTLVS-RGLSIT-----NVRKIMQSIGFLGPAFF--LSQLSHVKTPAMAVLCM
At2g38060      GAASDFLIR-TGHSVT-----SVRKIMQSIGFMGPGLS--LLCLNFAKSPSCAAVFM
At3g46980      GFWSDDLIR-RGTSIT-----LTRKIMQSIGFIGPGIA--LIGLTTAKQPLVASAWL
At5g20380      SQFADYLIT-NGVDTT-----TVRKICQTIAFVAPAICMTLSSVDIGLPPWEIVGIL
At5g44370      GFIADYLITKRILSVT-----RTRKFLNTVGFLIASAA--LMVLPFRTENGIVLCS
atr1           ALLVGFTIKNVSPSVFLFFSMVAFNVGSIMASVTPVHETYFRT--QL-----GTMI
At5g65687      G---SYVLDRINATLS-----NTFKLLAASTLLGA AFC--FTAFLMKNMYAFIALFA

```

. . : . .: : : .

```

At2g29650      ACSQGTDAFSQSGLYSNHQDIAPRYSGVLLGLSNTA-----GVLAVLGTAAATGHILQH-
```

At5g44370_1 ACSQGSDAFSQSGLYSNHQDIGPRYAGVLLGLSNTA-----GVLAVGVTGTAATGYILQR-
At2g38060 TIALSLSSFSQAGFLLNQDIAPQYAGFLHGISNCA-----GTLAAIVSTIGTGYFVQWL
At3g46980 SLAVGLKSFSHLGFLINLQEIAPEYSGVLHGMCLTA-----GTLAAIVGTVGAGFFVELL
At5g20380 TAGLALSSFALSGLYCTHQDISPEYASILLGITNTV-----GAVPGIVGVALTGFLLDST
At5g44370 SVALGFLALGRAGFAVNHMDIAPRYAGIVMGVSNTA-----GTLAGIIGVDLTGKLEAS
atr1 ILSFGMDLSFPASSIIFSDNLPMEYQGMAGSLVNTVVNYSMSLCLGMGATVET---QVNS
At5g65687 VGEILIFAPQAPVNFVCLHCVRPNLRPLSMASSTVL----IHILGDVPSSPLYGKMQDH-

: . . . : .

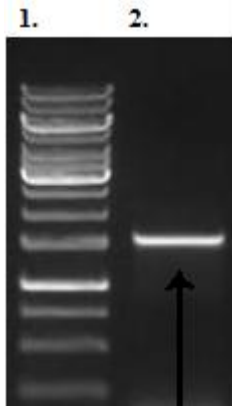
At2g29650 -----GSWDDVFTI-SVGLYLVTGIWNLF-----STGEK
At5g44370_1 -----GSWDDVFKV-AVALYLIGTLVWNLF-----ATGEK
At2g38060 -----GSFQAFLTV-TAFLYFATTVFWLLF-----ATGER
At3g46980 -----GSFQGFILL-TAILYLLSALFYNIY-----ATGER
At5g20380 -----HSWTMSLFVPSIFFYLTGTVVWLAF-----ASSEF
At5g44370 KLVYSDLSPESWRVVFFI-PGLLCIFSSVVFLLF-----STGER
atr1 DGKHLKGYRGAQYLGIGLASLACMISGLYMVESF-----IKGRR
At5g65687 -----LKNWRKSTLI-ITSILFLAAIIWGIGIFMNSVDRSNEVSEDEVEEDKLES

: : . . .

At2g29650 I-----ID----
At5g44370_1 I-----LD----
At2g38060 V-----F----
At3g46980 VD----FDTTAA
At5g20380 QT----FRKEDS
At5g44370 I-----FD----
atr1 ARAAAEYDCTVA
At5g65687 KTEN----STLA

Bu 7 genin 6'sının "functional analysis of the Arabidopsis PHT4 family of intracellular phosphate transporters" adlı makalede (Guo ve ark, 2008) pWV3 maya ekspresyona vektörüne klonlandığı tesbit edildiği için bu genler Dr. Versaw'dan istenilmiş ve elimize

ulaşmıştır. At5g65687 nolu gen ise tarafımızdan 2At116 isim konularak olarak Arabidopsis fidesinden izole edilen mRNAsından RT-PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4) RNA'lardan, "Reverse transcriptase" reaksiyonu ile cDNA sentezlenmesinden sonra, PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekilde, 1. sırada 1kb'lık DNA marker'ı ve 2. sırada ise yaklaşık 1,6 kb boyutundada 2At116 geni çoğaltılmış olarak görülmektedir.

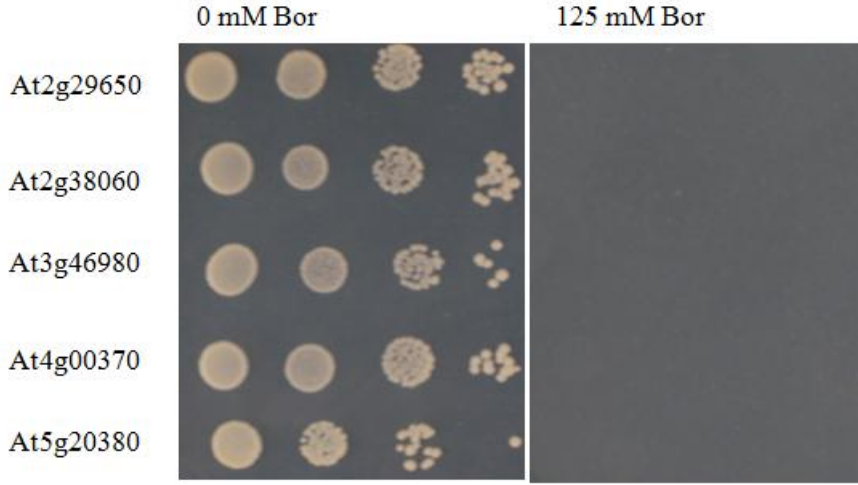
Gateway klonlama teknolojisi kullanılarak 2At116 geni mayada ekspres edilmek üzere p426GPD ekspresyon vektörüne klonlanmıştır (Şekil 5).



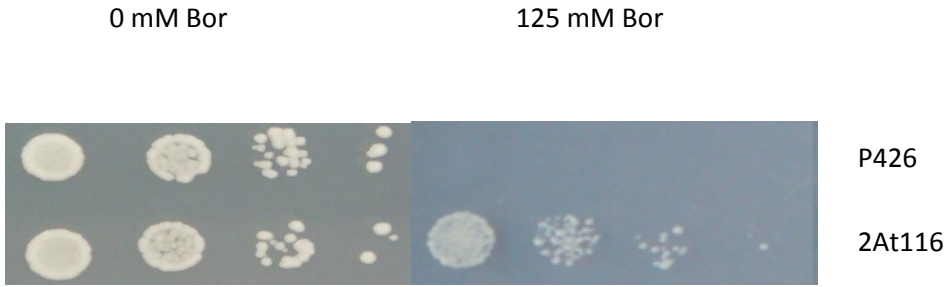
Şekil 5. p426GPD ekspresyon vektöründen klonlandıktan sonra kesilerek çıkarılan gen. 1. sırada 1kb'lık DNA marker'ı ve 2. sırada ise yaklaşık 1,6 kb boyutunda da 2At116 ve üstündeki bantda p426GPD ekspresyon vektörü görülmektedir.

Mayada bor toleransı sağlayıp sağlamadığını tesbit için ekspresyon vektörlerine atılan 6 gen (At2g29650, At2g38060, At3g46980, At4g00370, At5g20380, At5g44370) mayada bora toleransı sağlamamıştır (Şekil 6). 2AT116 ismini verdiğimiz gen ise 125 mM bor ortamında büyüme sağlamış olup borun hücre dışına atılmasında rol oynayabileceğini göstermiştir (Şekil 7).

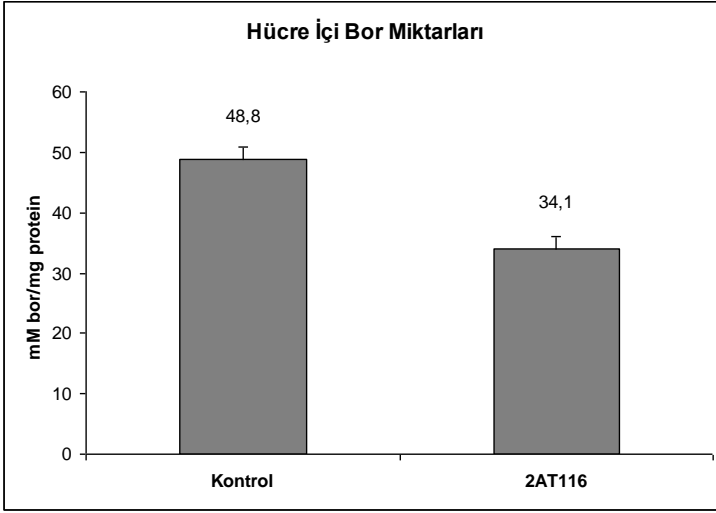
Şekil 6. Bor tolerans testi.



Şekil 7. 2At116 bor tolerans testi

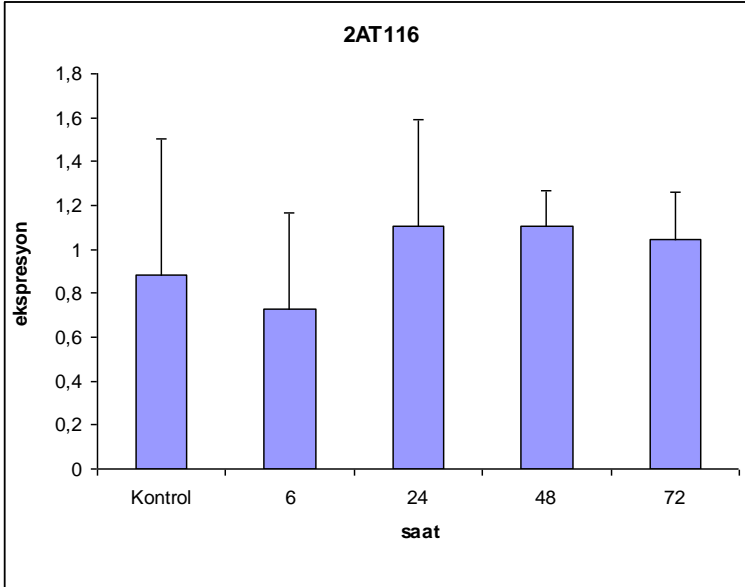


Mayada bor toleransı sağladığını gördüğümüz 2At116 geninin, hücre içindeki boru dışarıya atıp atmadığını anlamak için hücre içi bor miktarları, kontrol ve 2At116 genine sahip mayalarda ölçülmüştür. Şekil 8 de görüldüğü gibi 2At116 genine sahip maya hücrelerindeki bor miktarı kontrol grubunda 48,8 mM /mg protein iken 2At116 genine sahip hücrelerde 34,1 mM/mg protein olarak ölçülmüştür. Bor miktarındaki bu azalmamın sebebi ise 2At116 geni hücre membranında pompa görevi görerek boru dışarıya atarak hücrenin yüksek düzeyde bor biriktirmesini engellenmesi ile açıklanabilir.



Şekil 8. Kontrol ve 2At116 geni içeren maya hücrelerin deki bor miktarları.

2At116 geninin mayada bor toleransı sağladıktan sonra bitki içinde bora karşı bir cevap verdiğini anlamak için ekspresyon analizi yapıldı. Şekil 9 da görüldüğü üzere 2At116 geninin yaprak dokusundaki ekspresyon analizleri verilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında 2At116 geni bor uygulamasından sonra istatistiki olarak kayda değer bir artış veya azalış göstermemiştir. Buda genin mayada yüksek seviyede ekspres edildiğinde bor toleransı sağlamasına rağmen bitki içinde ekspresyonunun bor ile düzenlenmediğini göstermektedir.



Şekil 9. 2At116 geninin yabani tip Arabidopsis bitkisinin yaprak dokusundaki ekspresyon analizi

3.1.2At116 ve ATR1 Geninin Arabidopsis e Transformasyonu

Gereç ve yöntem kısmında anlatıldığı gibi 2At116 ve atr1 genleri yabani tip Arabidopsis bitkisine transforme edildi. Hasat edilen tohumlar toprağa ekilerek, transgenik olanları anlamak için 2mM Basta herbisidi püskürtülerek yaşayan bitkilerden tohumlar elde edildi (Şekil10 ve 11). Bu tohumlar T1 olarak adlandırıldı.



Şekil 10 Transformasyonu yapılmış bitkiler



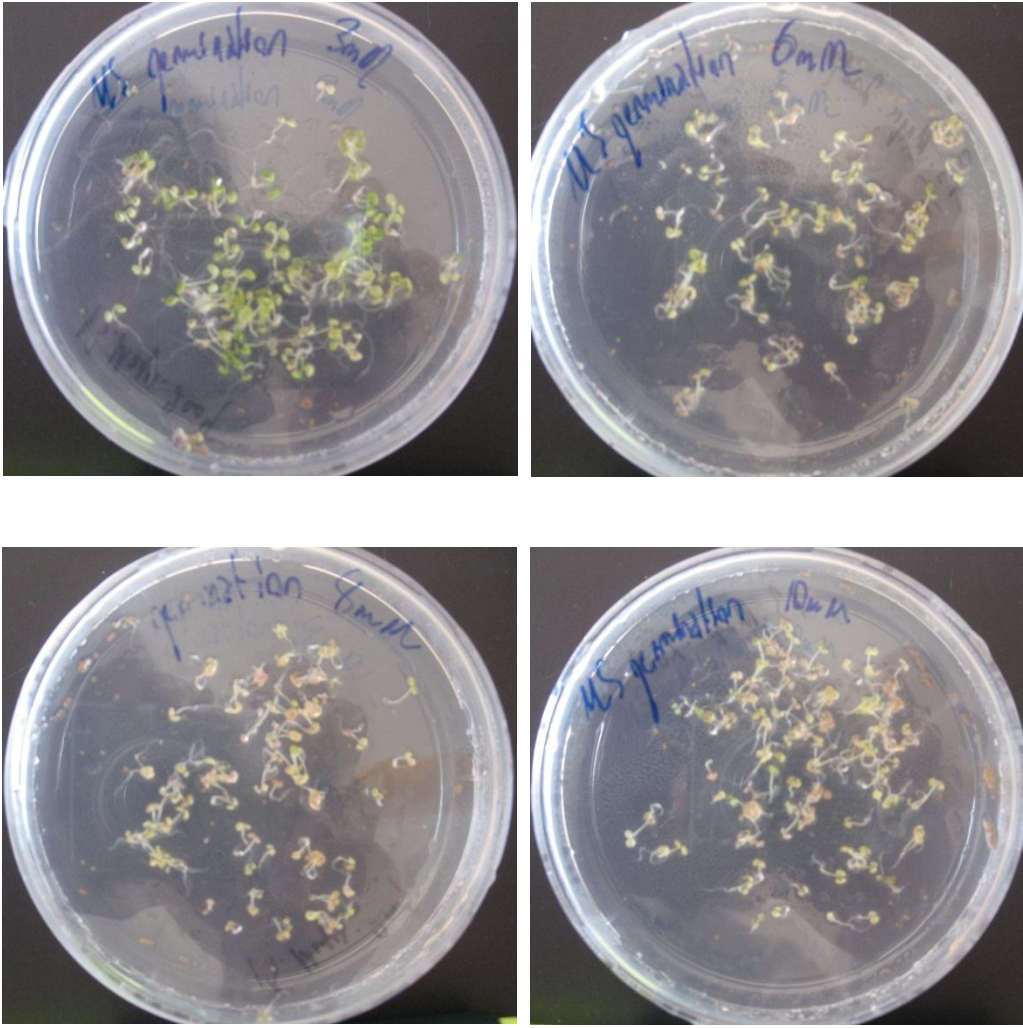
Şekil 11. Basta herbisid uygulanmamış T1 generasyonu.



Şekil 12. Basta herbisid uygulanmış T1 generasyonu. Basta uygulamasından sonra transgenik olmayan hatlar sararmış durumda görülmektedir.

Transformasyonun verimliliğinin %2 civarında olduğu görüldü. ATR1 transformasyonu sonucu Basta uygulamasından sonra yaşayan hatlardan (T1) T2 generasyonu elde etmek için yeniden tohumlar ekildi ve 3:1 oranı gösteren saksılardaki tohumlar toplandı. Aynı işlem 2At116 geni içinde yapıldı. T3 generasyonu içinde aynı işlem yapılarak ATR1 ve 2At116 genine tek lokusda sahip olan (3:1 oranı gösteren) hatlar elde edildi.

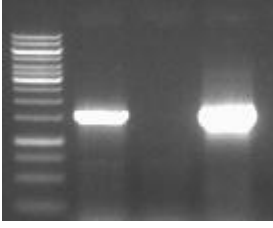
Toksik seviyedeki bor oranını belirlemek için, Col-0 yabani tür Arabidopsis tohumları 3, 6, 8 ve 10 mM lık borik asit içeren MS katı besiyerli petri kaplarına ekilerek büyümeleri gözlemlendi. 8 mM borik asit seviyesinden sonra bitkilerde borun toksik etkisi gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Borik asitin toksisite seviyesini gösteren MS katı besiyerinde büyüyen Col-0 Arabidopsis tohumları. Bor 8mM dan yüksek seviyelerde toksik etki göstermektedir.

3.2.ATR1 Geninin T2 Generasyonu Bitkilerde Ekspresyon Analizi

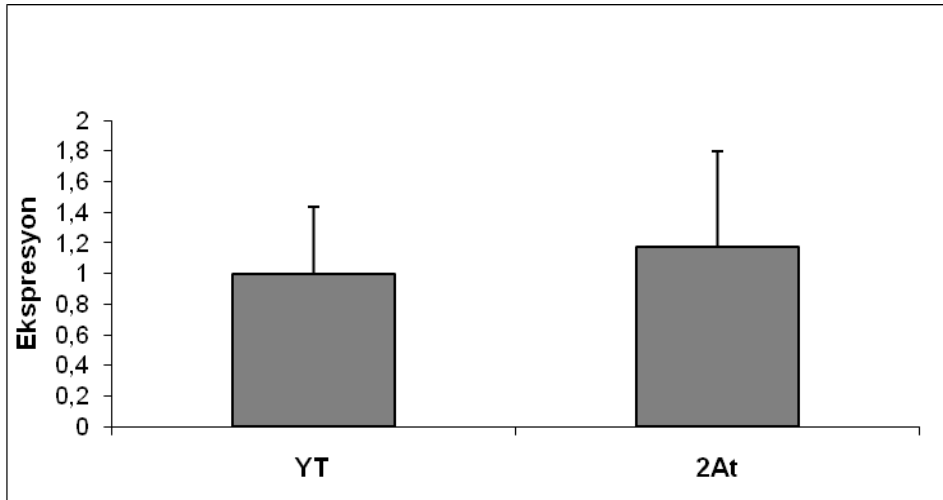
ATR1 geninin T2 generasyonu bitkilerde ekspresyonunun olduğunu anlamak için ATR1 primerleri ile PZR yapıldı. Şekil 14 de görüldüğü gibi 1600 bp uzunluğunda band görülmektedir. YTATR1 (yabani tür ATR1 T2 bitkisi) bitkisinden izole edilen DNA template ile yapılan PZR sonucu ile elde edilen bu band sekans edilmiş ve maya ATR1 geni olduğu anlaşılmıştır.



M Y YT YTATR1

Şekil 14. ATR1 geninin Arabidopsis T2 generasyonu içinde ekspresyonun gösterildiği jel resmi . M=1kb marker Y: maya DNAsı, YT: Yabani tip Arabidopsis DNAsı, YTATR1: ATR1 transforme edilmiş arabidopsis DNAsı.

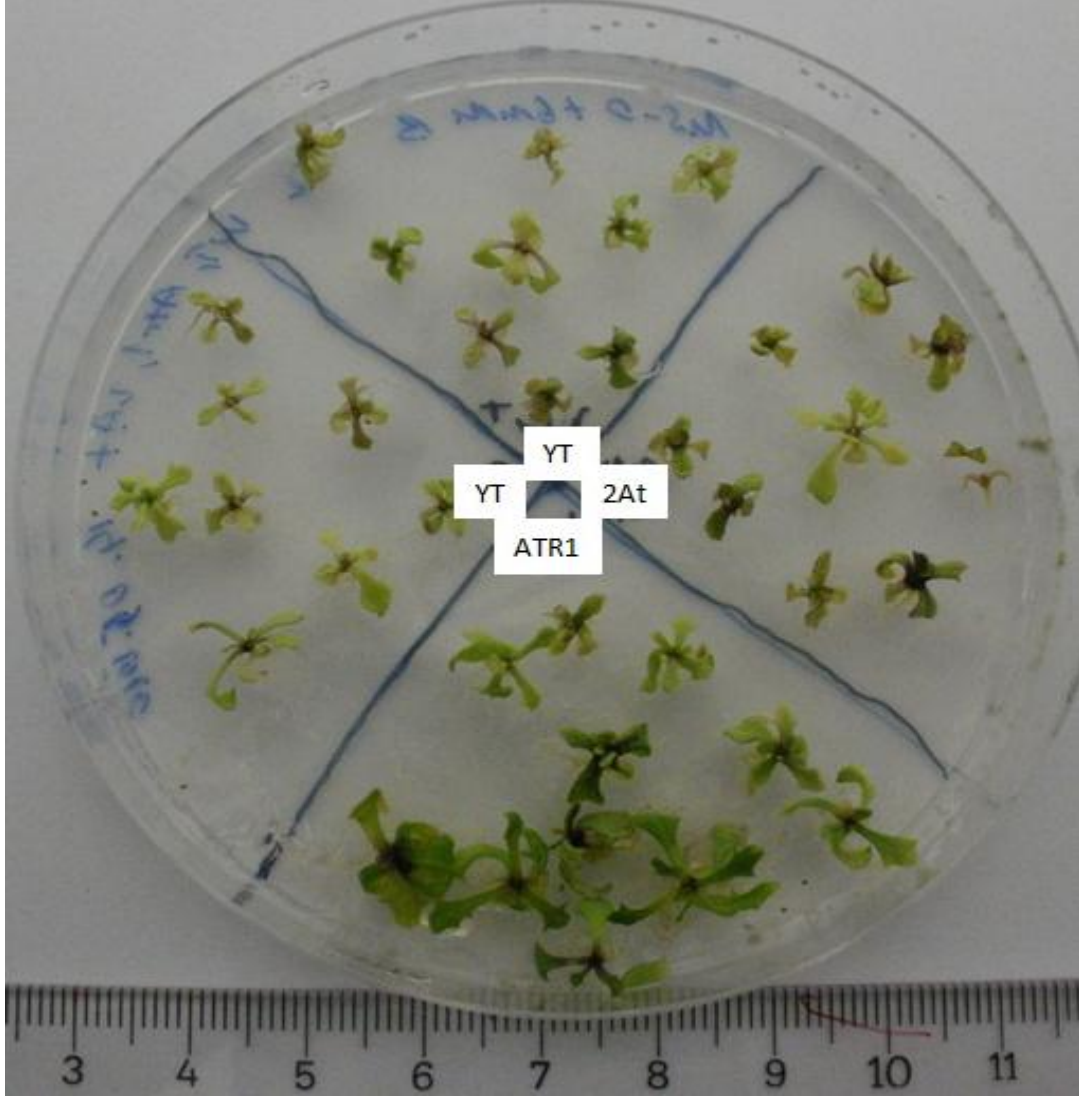
2At116 geni Arabidopsis genomunda olduğundan genomik DNA template kullanılarak ekspresyonuna bakılamayacağı için gerçek zamanlı-PZR ile bakıldı. Ekspresyon analizi sonucunda şekil 15 de görüldüğü gibi 2At geninin ekspresyon seviyesinde az bir artış gözlemlenmesine rağmen istatistiki olarak bir fark görülmemiştir. Bu genin ekspresyonunun bitki tarafından baskılanması sonucu (silencing) seviyesinin yeterli seviyede artmadığı görülmektedir.



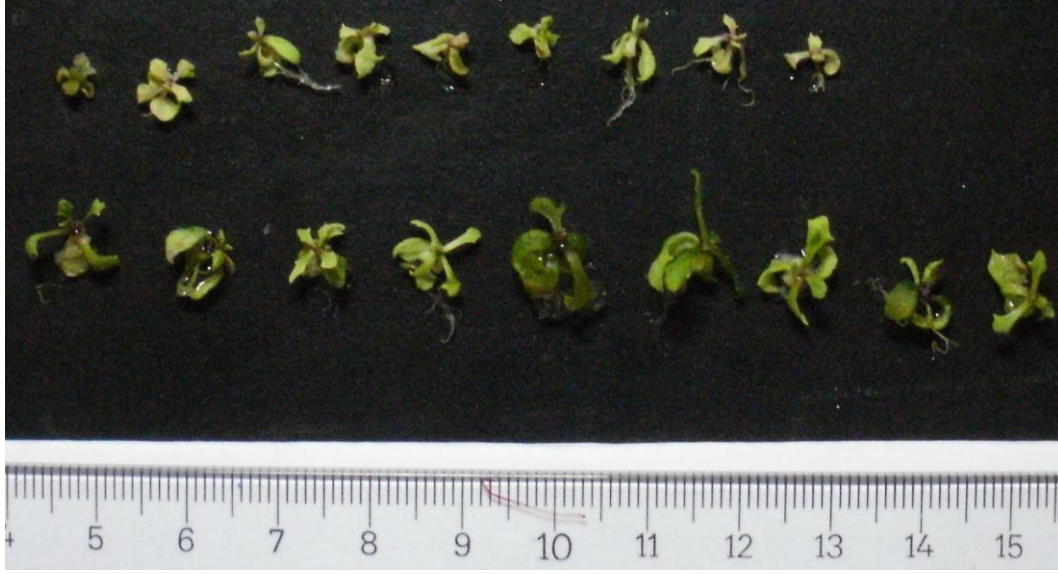
Şekil 15. 2At116 geninin Arabidopsis'e transformasyonu yapıldıktan sonra gerçek zamanlı PCR ile ekspresyon seviyesinin gösterilmesi. YT: Yabani tip

3.3. T3 Generasyonundaki Bitkilerin Bor Dirençliliği

Yabani tip, 2At genine sahip bitkiler ve ATR1 genine sahip transgenik bitkiler 6mM bor içeren MS besiyerli petrilere tohum olarak ekildi. Tohumların hepsinde çimlenme görüldü ve 15 gün sonunda ATR1 genine sahip bitkilerin yabani tip ve 2At geni içeren bitkilerden daha fazla büyüme görüldüğü izlendi (Şekil 16 ve şekil 17.).

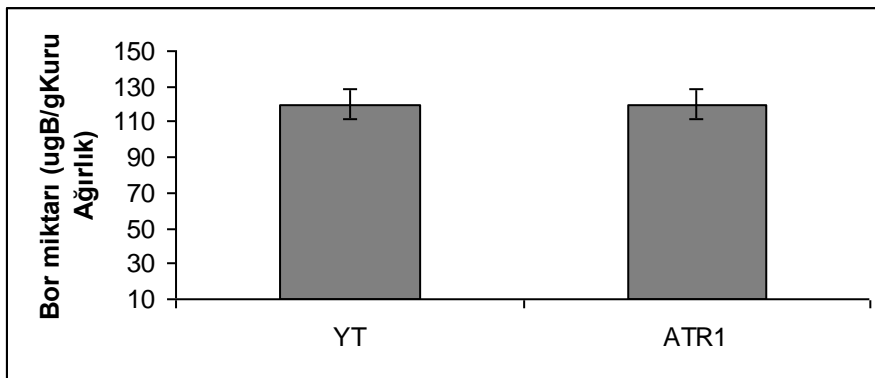


Şekil 16. 6mM borlu MS besiyerinde büyütülen yabani tip, 2AT ve ATR1 genine sahip bitkilerin büyüme resimleri. YT: Yabani tip, 2At: aşırı ifadelenmiş 2At genine sahip bitkiler, ATR1: aşırı ifadelenmiş ATR1 genine sahip bitkiler.



Şekil 17. 6mM borlu MS besiyerinde büyütülen yabani tip, ATR1 genine sahip bitkilerin büyüme resimleri. Üst sıra yabani tip, alt sıra aşırı ifadelendirilmiş ATR1 genine sahip bitkiler.

Toksik borlu ortamda daha iyi büyüme gösteren ATR1 geni içeren bitkilerin, yabani tip ile içerdiği bor miktarını anlamak için ICP-MS ile bitkideki bor miktarları ölçüldü. Şekil18 de görüldüğü gibi transgenik ATR1 li bitkiler (120,02 ug B/g) ile yabani tip (120 ug B/g) arasında içerdikleri bor miktarları bakımından istatistiki bir fark görülmemiştir. Bu sonuç, ATR1 proteinin boru hücre içinde depolanacak bir organelle pompalıyor olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 18. Yabani tip ve ATR1 geni içeren bitkilerdeki bor miktarları. Örnekler 15 gün boyunca 6mM borlu MS besiyerinde büyütülmüş fidelerden alınmış ve ICP-MS ile ölçülmüştür.

4.Tartışma/Sonuç

Projede, toksik seviyede bor taşıyan ortamlarda yetişebilecek bitkileri geliştirmek için kullanılabilir maya genlerinin bitki homologlarının, maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve *Arabidopsis*'deki fonksiyonel analizleri incelenmiştir.

Mayada bulduğumuz bor taşınımından sorumlu olan ATR1 genine ait *Arabidopsis* homologları biyoinformatik yöntemlerle araştırması sonucu aşağıdaki 7 gen bölgesi ortaya çıkartıldı. At2g29650, At2g38060, At3g46980, At4g00370, At5g20380, At5g44370, At5g65687.

Bu gen ürünlerinin yapısı incelendiğinde hepsinde, küçük moleküllerin taşınımından sorumlu yapısal protein bölgelerinin olduğu görülmektedir. *Arabidopsis*'deki bu 7 genin cDNA'ları klonlanarak E.coli ve maya hücrelerinde çoğalabilme özelliğine sahip mekik (shuttle) ekspresyon vektörlerine aktarıldı. Ekspresyon vektöründeki bu cDNA'lar maya hücrelerine transfer edildikten sonra yüksek borlu besiyerlerine ekilerek *Arabidopsis* cDNA'ların borun hücre dışına atılmasına, böylelikle bor dirençliliği sağlayıp sağlamadıkları araştırıldı. Bu 7 genden sadece 2AT116 ismini verdiğimiz (At5g65687) gen maya hücrelerinde bor dirençliliği gösterdi. Bu genin kodladığı proteinin boru hücre dışına attığı hücre içi bor ölçüm deneyleri ile kanıtlandı. 2AT116 geninin bor uygulamasından sonra *Arabidopsis*'deki ekspresyon seviyesinin değişmediği görüldü. Kaynaklara baktığımızda bazı metal taşıyıcı genlerinin ekspresyon seviyesinde düzenlendiği görülmektedir. Örneğin çinko taşınımından sorumlu, AtHMA4 geni ortamdaki çinko seviyesi artınca bitkideki ekspresyon seviyesinde artmaktadır (Williams 2005). Buna karşın *Arabidopsis*'deki, MTP1/ZAT genleri metal toleransı sağladıkları halde ortamdaki metal seviyesinin artması ile ekspresyon seviyelerini değiştirmemektedir (Van der Zaal 1999). Benzer şekilde mangan taşınımından sorumlu, AtMTP11 genide toksik mangan seviyelerinde ekspresyonu değiştirmemekte ancak

maya hücreleri içinde aşırı ifadelendiğinde mangan toleransı sağlamaktadır (Peiter, 2007). Bu kaynaklarda da görüldüğü üzere benzer bir durum 2At116 geninde de görülmektedir.

2At116 geninin Arabidopsis bitkisine gateway sistemi kullanılarak transformasyon işlemi yapıldı. T3 tohumları, 6mM borlu besiyerlerinde büyütülerek bor toleransı gösterip göstermedikleri incelendi ve bu genin bitkide aşırı ifadelenmesi bitkinin bor toleransı göstermesine yardımcı olmadı. *Arapidopsis*'de daha önce bulunan bor toleransında sorumlu olan BOR1 aşırı ifadelendiğinde toksik seviyedeki borlu ortamda endositosis yolu ile parçalanmakta (degradation) ve bor toleransı göstermemektedir (Miwa 2007). Bunun yanında BOR1 geninin altı paralogundan birisi olan BOR4 geni aşırı ifadelendiğinde bitkinin bor toleransı göstermesine yardımcı olmuş ve BOR4 geni parçalanmamıştır (Miwa 2007). Benzer şekilde, bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçta, 2At116 geninin ekspresyon seviyesinin düşük olması aşırı ifadelenmeye rağmen genin toksik bor seviyelerinde parçalanma göstermesinden dolayı kaynaklı olabilir.

Proje kapsamında mayadaki ATR1 genide bitki içine transforme edilerek bor dirençliliği test edildi. ATR1 geninin Arabidopsis de 6mM bora karşı yabancı tipe göre daha iyi büyüdüğü ve bor dirençliliğinde rol oynayabileceği gösterildi. ATR1 geni içeren bitkilerde bor miktarlarına bakıldığında ise bir azalma olmadığı görüldü. ATR1 proteini mayada hücre membranında lokalize olmaktadır. Ancak bitkiye transformasyon yapıldığında nerede lokalize olduğunu bilmemekteyiz. Hücrede vakuol içine boru pompalıyor olabiliyor ve bu yüzden yabancı tip ve ATR1 li bitkilerdeki bor miktarları aynı olduğu halde, ATR1 içeren transgenik bitkilerde bor vakuol içinde biriktiğinden toksik etki göstermeyebilir. PSORT analiz programı kullanılarak yaptığımız çalışmada yeast ATR1 proteinin signal peptid proteininin plastid içine gidebileceğini göstermiştir. ATR1 geni plastidlerde lokalize oluyorsa bitkilerdeki bor miktarları aynı çıkmış olabilir, bor plastidler içinde birikiyor olabilir. İleriki çalışmalarda yeşil

floresan protein (GFP) kullanılarak ATR1 proteinin nerede lokalize olduğunu bulmak gerekmektedir. Ayrıca daha güçlü promotör kullanılarak ATR1 geni bitkide sadece kök epidermis hücrelerinde ekspres edilerek boru direk olarak bitki dışına atması sağlanabilir ve bora daha dirençli bitkiler elde edilebilir.

KAYNAKLAR

Brown, P. H., Bellaloui, N., Wimmer, M. A., Bassil, E. S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V., Boron in Plant Biology, *Plant Biology*, 4, (2), 205-223, (2002)

Dannel, F., Pfeffer, H., Römheld, V., Update on boron in higher plants-Uptake, primary translocation and compartmentation, *Plant Biol (Stuttg)*, 4, 193-204, (2002)

Guo, B., Jin, Y., Wussler, C., Blancaflor, E. B., Motes, C. M., Versaw, W. K., Functional analysis of the Arabidopsis PHT4 family of intracellular phosphate transporters, *New Phytologist*, 177, (4), 889-898, (2008)

Iwai, H., Masaoka, N., Ishii, T., Satoh, S., A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 99,(25), 16319-16324, (2002)

Kaya, A., Karakaya, H.C., Fomenko, D.E., Gladyshev, V.N., Koc, A., Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast, *Molecular and cellular biology*, 29, (13), 3665- 3674, (2009)

Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, JI, Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls, *Plant Physiology*, 110, (3), 1017-1020, (1996)

Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fujiwara, T., Plants tolerant of high boron levels, *Science*, 318, (5855), 1417, (2007)

Nozawa, A., Miwa, K., Kobayashi, M., Fujiwara, T., Isolation of Arabidopsis thaliana cDNAs that confer yeast boric acid tolerance, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70, (7), 1724-1730, (2006)

Nozawa, A., Takano, J., Kobayashi, M., Von Wirén, N., Fujiwara, T., Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in Saccharomyces cerevisiae, *FEMS microbiology letters*, 262, (2), 216-222, (2006)

O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P., Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester, *Journal of Biological Chemistry*, 271, (37), 22923-22930, (1996)

Peiter, E., B. Montanini, A. Gobert, P. Pedas, S. Husted, F. J. M. Maathuis, D. Blaudez, M. Chalot, and D. Sanders.. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 8532-8537 (2007)

Song, W.Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., Lee, Y., Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants, *Nature biotechnology*, 21, (8), 914-919, (2003)

Stangoulis, J.C.R., Reid, R.J., Brown, P.H., Graham, R.D., Kinetic analysis of boron transport in *Chara*, *Planta*, 213, (1), 142-146, (2001)

Sutton, T., Baumann, U., Hayes, J., Collins, N.C., Shi, B.J., Schnurbusch, T., Hay, A., Mayo, G., Pallotta, M., Tester, M., Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification, *Science*, 318, (5855), 1446, (2007)

Takano, J., Kobayashi, M., Noda, Y., Fujiwara, T., *Saccharomyces cerevisiae* Bor1p is a boron exporter and a key determinant of boron tolerance, *FEMS microbiology letters*, 267, (2), 230-235, (2007)

Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., Von Wirén, N., Fujiwara, T., Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102, (34), 12276-12281, (2005)

Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading, *Nature*, 420, (6913), 337-340, (2002)

van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonnens AN, Schat H, Verkleij JAC, Hooykaas PJJ Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol* 119: 1047–1055 (1999)

Williams LE, Mills RF P1B-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 491–502(2005)

Zhao, A., Determination of trace elements in accelerating agent for plant by ICP-AES, *Guang pu xue yu guang pu fen xi*, *Guang pu*, 21, (4), 538-539, (2001)

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 108T523
Proje Başlığı: Mayada Bor Dirençliliği Sağlayan Genlerin Bitki Homologlarının Fonksiyonel Analizi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Çağlar Karakaya Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Alper Arslanoğlu
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Geneti Bölümü, 35430, Urla, İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.03.2009 – 15.03.2011
Öz (en çok 70 kelime) Mayada yaptığımız ön çalışmalarda, bor transferinden sorumlu bazı genler bulunmuştur. Bu projede, mayada bulduğumuz genlerin bitkilerdeki homologları araştırılmış, bir genin mayada bor toleransı sağladığı gösterilmiştir. Ancak bu gen <i>Arabidopsis thaliana</i> da aşırı ifadelendirildiğinde, toksik seviyedeki borlu ortamda genin baskılanmasından dolayı dayanıklılık göstermemiştir. Ancak mayada bulduğumuz ATR1 geni, <i>Arabidopsis</i> 'de aşırı ifadelendiğinde 6mM bora dayanıklılık göstermiş ve potansiyel olarak bu genin bora dayanıklı bitkiler yapmak için kullanılabileceğini gösterilmiştir.
Anahtar Kelimeler: Bor, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Maya)
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: 1-Role of Atr1 in Plant Boron Tolerance . (Makale, hazırlanmakta)