

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***AtBOR4* GENİ ORTOLOĞUNUN *Gypsophila perfoliata* L. GENOMUNDA
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KASIM 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***AtBOR4* GENİ ORTOLOĞUNUN *Gypsophila perfoliata* L. GENOMUNDA
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KASIM 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***AtBOR4* GENİ ORTOLOĞUNUN *Gypsophila perfoliata* L. GENOMUNDA
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2023-6440
nolu proje ile desteklenmiştir.

KASIM 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***AtBOR4* GENİ ORTOLOĞUNUN *Gypsophila perfoliata* L. GENOMUNDA
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 28/11/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY

ÖZET

***AtBOR4* GENİ ORTOLOĞUNUN *Gypsophila perfoliata* L. GENOMUNDA TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dal

Danışman: Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Kasım 2025; 93 sayfa

Bor, bitkiler için esansiyel bir mikro elementtir. Bor toksisitesi yağışın düşük olduğu, kurak ve yarı kurak topraklarda tarımsal üretimi sınırlayıcı bir etkidir. Toksik seviyede bor içeren toprakların ıslahı son derece zordur. Bu sorunun çözümü için bu bölgelere iyi şekilde uyum sağlamış *Gypsophila perfoliata* L.'nin gen kaynakları araştırılarak, bora tolerans mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Tanımlanan genlerin, bor toksisitesine dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesine ve fitoremedasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında bu amaçlar doğrultusunda, *G. perfoliata* 'ya 500 mg/L bor uygulanması sonucu 6 saatlik örneklerden RNA izolasyonu yapılarak oluşturulmuş mevcut cDNA kütüphaneleri, *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 *Δatr1* mayalarına elektroporasyon yoluyla aktarılmıştır. Mayalar için toksik kabul edilen 80 mM borik asit içeren ortamda, kök cDNA kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilen maya fonksiyonel tarama testinde bor toleransı gösteren koloniler seçilmiştir. Seçilen koloniler, artan konsantrasyonlarda borik asit içeren ortamlarda damlatma testi ve seri dilüsyon analizleri ile doğrulanmıştır. Mayaların taşıdığı plazmitler izole edilip tekrar mayaya aktarıldığında sadece PKB26 olarak isimlendirilen maya suşunun dayanıklılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. PKB26 maya suşu, borik asit konsantrasyonu 300 mM'e kadar olan ortamlarda hayatta kalabilmektedir. PKB26'nın taşıdığı toleranstan sorumlu plazmit içindeki cDNA'nın *Arabidopsis thaliana* HCO3- transporter family (*BOR4*) geniyle %72,9 oranında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bu cDNA, *GpBOR4* (*Gypsophila perfoliata* *BOR4*) olarak adlandırılmıştır. *GpBOR4* geni *EGFP* geni ile füzyon yapılarak BY4743 *Δatr1* mayada hücre içi lokalizasyonuna konfokal mikroskop ile bakılmış, proteinin plazma membranına lokalize olduğu tespit edilmiştir. Mayada yapılan hücre içi bor miktarı analizinde gen taşımayan maya ile kıyaslandığında *GpBOR4* genini taşıyan mayaların hücre içinde daha az bor bulundurduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan bu genin karakterizasyonu için *bor4* mutant ve Col-0 (WT) *Arabidopsis thaliana* hatlarına *Agrobacterium* yoluyla floral dip yapılarak gen aktarılmıştır. Transgenik *Arabidopsis*lerin toksik bor koşullarında gelişimi izlenmiştir. Transgenik bitkilerin gen ifadesi qPCR ile belirlenmiştir. Col-0 ekotipine GFP_{GUS}Plus vektörüyle aktarılan *GpBOR4* geni 3 transgenik hatta 10 mM'da hayatta kalma özelliği kazandırmıştır. *GpBOR4* geninin *G. perfoliata* genomunda kaç kopya olduğunu saptamak amacıyla southern blot yapılmıştır. *G. perfoliata*'nın bor stresi altında *GpBOR* geninin ifadesini 12 saatte neredeyse 7 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, bor toksisitesine karşı yüksek düzeyde tolerans gösteren *G. perfoliata*'da bor atımından sorumlu genin tanımlanmasının, bora hassas bitkilerin ıslahına önemli katkılar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Bor toksisitesi, BOR4, cDNA kütüphanesi, *Gypsophila perfoliata* L., Maya

JÜRİ: Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE *AtBOR4* ORTHOLOG IN *Gypsophila perfoliata* L. GENOME

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

November 2025; 93 pages

Boron is an essential micronutrient for plants. Boron toxicity is a limiting factor for agricultural production in arid and semi-arid regions with low precipitation. The reclamation of soils containing toxic levels of boron is extremely challenging. To address this issue, the present study aims to investigate the genetic resources of *Gypsophila perfoliata* L., a species well adapted to such environments, and to elucidate its boron tolerance mechanisms. The genes identified in this species are expected to contribute to the development of boron-tolerant plant varieties and to phytoremediation efforts.

In line with these objectives, existing cDNA libraries prepared from RNA isolated from 6-hour samples of *G. perfoliata* exposed to 500 mg/L boron were transferred into *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 Δ atr1 yeast strains via electroporation. In a yeast functional screening assay using the root cDNA library, colonies displaying boron tolerance were selected on medium containing 80 mM boric acid, a concentration considered toxic for yeast. The selected colonies were verified through spot assays and serial dilution analyses on media containing increasing concentrations of boric acid. Following plasmid isolation and re-transformation of yeast strains, only the strain designated PKB26 retained its tolerance. The PKB26 strain was capable of surviving in media containing up to 300 mM boric acid.

Sequencing analysis revealed that the cDNA responsible for tolerance in the plasmid carried by PKB26 shares 72,9% homology with the *Arabidopsis thaliana* HCO₃⁻ transporter family gene (BOR4). This cDNA was named *GpBOR4* (*Gypsophila perfoliata* BOR4). To determine its subcellular localization, the *GpBOR4* gene was fused to the EGFP gene and expressed in BY4743 Δ atr1 yeast. Confocal microscopy showed that the protein localizes to the plasma membrane. Intracellular boron measurements demonstrated that yeast strains carrying *GpBOR4* accumulated less boron than control strains lacking the gene.

For further characterization, the *GpBOR4* gene was introduced into *Arabidopsis thaliana* bor4 mutant and Col-0 (WT) lines via Agrobacterium-mediated floral dip transformation. The development of transgenic plants under toxic boron conditions was monitored, and transgene expression was quantified by qPCR. Introduction of *GpBOR4* using the GFPUSPlus vector conferred survival at 10 mM boron in three independent transgenic Col-0 lines. Southern blot analysis was

performed to determine the copy number of *GpBOR4* in the *G. perfoliata* genome. Expression analysis revealed that *GpBOR* transcript levels in *G. perfoliata* increased nearly seven-fold at 12 hours under boron stress.

Overall, these findings suggest that the identification of a gene responsible for boron efflux in the highly boron-tolerant *G. perfoliata* may significantly contribute to the improvement of boron-sensitive plant species and to strategies for mitigating boron toxicity.

KEYWORDS: BOR4, Boron toxicity, cDNA library, *Gypsophila perfoliata* L., Yeast

COMMITTEE: Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Assoc. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Asst. Prof. Dr. Emine ATALAY

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimini sunan, tüm laboratuvar imkanlarıyla destek olan ve tezimi yöneten sayın danışman hocam Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK'a teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca değerli görüşlerini ve katkılarını benimle paylaşan ve tezimin ilerlemesine katkı sunan sayın tez izleme komite üyelerim, değerli hocalarım Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e ve Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına sağladığı maddi katkılardan dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime, YÖK 100/2000 Projesi kapsamında Tarımsal biyoteknoloji alanında bursiyer olarak devam etme imkânı tanıyan Yüksek Öğretim Kurumu'na şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, doktora eğitim sürecimde TÜBİTAK BİDEB 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı ile bursiyer olarak desteklenmemi sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Bu çalışma kapsamında, *Gypsophila perfoliata* L. tohumlarının Kırka Bor Madeni sahasından toplanmasına izin verdikleri için Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Ayrıca, gerekli izinlerin alınması ve tohum toplama sürecinin gerçekleştirilmesinde verdikleri kıymetli desteklerden dolayı Sevda Gün Aktaş ve Dr. Serap Topsoy Kolukısa'ya özel olarak teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca her zaman bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü desteği veren iyi bir ekip olduğumuzu hissettiren tüm laboratuvar ve ofis arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım. Doktoraya ilk başladığım günden itibaren her türlü zorluğu birlikte aştığımız, akademik yolculuğumda ve manevi her türlü sorunumda yanımda olan arkadaşım Kübra BUDAK TEK'e ayrıca minnettar olduğumu belirtmek isterim. Ayrıca her zaman her konuda danışabildiğim ve fikirlerini önemseyen güler yüzünü hiç esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Hilal Şule TOSUN'a teşekkür ederim.

Bana varlıklarıyla motivasyon veren, her zaman güvenen ve arkamda olan, bana en önemli şeyin iyi bir aileye sahip olmak olduğunu hissettiren canım aileme hep minnettar olacağım. Lisans eğitimimden bu yana maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen annem Fatma ERDEĞER'e ve abim Taha ERDEĞER'e teşekkür ederim. Bu hayatta sahip olduğum en değerli insan, her zaman onunla geçirebildiğim vakitlere şükrettiğim rahmetli babam Mehmet ERDEĞER benim yaşam ışığımdır. Hayatım boyunca anne ve babama layık bir evlat olmaya çalışacağım.

Bana yol ve hayat arkadaşı olan, hayatımda ve doktora sürecimdeki tüm zorluklarını benimle birlikte yaşayan ve benim için çok büyük fedakarlıklar yapan sevgili eşim Abdullah ÇOLAK'a gönülden teşekkür ederim. Onun varlığı bana hep güç verdi ve yolumu aydınlattı.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	i
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1.Bor	4
2.2. Borun Taşınımı.....	5
2.3. Bitkilerde Bor Toksisitesi.....	9
2.4. Bor Tolerans Mekanizması	10
2.5. Maya ve Bor	12
2.6. <i>Gypsophila perfoliata</i> L.	13
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Maya Fonksiyonel Tarama Testi için Toksik Bor Dozunun Belirlenmesi.....	16
3.3. <i>Gypsophila perfoliata</i> cDNA Kütüphanesinin Mayaya (BY4743 <i>Δatr1</i>) Aktarılması ve Maya Fonksiyonel Tarama Testi	18
3.3. Damlatma ve Seri Dilüsyon Testi	20
3.4. Dayanıklı Kolonilerden Maya Plazmiti ve <i>E. coli</i> Plazmitinin İzolasyonu	20
3.5. Re-transformasyon	20
3.6. Sekanslama ve Blast Analizleri.....	21
3.7. <i>GpBOR4</i> geninin maya hücrelerinde subselüler lokalizasyonu	21
3.8. Mayada Hücre içi Borun Belirlenmesi.....	23
3.9. Tolerans Sağlayan cDNA'nın Bitki İfade Vektörüne Klonlanması	24
3.10. İfade Vektörlerinin <i>Agrobacterium</i> 'a Transformasyonu ve Floral Dip ile <i>Arabidopsis</i> 'e Aktarılması.....	25
3.11. Transgenik Bitkilerin Seçimi.....	27
3.12. Transgenik Bitkilerin Bor Dayanımının Belirlenmesi	28
3.13. Transgenik Hatlarda Gen İfadelerinin Belirlemesi	28
3.14. <i>GpBOR4</i> Geninin Genomdaki Kopya Sayılarının Southern Blot ile Belirlenmesi.....	29

3.15. <i>GpBOR4</i> 'ün GFPGUSPlus vektörü ile Arabidopsis'e Transformasyonu.....	30
3.16. <i>GpBOR4</i> 'ün Toksik Bor Koşullarında <i>Gypsophila perfoliata</i> 'da İfade Profili (qPCR).....	31
4. BULGULAR.....	34
4.1. Toksik Bor Dozunun Belirlenmesi.....	34
4.2. cDNA Kütüphanesinin Mayaya Transformasyonu ve Toksik Bor Dozunda Maya Fonksiyonel Tarama Testi	35
4.3. Damlatma ve Seri Dilüsyon Testi	36
4.4. Dayanıklı Kolonilerden Maya Plazmit İzolasyonu ve <i>E. coli</i> Plazmit İzolasyonu	37
4.5. Sekanslama ve Blast Analizleri.....	40
4.6. Mayada <i>GpBOR4</i> Proteinin Hücre içi Lokalizasyonun Görüntülenmesi	41
4.6. Mayada Hücre içi Borun Belirlenmesi.....	45
4.7. <i>GpBOR4</i> cDNA'sının Bitki İfade Vektörüne Klonlanması	47
4.8. İfade Vektörlerinin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e Transformasyonu ve Floral Dip ile Arabidopsise Aktarılması	50
4.9. Transgenik Bitkilerin Seçimi.....	51
4.10. Transgenik Arabidopsis Hatlarının Bor Dayanım Testleri.....	61
4.11. Transgenik Hatların Gen İfadelerini Belirleme.....	64
4.12. <i>GpBOR4</i> 'ün GFPGUSPlus vektörü ile Arabidopsis'e Transformasyonu.....	68
4.14. <i>Gypsophila perfoliata</i> 'da <i>GpBOR4</i> Geninin Toksik Bor Koşullarında İfadelenme Profili (qPCR).....	75
4.15. <i>GpBOR4</i> 'ün Genomdaki Kopya Sayılarının Southern Blot ile Belirlenmesi ...	77
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇLAR	85
7. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*AtBOR4* Geni Ortoloğunun *Gypsophila perfoliata* L. Genomunda Tanımlanması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

28/11/2025

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: santigrat derece
B	: bor
dH ₂ O	: distile su
EtOH	: etanol
kg	: kilogram
kV	: kilovolt
LiAc	: Lityum Asetat
M	: molarite
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
NaCl	: sodyum klorür
NaClO	: sodyum hipoklorit
Δ	: Delta
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre

Bu tezde ondalık yazım olarak ‘,’ kullanılmıştır.

Kısaltmalar

bp	: baz çifti
C	: col-0
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTT	: Ditiyotritol
DW	: Dry Weight
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EGFP	: Enhanced Green Fluorescent Protein
EST	: Expressed sequence tag
EV	: Boş Vektör
Hyg	: Higromisin B
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi
kb	: kilobaz
LB	: Luria-Bertani
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MS	: Murashige and Skoog
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
OD	: Optik density (Yoğunluk)
ORF	: Open reading frame (Açık Okuma Çerçevesi)
<i>G. perfoliata</i>	: <i>Gypsophila perfoliata</i> L.
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol
RNA	: Ribonükleik Asit

Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Salk
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SS	: Single Strand
SSH	: Suppressive subtractive hybridization
Tm	: Erime sıcaklığı
Tim	: Timentin
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YPD	: Yeast Peptone Dextrose

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. RG-II'nin yapısal modeli ve borat dimerizasyon reaksiyonu (Funakawa ve Miwa 2015).....	4
Şekil 2.2. Borun kök ve sürgün dokularında taşınımı (Pereira vd. 2021).....	6
Şekil 2.3. Türkiye topraklarındaki bor konsantrasyonunu gösteren harita	9
Şekil 2.4. <i>Gypsophila perfoliata</i> L.'nın taksonomik sınıflandırması	13
Şekil 2.5. <i>Gypsophila perfoliata</i> L.'nın doğal ortamda yayılışı (Vladimir Yu. Arkhipov, iNaturalist, Fotoğraf ID: 507239957, CC BY-NC 4.0 lisansı kapsamında kullanılmıştır).....	14
Şekil 3.1. <i>Gypsophila perfoliata</i> L. tohumlarının toplandığı Eti Maden Kırka Bor madeni sahası	16
Şekil 3.2. pAG426GPD-ccdb vektörü haritası (EV).....	17
Şekil 3.3. Elektroporasyon sonrası 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılan <i>G. perfoliata</i> Kök cDNA kütüphanesi aktarılmış BY4743 Δ atr1 mayaların petrilere toplanması	19
Şekil 3.4. pAG426GPD-ccdB-EGFP vektörünün haritası.....	21
Şekil 3.5. pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörü haritası	23
Şekil 3.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'ya Agrobacterium-aracılı floral dip metodu ile GpBOR4 geninin transformasyonu	27
Şekil 3.7. Southern blot sandviç modeli ile agaroz jeldeki DNA'ların pozitif yüklü naylon membrana aktarılması	30
Şekil 3.8. <i>Gypsophila perfoliata</i> bitkilerinin hidroponik sistemlere 20 gün alıştırılmasının ardından borik asit uygulanması	32
Şekil 4.1. pAG426GPD-ccdB (EV) vektörünün BY4743 ve BY4743 Δ atr1 mayaya transformasyonu sonucu mayaların besiyerlerindeki görüntüsü.....	34
Şekil 4.2. Empty Vector (EV) taşıyan maya suşlarında, artan konsantrasyonlarda borik asit (H ₃ BO ₃) içeren YNB (-Ura) besiyerlerinde toksik bor dozunun belirlenmesi	35
Şekil 4.3. <i>G. perfoliata</i> Kök (GK) cDNA kütüphanesinin YPD ve YNB(-Ura) besiyerlerine 10 ve 100 kat seyreltilerek yayılması	35
Şekil 4.4. 80 mM borik asit içeren toksik dozda YNB (-Ura) ortamlarında atr1 Δ - <i>G. perfoliata</i> kök kütüphanesinin fonksiyonel tarama testinde dayanıklı çıkan koloniler ..	36

Şekil 4.5. Artan dozlarda borik asit (0, 55, 80 100, 125 mM H3BO3) içeren ortamlarda dayanıklı kolonilerin damlatma testi.....	36
Şekil 4.6. Artan dozlarda borik asit (0, 80, 100, ve 150 mM H3BO3) içeren YNB (- Ura) ortamlarında seri dilüsyon sonucu dayanıklı bulunan koloniler.....	37
Şekil 4.7. Dayanıklı mayalardan GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak yapılan maya koloni PCR jel görüntüsü, EV: <i>atr1Δ</i> -pAG426GPD- <i>ccdB</i> , N.K: negatif kontrol (templete içermeyen)	38
Şekil 4.8. Mayalardan izole edilen plazmitlerin GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması, EV: <i>atr1Δ</i> -pAG426GPD- <i>ccdB</i> , N.K: negatif kontrol (templete içermeyen)	38
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> 'den izole edilen plazmitler ve PCR ürünleri, P: Plazmit; #2: PCR ürünü, N.K: negatif kontrol	39
Şekil 4.10. Re-transformasyon sonrası mayaların artan dozlarda (0, 55, 80, 100, 150, 200 mM H3BO3) borik asitli ortamlarda dayanımı	39
Şekil 4.11. PKB26'nın dayanabildiği en yüksek bor dozunun belirlenmesi	40
Şekil 4.12. PKB26 maya kolonisine dayanıklılık kazandıran cDNA sekansının NCBI blastn sonuçları.....	40
Şekil 4.13. PKB26 maya kolonisine dayanıklılık kazandıran cDNA sekansının NCBI blastx sonuçları.....	41
Şekil 4.14. <i>KpnI</i> kesim enzimi ile doğrulanmış pAG426GPD- <i>GpBOR4-EGFP</i> vektörü.....	42
Şekil 4.15. Transformasyon sonrası YNB ve YPD besiyerinde; a) <i>atr1Δ</i> + <i>GpBOR4-EGFP</i> ; b) <i>atr1Δ</i> + EGFP vektörü içeren mayalar.....	42
Şekil 4.16. pAG426GPD- <i>ccdB</i> , pAG426GPD- <i>ccdB-EGFP</i> ve pAG426GPD- <i>GpBOR4-EGFP</i> vektörünü içeren BY4743 <i>Δatr1</i> mayaların Leica DMI8 İnverted Mikroskop altında GFP ışması.....	43
Şekil 4.17. pAG426GPD- <i>ccdB</i> , pAG426GPD- <i>ccdB-EGFP</i> ve pAG426GPD- <i>GpBOR4-EGFP</i> vektörü içeren BY4743 <i>Δatr1</i> mayaların ZEISS LSM800 marka Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri.....	44
Şekil 4.18. pAG426GPD- <i>GpBOR4-EGFP</i> vektörünü taşıyan BY4743 <i>Δatr1</i> mayanın 5 ve 10 µm görüntüsü.....	45
Şekil 4.19. 55 mM borik asit uygulaması sonucu <i>atr1Δ-GpBOR4</i> ve <i>atr1Δ-EV</i> mayalarının 1. ve 2. saatlerdeki hücre içi bor miktarları, ANOVA sonucuna göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$), ancak saatler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$), (Her bir sütun, 3 biyolojik tekrarın ortalaması olup, hata çubukları o gruba ait standart hatayı temsil etmektedir.)	46

Şekil 4.20. 55 mM borik asit uygulaması sonucu BY4743- <i>GpBOR4</i> ve BY4743-EV mayalarının 1. ve 2. saatlerdeki hücre içi bor miktarları, one-way ANOVA sonucuna göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$), ancak saatler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$), (Her bir sütun, 3 biyolojik tekrarın ortalaması olup, hata çubukları o gruba ait standart hatayı temsil etmektedir.)	47
Şekil 4.21. BP reaksiyon ürününün ısı şoku yöntemiyle DH5 α <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu sonrası antibiyotikli ve antibiyotiksiz ortamlardaki seçilimi	48
Şekil 4.22. pDNOR ve Entry clone- <i>GpBOR4</i> 'ün <i>BsRGI</i> enzimiyle kesimi	48
Şekil 4.23. LR reaksiyon ürünü, pU19 vektörü, negatif kontrol (N.K) ve pozitif kontrolün (P.K) ısı şoku yöntemiyle DH5 α <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu sonrası antibiyotikli ortamlardaki seçilimi.....	49
Şekil 4.24. pIPKb004- <i>GpBOR4</i> ve pIPKb004 vektörlerinin <i>KpnI</i> enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü	49
Şekil 4.25. a) pIPKb004- <i>GpBOR4</i> vektörü aktarılmış <i>A. tumefaciens</i> EHA105; b) pIPKb004 vektörü (mock) aktarılmış <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 suşunun rifampisin (25 μ g/mL), streptomisin (100 μ g/mL), spectinomisin (100 μ g/mL) içeren LB ve antibiyotiksiz LB besiyerlerinde seçilimi.....	50
Şekil 4.26. a) pIPKb004- <i>GpBOR4</i> vektörü aktarılmış EHA105 kolonilerine 35S F- <i>qyPKB_R</i> primerleri ile yapılan PCR sonucu, P: plazmit PCR, N.K: negatif kontrol, b) pIPKb004 vektörü (mock) aktarılmış LBA4404 kolonilerinden yapılan PCR sonucu N.K: negatif kontrol.....	51
Şekil 4.27. Floral dip sonucu elde edilen potansiyel transgenik bitkiler <i>bor4</i> /pIPKb004- <i>GpBOR4</i> ve transformasyon oranı.....	52
Şekil 4.28. Floral dip sonucu elde edilen potansiyel transgenik bitkiler Col-0/pIPKb004- <i>GpBOR4</i> ve transformasyon oranı	52
Şekil 4.29. pIPKb004- <i>GpBOR4</i> vektörünü içeren transgenik Salk_133793 (<i>bor4</i>) bitkilerinin 35S_F ve <i>qyPKB_R</i> primerleri ile kurulan PCR sonucunun jel elektroforezinde görüntüsü. S: Salk_133793 (<i>bor4</i>), PC: positive control (pIPKb004), NTC: non-template control	53
Şekil 4.30. pIPKb004- <i>GpBOR4</i> vektörünü içeren transgenik Col-0 bitkilerinin 35S_F ve <i>qyPKB_R</i> primerleri ile PCR sonucu jel elektroforezinde görüntüsü. C: Col-0, PC: positive control(pIPKb004), NTC: non-template control	54
Şekil 4.31. pIPKb004- <i>GpBOR4</i> vektörünü içeren transgenik col-0 ve Salk_133793 (<i>bor4</i>) bitkilerinin gen spesifik <i>qyPKB_F</i> - <i>PKB_R</i> primerleri ile PCR reaksiyonu sonucu jel elektroforezinde görüntüsü. C: Col-0, S: Salk_133793 (<i>bor4</i>), PC: positive control (pIPKb004), NTC: non-template control.....	54
Şekil 4.32. Salk_133793 (<i>bor4</i>) hatlarının T-DNA PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, S: Salk_133793 (<i>bor4</i>)	55

Şekil 4.33. Salk_133793 (<i>bor4</i>) hatlarının WT PCR sonucu jel elektroforezinde görüntüsü, S: Salk_133793 (<i>bor4</i>), NTC: non-templete control	55
Şekil 4.34. Col-0 hatlarının T-DNA PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, C: col-0, NTC: non-templete kontrol	56
Şekil 4.35. Col-0 hatlarının WT PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, C: Col-0, PC: pozitif kontrol, NTC: non-templete kontrol	56
Şekil 4.36. Toprağa aktarılan; a) 7 Col-0/ <i>GpBOR4</i> hattı ve Col-0/Mock; b) 7 Salk_133793 (<i>bor4</i>)/ <i>GpBOR4</i> hattı ve Salk_133793 (<i>bor4</i>)/Mock bitkileri (her hattın 5' er bitki).....	58
Şekil 4.37. <i>A. thaliana</i> T3 jenerasyonu; a) Col-0; b) Salk_133793 (<i>bor4</i>) homozigot seçilen hatlar.....	61
Şekil 4.38. Col-0 hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H ₃ BO ₃) gelişimi	62
Şekil 4.39. <i>bor4</i> hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H ₃ BO ₃) gelişimi	62
Şekil 4.40. Col-0 hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 15 mM H ₃ BO ₃) gelişimi	63
Şekil 4.41. <i>bor4</i> hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 15 mM H ₃ BO ₃) gelişimi	64
Şekil 4.42. Col-0 hatlarına ait RNA'lar ve DNase uygulanmış RNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü	65
Şekil 4.43. <i>bor4</i> hatlarına ait RNA'lar ve DNase uygulanmış RNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü	65
Şekil 4.44. Col-0 hatlarına ait; a) <i>PDF2</i> geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki; b) <i>GpBOR4</i> geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki	66
Şekil 4.45. <i>bor4</i> hatlarına ait; a) <i>PDF2</i> geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki; b) <i>GpBOR4</i> geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki	66
Şekil 4.46. Col-0 (WT), Col-0#Mock, #7.4, #8.2, #10.1, #18.2, #23.3 transgenik hatlarına ait <i>GpBOR4</i> geninin ekspresyonu (2 ^{-ΔCt} yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır, Normalizasyon için referans gen <i>PDF2</i> kullanılmıştır.).....	67
Şekil 4.47. <i>bor4</i> (WT), <i>bor4</i> #Mock, #4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5 transgenik hatlarına ait <i>GpBOR4</i> geninin ekspresyonu (2 ^{-ΔCt} yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır, normalizasyon için referans gen <i>PDF2</i> kullanılmıştır.)	68
Şekil 4.48. GFP _{GUS} Plus vektörünün <i>Xba</i> I enzimiyle kesim sonucu jel görüntüsü	68

Şekil 4.49. <i>GpBOR4</i> geninin ORF bölgesini kapsayan primeler ile yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü	69
Şekil 4.50. Ligasyon ürününün <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu sonucu çıkan kolonilerin PCR jel elektroforezi görüntüsü, PC: pozitif kontrol (<i>GpBOR4</i> -GFPGUSPlus plazmit PCR), NTC: Negatif kontrol	70
Şekil 4.51. <i>BsRGI</i> enzimi ile kesim yapılarak GFPGUSPlus ve <i>GpBOR4</i> -GFPGUSPlus vektörlerinin doğrulanması	71
Şekil 4.52. <i>GpBOR4</i> -GFPGUSPlus vektörü aktarılan <i>A. tumefaciens</i> EHA105 suşuna 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü	71
Şekil 4.53. a) T0 tohumlarının ½ MS (Hgyromisin 25 µg/ml +Timentin 100 µg/ml) ortamlarında seçilimi; b) Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi	72
Şekil 4.54. Transgenik hatlardan elde edilen DNA ile 35S_F ve qyPKB_R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü.....	73
Şekil 4.55. Artan dozlarda (0, 3, 5, 10 mM) borik asit içeren ½ MS besiyerlerinde Col-0, Mock ve <i>GpBOR4</i> genini içeren transgenik T2 bitkilerinin dayanıklılığı.....	74
Şekil 4.56. <i>Gypsophila perfoliata</i> 'nın 0, 6, 12, 24, 48 saatlerinde kontrol ve bor uygulamasına ait hasat edilen örnekleri	75
Şekil 4.57. <i>G. perfoliata</i> 'ya ait; a) RNA örneklerinin; b) DNase uygulanmış RNA örneklerinin jel elektroforezi görüntüsü, KK: Kök Kontrol, KB: Kök Bor	76
Şekil 4.58. <i>Gypsophila perfoliata</i> 'ya ait RNA'lar ile kurulan qPCR sonucu a) housekeeping geninin (internal kontrol); b) <i>GpBOR4</i> geninin amplifikasyon pikleri....	76
Şekil 4.59. <i>G. perfoliata</i> 'da 500 mg/L bor stresi uygulamasından sonra 6, 12, 24 ve 48. saatlerde göre <i>GpBOR4</i> geninin $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanan relatif ekspresyon seviyeleri	77
Şekil 4.60. <i>SacI</i> ve <i>SwaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu pAG426GPD- <i>GpBOR4</i> vektörünün jel elektroforezi görüntüsü	78
Şekil 4.61. İleri (southern prob_F) ve geri (southern prob_R) primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü, NTC: non-template kontrol, gDNA: <i>Gypsophila perfoliata</i> genomik DNA.....	78
Şekil 4.62. <i>GpBOR4</i> genomik DNA'sındaki 800 bp'lik PCR ürününün DIG-High Prime ile işaretlenmesi sonucu oluşan probun etkinliğinin belirlenmesi.....	79
Şekil 4.63. a) %0.8 agaroz jelde yürütülen ürünler b) Southern blot sonrası membrana aktarılan ve prob ile işaretlenen DNA bantları kırmızı oklarla gösterilmiştir, DIG marker: ROCHE DNA Molecular Weight Marker II, P: plazmit (pAG426GPD- <i>GpBOR4</i>)	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü reaksiyon bileşenleri	18
Çizelge 3.2. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri	22
Çizelge 3.3. BP reaksiyon bileşenleri	24
Çizelge 3.4. LR reaksiyon bileşenleri	25
Çizelge 3.5. QPCR reaksiyonu bileşenleri.....	29
Çizelge 4.1. 7 tane Col-0/ <i>GpBOR4</i> hattı ve Col-0/Mock, 7 tane Salk_133793 (<i>bor4</i>) / <i>GpBOR4</i> hattı ve Salk_133793 (<i>bor4</i>)/Mock bitkilerinin ½ MS (25 µg/ml Hgy) ortamında dayanım durumları	57
Çizelge 4.2. <i>A. thaliana</i> T3 jenerasyonu (Col-0) transgenik hatların segregasyonu	58
Çizelge 4.3. <i>A. thaliana</i> T3 jenerasyonu Salk_133793 (<i>bor4</i>) transgenik hatların segregasyonu	59

1. GİRİŞ

Bor (B), metaller ile ametaller arasında ara özelliklere sahip olduğu için metalloid olarak tanımlanır. Periyodik tabloda III. grupta yer alan bor, bitkiler için esansiyel bir mikro elementtir (Marschner 1995). Düşük yağış koşullarında, B yeterince süzülemez ve bu nedenle bitki büyümesi için toksik olacak düzeylerde birikebilir (Reid 2007). Toksik bor seviyeleri ise tipik olarak bitkide büyümenin bozulmasına ve metabolizmasının değişmesine neden olarak yaprak ve gövdelerde ilerleyici nekroza, ayrıca meyvelerin şekil bozukluklarına neden olur. Bor toksisitesi hücrede metabolik olarak üç önemli mekanizmayı bozarak etki eder. Bunlar; serbest şeker ve RNA'nın bir bileşeni olan riboza bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişiminin bozulması, ATP veya NAD(P)H'de riboza bağlanarak birincil metabolizmaya müdahale edilmesi ve sitozolik pH'nın azalması yoluyla protein konformasyonunu ve biyosentezini etkilemesidir (Reid vd 2004). Ayrıca borun biriktiği yapraklarda osmotik dengenin bozulması da bu sebeplere eklenebilir (Stangoulis ve Reid 2002).

Topraktaki aşırı bor miktarı Avustralya, ABD, Rusya, Türkiye, Meksika, İsrail, Irak, Mısır, Suriye, Fas, Ürdün, Libya, Hindistan, Pakistan, Malezya, Peru, Şili, Macaristan, Sırbistan ve İtalya gibi birçok ülkede rapor edilmiştir (Brdar -Jokanović 2020). Abreu vd. (2005) diğer çalışmalardaki bilgilerle kendi araştırmalarını özetleyerek toprak bor konsantrasyonlarını ölçeklendirmiştir. Buna göre 0,0–0,2 ppm düşük, 0,21–0,6 ppm orta, 0,61–1,1 ppm yüksek, 1,2–3,0 ppm çok yüksek ve >3,0 ppm toksik toprak bor konsantrasyonlarını temsil eder. 0,5–2,0 ppm'nin ise optimum toprak bor aralığını temsil ettiği, bu değerlerden düşüklüğün ya da yüksekliğin ise bor yetersizliğini ya da toksisitesini temsil ettiği öne sürülmektedir (Sun vd. 2019). Bu kritik seviyeler toprak tipi, su durumu, pH, havanın nemi ve sıcaklığına, bitkinin dokusuna, türüne ve genotipine bağlı olarak değişiklik gösterir (Shorrocks 1997).

B taşınımı ve homeostazisi, temel olarak plazma membranı boyunca üç mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizmalar; borik asidin lipid çift katmanları boyunca pasif difüzyonu, borik asit kanalları yoluyla borik asidin kolaylaştırılmış difüzyonu yani nodulin-26-benzeri proteinler (NIP'ler) yoluyla ve BOR transporterları yoluyla borik asitten oluşan boratın dışarı atılması şeklindedir (Yoshinari ve Takano 2017).

İlk tanımlanan BOR transporterı olan AtBOR1 (Noguchi vd. 1997; Takano vd. 2002), hem meristematik hem de olgunlaşma bölgelerindeki epidermiste ve endodermiste ifade edilir (Yoshinari vd. 2016). Bu transporter, B eksikliğinde bitki yapraklarında B seviyelerini korumak için B'nin köklerden sürgünlere verimli bir şekilde yer değiştirmesi için çok önemlidir. Diğer taraftan yüksek B koşulları altında AtBOR1 proteini vakuollere istiflenir ve degrade edilir (Takano vd. 2010). *Arabidopsis thaliana*' da toplam 7 tane BOR geni tanımlanmıştır. Wakuta vd. (2015) yaptıkları filogenetik çalışmada BOR genlerini angiospermelerde farklı fizyolojik işleri içeren iki farklı dala (clade I ve II) ayırmıştır.

AtBOR1'in paraloglarından olan *AtBOR4*, toksik B koşullarında borun atılmasından sorumludur. Bu genin aşırı ifadelendiği transgenik *Arabidopsis* bitkileri, WT mayanın dayanamadığı bor dozunda (10 mM borik asit) gelişimini sürdürebilmiştir (Miwa vd. 2007).

Arabidopsis'te *BOR2* geninin bor yetersizliğinde görev almasına karşın, *AtBOR2* ortologlarından *HvBOR2* (Reid 2007; Sutton vd. 2007) ve *TaBOR2* (Reid 2007) bor toksisitesine toleransta görev almaktadır. Bor atım genleri bazı bitkilerde tanımlanmıştır ancak yüksek derecede bora dayanıklı olan, *Gypsophila perfoliata* L. gibi bitkilerde tanımlanmamıştır.

Gypsophila perfoliata L., Caryophyllaceae ailesine ait, Türkiye'de helvacıçöveni olarak tanınan ve bor madenleri çevresinde yüksek bora adaptasyon göstererek yaşamını sürdürebilen hiperakümülatör bir bitkidir (Babaoğlu vd. 2004).

Şimdiye kadar *G. perfoliata*'da sınırlı sayıda çalışmalar yapılmış olup, bor toksisitesine toleransta hangi genlerin sorumlu olduğu Ünver vd. (2008), Akbudak vd. (2024) tarafından yapılan çalışmalarda bazı genlerin tespiti ile ortaya konulmuştur. Ancak bu iki çalışmada da bulunan genler yaprak dokusundan elde edilmiş ve doğrudan bor atımıyla ilişkilendirilmiş genler değildir. Bu tez çalışmasında borun kökten dışa atımından sorumlu genler araştırılarak literatürdeki bu boşluğun doldurulması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda *G. perfoliata* cDNA kütüphanesinde bor atımı ile ilgili genlerin araştırılması için maya fonksiyonel tarama testi kullanılmıştır.

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*), genomik manipülasyona açık olması ve ökaryotik bir canlı olmasından dolayı hücre biyolojik süreçlerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan model bir organizmadır (Buser 2010). *Saccharomyces cerevisiae*'in model organizma olarak avantajları arasında, hücre sayısının 30 °C'de 1.25–2 saatte iki katına çıkma özelliği, kültürlenmesinin kolay olması, düşük maliyetle hızlı üretimi ve bakımı, genetik olarak manipüle edilebilir olması vardır. Ayrıca ökaryotik organizmalardan ilk genomu tamamen dizilenen canlıdır. Bir ökaryot olarak *S. cerevisiae*, bitkiler ve hayvanlarla benzer bir iç hücre yapısına sahiptir ve ekonomik olarak bitki çalışmalarında kullanılan en önemli mikroorganizmadır (Stewart, 2014).

Daha önce Kaya vd.(2009) mayanın yüksek bora toleransının büyük bir kısmından sorumlu olan genin *ATR1* olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu genin silinmesi sonucu (*atr1Δ*) bora karşı duyarlılığı artmıştır ve 50 mM'ın üzerindeki borik asitli ortamlarda büyümemiştir. Diğer taraftan bu genin aşırı ifadenmesi sonucu mayalar bora karşı tolerans göstermiştir ve 225 mM borik asit içeren ortamda hayatta kalabilmişlerdir. Aynı çalışmada Atr1-GFP füzyon proteinlerinin hücre zarında lokalize olduğunu ve bu yüzden borun hücre dışına atımında görev aldığını öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında BY4743 (MATa/ α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0) diploid mayanın *ATR1* geni silinmiş (*atr1Δ*) suşu kullanılmıştır. Bu sayede mayanın yüksek bora karşı kendi dayanıklılığı büyük ölçüde ortadan kaldırılarak maya fonksiyonel tarama testinde kullanımı amaçlanmıştır.

G. perfoliata, doğal olarak yüksek bor içeren topraklarda yetişebilme kapasitesiyle dikkat çeken ve yüksek seviyede bor toleransı sergileyen bir türdür. Bu özellik, bor taşınımı ve homeostazının düzenlenmesinde görev alan daha önce tanımlanmamış genlerin varlığına işaret etmektedir. Bu tez çalışmasında *G. perfoliata*'ya ait yeni bir BOR4-benzeri genin tanımlanması, fonksiyonel karakterizasyonunun yapılması ve bor toleransındaki rolünün hem maya hem de bitki model sistemlerinde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilgili genin mayada bor toleransına katkısı, hücre içi lokalizasyonu ve bor dışlama kapasitesi değerlendirilmiştir.

Ayrıca genin *Arabidopsis* model organizmasına aktarılmasıyla bitkide bor toleransına katkısı test edilmiştir. Böylece *G. perfoliata*'nın yüksek bor toleransını sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bor toksisitesine dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine yönelik gelecekteki çalışmalara temel oluşturabilecek yeni genetik kaynakların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.



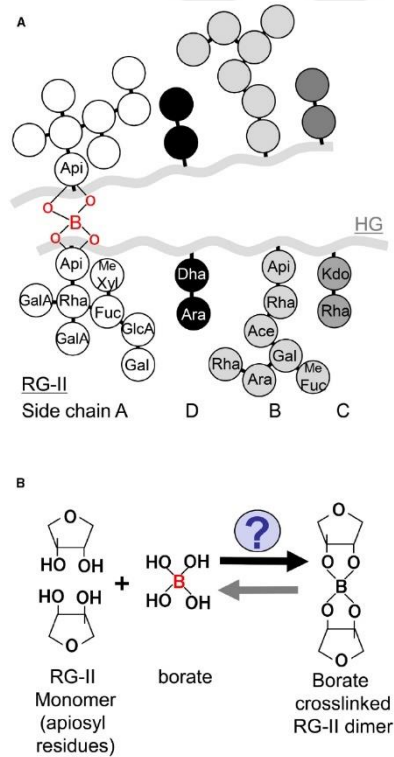
2. KAYNAK TARAMASI

2.1.Bor

Bor bitkiler için esansiyel mikro elementlerden biridir. Metal ve ametal özellikleri birlikte barındırdığı için silikon (Si), arsenik (As) ve germanyum (Ge) gibi metalloid olarak sınıflandırılır. Bor yeryüzünde elementel olarak bulunmaz, sıklıkla doğada oksijenle kombine olarak boratlardan biri olan boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), daha az sıklıkla borik asit (H_3BO_3) ve nadiren flor ile birlikte bulunan anyon (BF_4^-) formunda bulunur (Power ve Woods 1997; Princi vd. 2016).

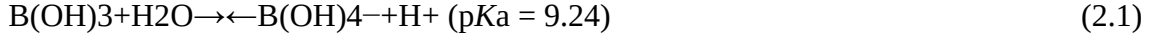
Borun en temel kaynağı turmalin ve volkanların uçucu emisyonlarıdır (Chesworth 1991). Bor bitkiler tarafından kolay alınamayan ve hava şartlarına dirençli olan borasilikat formunda bulunur. Kayalarda bulunan bu bor formu hareketsizdir ancak redoks, asit baz ve çökeltme-çözünme gibi kimyasal reaksiyonlar sonucu hareketli formuna ulaşır.

Bor toprakta birçok formda bulunmasına karşın bitkilerin kullanabildiği form borik asittir (Nable vd. 1997). Toprakta borik asit formunda alınan bor hücrede borata dönüşür. Borun hücredeki en önemli işlevi hücre duvarının yapısına katılmasıdır. Borat hücre duvarında rhamnogalacturonan II (RG-II) bölgesinde iki pektin arasında kovalent şekilde bağ oluşmasını sağlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. RG-II'nin yapısal modeli ve borat dimerizasyon reaksiyonu (Funakawa ve Miwa 2015)

Borik asit, borat anyonunu oluşturan zayıf bir Lewis asididir.



Hem borik asit hem de borat birçok farklı tip molekül ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Özellikle borik asit, riboz, apioz, mannitol, mannan ve polimannuronik asit gibi bir piranoid halka yerine bir furanoid içeren birçok şekere bağlanır (Goldbach 1997; Loomis ve Durst 1992; Princi vd. 2016). Bor hücrede birçok işleve sahiptir. Bor, karbonhidrat metabolizması ve şekerlerin taşınması, lignifikasyon ve hücre duvarı sentezi, plazma zarının bütünlüğünün korunması, nükleik asit metabolizmasının uyarılması, indolasetik asit metabolizması, askorbat-glutasyon döngüsü, fenolik bileşiklerin metabolizması, polen tüpü oluşumu, nitrojen metabolizması, fotosentez ve birçok enzimatik aktivitede görev almaktadır (Princi vd. 2016).

2.2. Borun Taşınımı

Bitkilerde mineral besin elementlerinin çoğu iyonik formda bulunur, ancak bor fizyolojik pH'da yüklü olmayan borik asit formunda bulunur. İyonik yükü bulunan besin maddelerinin hücre zarından geçişi zordur. Nötr bir molekül olan borik asit lipid zarlar aracılığıyla kolayca geçebilmektedir. Reid (2014), daha önce başka çalışmalarda ortaya konulan sonuçları tablolastırarak bazı maddelerin ve borik asitin dev characean alglerinin hücre membranlarından geçirilme oranlarını karşılaştırmıştır. Bu sonuçlara göre dev alg hücrelerinin borik asit için geçirgenliği Na^+ 'dan 10 kat, nötr ve küçük bir solit madde olan üreden ise 4 kat daha yüksektir (Reid 2014). Bor hücre içine üç yolla alınır ya da atılır. Bunlardan ilki hücre zarından lipid çift tabasından difüzyon ile gerçekleşmektedir. İkinci ise seçici veya seçici olmayan kanallar aracılığıyla pasif iki yönlü difüzyondur. Dordas ve Brown (2001), kabak köklerinde yaptıkları çalışmada kanalları bloke etmişler ve bor alımının %50 azaldığını göstermişlerdir (Dordas ve Brown 2001). Üçüncü yol ise aktif olarak yani enerji harcanarak atımıdır (Reid 2014).

Bitkiler boru topraktan borik asit formunda alır. Borik asit küçük ve yüksüz bir molekül olduğu için zarlar boyunca difüzyon ile geçer ancak bu durum yeterli borik asit varlığında gerçekleşir. Borik asitin sınırlı olduğu koşullarda bitkiler, borun taşınması için majör intrinsik protein (MIP) ailesinin borik asit kanallarını ve borun dışa atılmasını sağlayan borat atımından sorumlu BOR ailesine ait transporterları kullanır (Takano vd. 2008).

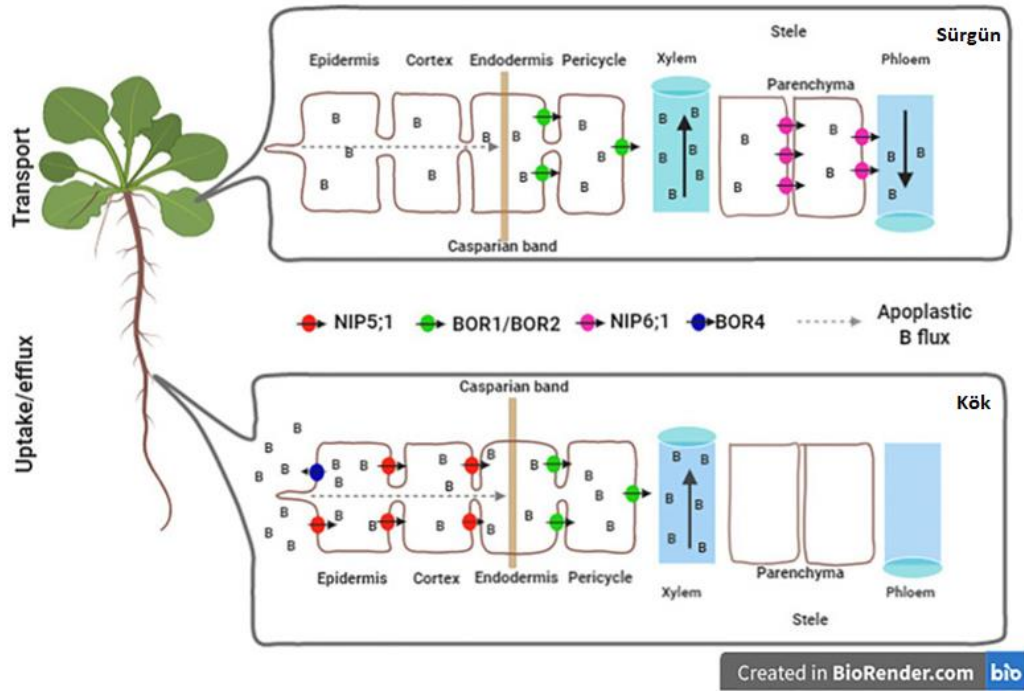
Major intrinsic protein (MIP) ailesi, küçük moleküllerin plazma membranından geçişini kolaylaştıran 5 alt aileden oluşur. Bunlar plazma zarı intrisik proteinleri (PIPs), tonoplast intrisik proteinleri (TIPs), küçük bazik intrisik proteinler (SIPs), X intrisik proteinleri (XIPs) ve nodulin-26 benzeri intrisik proteinlerdir (NIPs) (Maurel vd. 2015).

NIP genlerinden bazılarının Arabidopsis'te borik asit taşınımında sınırlı B koşullarında kritik rollerinin olduğunu gösterilmiştir. AtNIP5;1, borik asidin kök epidermisine etkin şekilde alınmasında (Takano vd. 2006), AtNIP6;1, gövde nodlarında floem bölgesinde ifade edilir ve genç yapraklara B taşınmasında (Tanaka vd. 2008) AtNIP7;1 ise anterdeki tapetum hücrelerinde çiçek gelişiminin belirli evrelerinde ifade edilir ve borik asit kanalı olarak işlev görür. Bu genin işlev kaybı, düşük B koşullarında

polen morfolojisinin bozulmasına ve polen çimlenme oranının düşmesine neden olmuştur (Routray vd. 2018).

Bitkilerdeki BOR'lar, insanlarda bikarbonat taşıyıcı ile ilgili protein HsBTR1 ile homolog olan ve sodyum-bağlı bir bikarbonat taşıyıcı alanı barındıran çözünen taşıyıcı (SLC4) ailesine aittir (Luo vd. 2019). BOR transporter genleri plazma membranına lokalize olan dışa akış taşıyıcıları olarak bilinen (efflux tipi borat taşıyıcıları) proteinleri kodlarlar. BOR gen ailesi, yapılan filogenetik analizlerde angiospermelerde farklı fizyolojik işleri içeren iki farklı dala (clade I ve II) ayrılmıştır. I. dalda *Arabidopsis thaliana* AtBOR1, AtBOR2 ve AtBOR3 yer alırken, II. dalda ise AtBOR4; B toksisitesine karşı koruma sağlar. Bu grupta ayrıca AtBOR5, AtBOR6 ve AtBOR7 bulunmaktadır (Wakuta vd. 2015).

Borun taşınımıyla ilgili şema Şekil 2.2'de verilmiştir (Pereira vd. 2021).



Şekil 2.2. Borun kök ve sürgün dokularında taşınımı (Pereira vd. 2021)

İlk tanımlanan bor transporterı olan AtBOR1 (Noguchi vd. 1997; Takano vd. 2002), hem meristematik hem de olgunlaşma bölgelerindeki epidermiste ve endodermiste ifade edilir (Yoshinari vd. 2016). Bu transporter, B eksikliğinde bitki yapraklarında B seviyelerini korumak için B'nin köklerden sürgünlere verimli bir şekilde yer değiştirmesi için çok önemlidir. Diğer taraftan yüksek B koşulları altında AtBOR1 proteini vakuollere istiflenir ve degrade edilir (Takano vd. 2010). Buna ek olarak yüksek bor seviyelerinde, B-bağımlı translasyonel düzenleme ile AtBOR1'in translasyonu azaltılır (Aibara vd. 2018). Miwa vd. (2006) BOR1'i aşırı ifade eden transgenik Arabidopsisleri bor noksanlığında yetiştirmişler ve yabani tip Arabidopsisler

tohum oluşturmazken, transgenik bitkilerde hem iyi bir sürgün büyümesi hem de tohum oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *BOR1*'in generatif organların gelişimindeki rolünü ortaya koymaktadır. Bir diğer taraftan Uraguchi vd. (2014), *P35S-AtBOR1* genini domatese aktararak düşük bor koşullarına dayanıklı domatesler elde etmişlerdir. Buna ek olarak *AtBOR1* ile ortolog olan birçok gen tanımlanmıştır: *O. sativa* (Nakagawa vd. 2007), *Vitis vinifera* (Pérez-Castro vd. 2012), *Triticum aestivum* (Leaunghthitikanhachana vd. 2013), *Citrus macrophylla* (Canon vd. 2013) ve *Z. mays* (Chatterjee vd. 2014). Kurt ve Aydın'ın (2020) yaptıkları in silico çalışmada patatest (Solanum tuberosum) beş *BOR1* transporterı tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Ayrıca foksiyonel *BOR1* homologları *Saccharomyces cerevisiae* (Takano vd. 2002), *Eucalyptus* sp. (Domingues vd. 2005) ve *Brassica napus*'da (Sun vd. 2012) tanımlanmıştır.

AtBOR2, *AtBOR1* ile yüksek oranda benzer, düşük bor koşullarında bor alımından sorumlu bir borat taşıyıcıdır. *BOR2*'nin *BOR1* den farkı, düşük bor koşullarında kökte hücre uzamasında görev almasıdır. *BOR1*'in ksileme bor yüklenmesinde, *BOR2*'nin ise B-sınırlı koşullar altında kök büyümesi ve hücre duvarlarında RG-II-B çapraz bağlanması için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir. *BOR1* ve *BOR2*'nin fizyolojik rollerinin farklı olmasının dokuya özgü olabileceği varsayılmıştır (Miwa vd. 2013). *AtBOR2* ortaloglarından *HvBOR2* (Reid, Rob 2007; Sutton vd. 2007) ve *TaBOR2* (Reid, Rob 2007), Arabidopsis *BOR2* geninden farklı olarak bor toksisitesine toleransta görev almaktadır.

AtBOR3, mayada bor taşınımına aracılık etmesine karşın Arabidopsis'te bu genin bozulması belirgin bir fenotip ortaya çıkarmamıştır. Ancak, Arabidopsis *bor1/bor2/bor3* üçlü mutantı, *bor1/bor2* mutantından daha fazla kök büyüme geriliği göstermiştir. Bu durumda, *AtBOR3* aktivitesinin *AtBOR1* ve *AtBOR2* ifadesindeki eksiklikleri telafi edebileceği hipotezi ile tutarlı bir sonuç olacağı düşünülmektedir. Bu yüzden *AtBOR3* borun kökten sürgüne iletiminde katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (Miwa, K vd. 2006; Parker ve Boron 2013). Ayrıca sürgün bekçi hücrelerinde, dikenlerde ve kök korteksinde (Miwa, K vd. 2006), ayrıca stigma ve yumurtalıklarda *AtBOR3* transkriptleri tespit edilmiştir (Winter vd. 2007).

AtBOR1'in paraloglarından olan *AtBOR4*, toksik B koşullarında borun atılmasından sorumludur. WT Arabidopsis için ölümcül doz olan 10 mM borik asit içeren ortamlarda homozigot *Pro35S-BOR4-GFP* hatları WT ile kıyaslandığında kök ve gövdesinin güçlü bir şekilde geliştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca 3 mM borik asit uygulanmış transgenik Arabidopsislerde WT'a kıyasla daha düşük bor konsantrasyonu bulunmuştur. Bu çalışmada transgenik hatlardaki *BOR4-GFP*'den gelen florasan ışımanın, *AtBOR1*'in aksine *AtBOR4*'ün kök epidermisinin distal tarafında lokalize olduğunu gösterilmiştir (Miwa vd. 2007). Kajikawa vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada transgenik çeltiklerde *AtBOR4-GFP* aşırı ekspresyonu, bora karşı tolerans sergilemiştir. Ancak bazı transgenik hatlarda beklenmedik şekilde bor toleransı düşük çıkmıştır. Bu durumun ise hatalı *AtBOR4*'ün kök epidermal hücrelerinin apikal membranında birikmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Miwa vd. (2014), endojen *AtBOR4*'ün fizyolojik rollerini ve gen ifade modelini tanımlamak için yaptıkları çalışmada, toksik bor şartlarında T-DNA insersiyonu ile oluşturulmuş *BOR4* mutant hatlar ile yabancı tip Arabidopsisler kıyaslanmıştır. Mutant

Arabidopsislerde sürgün büyümesinde azalma ve sürgünlerdeki bor konsantrasyonunda artış gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada ProBOR4-GUS transgenik bitkilerinde GUS boyaması baskın olarak kök meristeminde ve kökte olgun kısımların endodermisinde saptanmıştır. BOR4 mRNA seviyeleri 3 gün yüksek bora maruz kalan Arabidopsislerde 2 kat artmıştır. Ayrıca ProBOR4-GUS transgenik bitkilerde yapılan analizler, BOR4 geninin yüksek bor koşullarındaki gen indüksiyonunun 5' yan dizileri tarafından kontrol edildiğini göstermiştir.

AtBOR5, bor eksikliğiyle ilişkilendirilmiş bir genetik lokusta bulunmasına karşın bu genin bozulması bor ile ilgili fenotipik bir sonuç vermemiştir. Bununla birlikte mayada ifade edildiğinde bor akışına aracılık eder (Miwa, K vd. 2006). *AtBOR5* transkriptleri, bekçi hücreleri ve sepallerde yüksek oranda ifade gösterir (Winter vd. 2007) ve fidelerde nitrat yokluğunda yaklaşık sekiz kat upregüle edilerek yanıt oluşturduğu ortaya konulmuştur (Zimmermann vd. 2004).

Çeltikte ise dört BOR geni tespit edilmiştir; *OsBOR1* (Nakagawa vd. 2007), *OsBOR2*, *OsBOR3*, *OsBOR4* (Tanaka vd. 2013). Çeltikteki *OsBOR1* ve Arabidopsis *AtBOR1* ortolog genler olmasına karşın, *OsBOR2*, *AtBOR2*'nin doğrudan ortologu değildir (Parker ve Boron 2013). Nakagawa vd. (2007) tarafından, *AtBOR1* ile çok benzer olan *OsBOR1* tanımlanmasının ardından, bor taşınım mekanizmasındaki rolü araştırılmıştır. Bu çalışmada *OsBOR1* in bozulması B alınımlı ve ksileme yüklenmesini azaltmıştır. Ayrıca bu çalışmada heterolog olarak ifade edilen *OsBOR1*-GFP füzyon proteininin soğan epidermal hücrelerinde plazma membranında bulunduğu ortaya konulmuştur. *OsBOR1* promotörlü-β-glukuronidaz (GUS) transgenik pirinç bitkileri, stellerde en güçlü GUS aktivitesini gösterirken bor eksiliğine maruz kalınan gün sayısı arttıkça GUS aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Kajikawa vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada transgenik çeltiklerde *AtBOR4-GFP*'nin aşırı ekspresyonu, bora karşı toleransı sağlamıştır. Ancak bazı transgenik hatlarda beklenmedik şekilde bor toleransı düşük çıkmıştır. Bu durumun ise hatalı *AtBOR4*'ün kök epidermal hücrelerinin apikal membranında birikmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

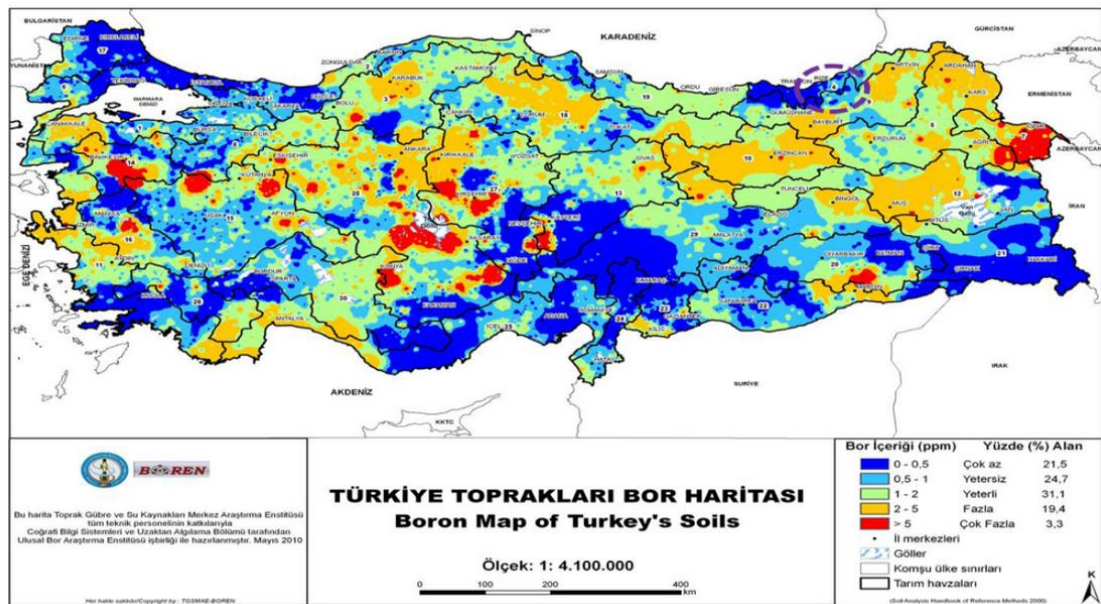
AtBOR gen ailesini yapısal, filogenetik, gen ekspresyonu ve protein etkileşimi analizlerini entegre ederek kapsamlı şekilde karakterize ettiğimiz daha önceki çalışmamızda (Colak ve Akbudak 2025), bu taşıyıcıların üç filogenetik gruba ayrıldığı ve aralarında belirgin işlevsel farklılaşmalar bulunduğu gösterilmektedir. *AtBOR1*, *AtBOR2* ve *AtBOR3*'ün çoğu dokuda sürekli veya orta düzeyde ifade edildiği ve temel bor homeostazisinin korunmasında rol oynadığı; buna karşılık *AtBOR4-AtBOR7*'nin düşük veya strese bağlı ekspresyon sergilediği ortaya konulmuştur. Özellikle *AtBOR3*'ün soğuk stresinde indüklenmesi, bor taşınımının abiyotik stres adaptasyonunda da önemli olabileceğini düşündürmektedir. Subselüler lokalizasyon ve protein etkileşim analizleri, BOR taşıyıcılarının plazma zarında konumlandığını ve vezikül taşınımı ile stres yanıtı mekanizmalarıyla ilişkilendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, *AtBOR* gen ailesinin bor toksisitesine yanıt kapasitesini bütüncül biçimde değerlendiren ilk sistematik yaklaşımlar arasında yer almakta ve bor

toleransı yüksek bitkilerin geliştirilmesine yönelik araştırmalara önemli temel bilgiler sağlamaktadır.

2.3. Bitkilerde Bor Toksisitesi

Bor bitkiler için esansiyel bir mikro element olmasına karşın, yüksek miktarda bor mevcudiyeti toksisiteye sebep olmaktadır. Yüksek B konsantrasyonları toprakta veya yeraltı sularında doğal olarak oluşabilir, diğer taraftan madencilik, gübreleme, sulama suyu ile dış kaynaklara bağlı olarak toprakta miktarı artabilir. Abreu vd. (2005) diğer çalışmalardaki bilgiler ile kendi araştırmalarını özetleyerek toprak bor konsantrasyonlarını ölçeklendirmiştir. Buna göre 0,0–0,2 ppm düşük, 0,21–0,6 ppm orta, 0,61–1,1 ppm yüksek, 1,2–3,0 ppm çok yüksek ve >3,0 ppm toksik toprak bor konsantrasyonlarını temsil eder. 0,5–2,0 ppm'nin ise optimum toprak bor aralığını temsil ettiği, bu değerlerden düşüklüğün ya da yüksekliğin ise bor yetersizliğini ya da toksisitesini temsil ettiği öne sürülmektedir (Sun vd. 2019). Bu kritik seviyeler toprak tipi, su durumu, pH, havanın nemi ve sıcaklığına, bitkinin dokusuna, türüne ve genotipine bağlı olarak değişiklik gösterir (Shorrocks 1997). Örneğin Mertens vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, arpa için kök büyümesini %10 azaltan, toksik etkiler gösteren bor konsantrasyonunun, pH, yapı ve organik madde yüzdesi olarak 22 farklı toprak arasında yaklaşık 10 kat değiştiği bulunmuştur.

Topraktaki aşırı bor miktarı Avustralya, ABD, Rusya, Türkiye, Meksika, İsrail, Irak, Mısır, Suriye, Fas, Ürdün, Libya, Hindistan, Pakistan, Malezya, Peru, Şili, Macaristan, Sırbistan ve İtalya gibi birçok ülkede rapor edilmiştir (Brdar-Jokanović 2020). Türkiye topraklarının bor durumunu ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmanın sonuçları derlenerek Boren tarafından Bor Haritası çıkarılmıştır (Şekil 2.3). Buna göre Türkiye topraklarının %19,4'ünde fazla, %3,3'ünde ise toksik seviyede bor bulundurduğu tespit edilmiştir (BOREN, 2010).



Şekil 2.3. Türkiye topraklarındaki bor konsantrasyonunu gösteren harita

Kurak ve yarı kurak bölgelerde görülen bor toksisitesi dünyanın bazı bölgelerinde tarımsal üretimi olumsuz etkileyerek verim kayıplarına neden olmaktadır. Bor toksisitesi bitkide, yaprakların uç ve yanlarında klorozis ile başlar ve bunu hızlı bir şekilde nekrozis izler. Birçok bitkide benzer semptomlar görülür (Shorrocks 1983). Bitkinin sürgün kısımlarında meydana gelen zararlara ek olarak, bor (B) toksisitesinin buğday, arpa ve mısır gibi başlıca tarım ürünlerinde kök büyümesini de etkilediği bildirilmiştir (Aquea vd. 2012; Choi vd. 2007; Esim vd. 2013).

Bor fazlalığının makroskobik yan etkileri, esas olarak B'nin neden olduğu üç temel metabolik etkiye dayandırılmaktadır. Bor, serbest şeker formundaki riboz'a ve RNA'nın bir bileşeni olarak riboz'a bağlanarak hücre bölünmesi ve gelişim sürecini aksatır. Bor, ATP veya NAD(P)H içerisindeki riboz'a bağlanarak temel metabolik süreçlere müdahale ederek birincil metabolizmanın engellenmesine neden olur. Bor fazlalığı sitoplazmik pH'ın düşmesine neden olarak proteinlerin üç boyutlu yapısını ve biyosentezini etkiler (Reid vd. 2004).

2.4. Bor Tolerans Mekanizması

Bor tolerans mekanizması temel olarak birkaç farklı yolla sağlanır. Bunlardan biri bitkilerin kök sistemleri aracılığıyla bor alımını azaltmak ve bor konsantrasyonu aşırı seviyede arttığında köklerden atımını sağlamaktır (Nable ve Paull 1990; Reid, Robert 2007).

Düşük bor koşullarında plazma membranının stele bakan kısmına lokalize olan AtBOR1, yüksek bor koşullarında vakuole yönlendirilerek 2 saat içinde parçalanır (Takano vd. 2010). Bu yüksek B koşuluna bağlı vakuoler hedefleme için K590 pozisyonunda gerçekleşen ubiquitinilasyonun gerektiği Kasai vd. (2011) tarafından bildirilmiştir. Yapılan mutasyon analizleri, AtBOR1 proteininin tirozin bazlı (YxxΦ) ve asidik di-lösin içeren motiflerinin, hem hücre zarında kutuplanmış şekilde yerleşmesi hem de yüksek bor düzeylerinde vakuole taşınması süreçlerinde kritik rol oynadığını göstermiştir (Takano ve ark. 2010; Wakuta ve ark. 2015). Ayrıca, yüksek bor koşulunda BOR1'in 5' UTR bölgesinde bulunan upstream ORF'lerin transkripsiyonel baskılamaya sebep oldukları bulunmuştur. Bu baskılamayı indükleyen ortam veya doku bor konsantrasyonunun, AtBOR1 protein yıkımını başlatan konsantrasyondan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, AtBOR1 proteininin hiç ihtiyaç duyulmadığı daha yüksek B düzeylerinde sentezinin de baskılandığını düşündürmektedir (Aibara vd. 2018).

Diğer taraftan AtNIP5;1 mRNA'sının yıkımı, yüksek bor (B) koşullarında artış gösterir ve bu baskılanmanın, 5'-UTR aracılığıyla gerçekleştiği bulunmuştur (Takano vd. 2006; Tanaka vd. 2011). Yüksek bor düzeylerinde, AtNIP5;1 mRNA'sının 5'-UTR bölgesinde bulunan AUGUAA dizisi, ribozomun durmasına (stalling) neden olmakta ve bu duraklama, ribozomun 5' ucunda mRNA'nın parçalanmasını kolaylaştıran bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir (Tanaka vd. 2016). AtNIP5;1 geninden 5'-UTR dizisinin çıkarılması, yüksek B ortamında bitkilerde aşırı bor birikimine ve bor toksisitesine karşı duyarlılığın artmasına yol açmıştır (Tanaka vd. 2011). Bu bulgular, bor düzeyine bağlı olarak gerçekleşen post-transkripsiyonel düzenlemenin, bitkinin yüksek bor koşullarına karşı adaptasyonunda koruyucu bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Onuh ve Miwa 2021).

Bununla birlikte *AtBOR4*, yüksek bor varlığında plazma membranının distal kısmında birikerek, borun dışı atımında görev alır (Miwa vd. 2007). *AtBOR4*'ün yüksek bor koşullarında ekspresyon göstermesi, bu proteinin, *AtBOR1*'de bor-bağımlı vakuole yönlendirme için gerekli olan ubiquitinilasyona hedef K590 lizin kalıntısına sahip olmamasıyla (Kasai vd. 2011) ve 5'-UTR bölgesinde bor-bağımlı translasyonel baskılamada görevli upstream açık okuma çerçevelerinin (uORF) bulunmamasıyla tutarlı bulunmuştur (Aibara vd. 2018).

Bir diğer tolerans mekanizmalarından biri de boru bağlayan polialkoller ve fenolik bileşiklerin biyosentezini arttırarak gerçekleşir (Lewis 2019; Papadakis vd. 2018). Örneğin mannitol ve sorbitol gibi şeker alkoller, borik asitle cis-hidroksil grupları aracılığıyla bağlanarak inert poli-B kompleksleri oluşturur ve bu sayede bitkilerde bor toksisitesini azaltır (Coskun vd. 2014; Tanaka ve Fujiwara 2008). Coşkun vd. (2014) yaptığı çalışmada, mannitol uygulaması, buğday fidelerinde yaprak bor düzeyini düşürmüştü ancak B-alkol kompleksleri doğrudan tespit edilememiştir. Poliol sentezi yüksek düzeyde olan bitkilerde, borun floem aracılığıyla taşınarak hassas dokulardan uzaklaştırıldığı ve bu şekilde bor toksisitesinin hafifletildiği belirtilmiştir (Papadakis vd. 2018).

Bazı bitki türlerinde yüksek antosiyanin seviyeleri, aşırı bor koşullarına karşı geliştirilmiş tolerans ile bağlantılıdır. Örneğin, mor yapraklı fesleğen çeşitlerinin yeşil yapraklı olanlara göre daha az duyarlı olduğu bulunmuştur (Landi vd. 2013). Bu toleransın, antosiyaninlerin bor iyonlarını şelatlaması ve hücre vakuollerinde depolamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bor ile doğrudan şelasyon mekanizması henüz deneysel olarak kanıtlanmamıştır. Bununla birlikte, dışarıdan uygulanan antosiyaninlerin bor toksisitesini azaltıcı etkiler gösterdiği gözlenmiştir (Landi vd. 2014).

Bir diğer tolerans mekanizması ise yüksek seviyedeki borun tetiklediği oksidatif stres durumunda antioksidan sistemi güçlendirilerek stresin etkisi ile başa çıkmaya çalışmaktadır (Landi vd. 2012). Fazla bor (B) alımı, süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini artırarak hücresel düzeyde oksidatif hasara neden olabilir. Bitkiler, bu zararlı etkileri azaltmak için enzimatik (SOD, CAT, APX, POX, GR) ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri aktive eder. Bor stresi altında bazı element uygulamalarının antioksidan savunma mekanizmasını pozitif yönde düzenleyerek stres etkilerini azalttığı yapılan bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur. Yüksek bor koşullarında, kalsiyum (Ca), silisyum (Si), çinko (Zn) ve fosfor (P) gibi elementlerin süperoksit dismutaz (SOD) üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Hua vd. 2021).

Bazı bitkiler tarafından doğal olarak da üretilen dışarıdan uygulanan kimyasal bileşiklerin, reaktif oksijen türlerini (ROS) etkisiz hale getirerek bor (B) toksisitesini azaltabildiği gösterilmiştir. Özellikle salisilik asit (SA), nitrik oksit (NO) ve metil jasmonat (MeJA) gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin, bor stresine karşı bitkilerde antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek toleransı artırdığı belirlenmiştir. SA'nın havuç, ıspanak, arpa ve buğdayda antioksidan enzimleri düzenlediği; NO ve MeJA'nın ise benzer şekilde yüksek bor koşullarında koruyucu etki

gösterdiği, çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Aftab vd. 2011; Aftab vd. 2012; Eraslan vd. 2007; Kaya vd. 2019).

Bir diğer yol ise borun vakuol (Wakuta vd. 2016) ya da hücre duvarı (Papadakis vd. 2018) gibi hücre içinde daha az zararlı olan bölgelerde tutulmasını sağlayarak toksik bor seviyelerini hafifletilerek bitkinin toleransı sağlanır (Landi vd. 2019).

Yüksek bor uygulamasının terlemeyi ve su taşınımını azalttığı gösterilmiştir (Macho-Rivero vd. 2018); bu da B toksisitesine karşı bir yanıt olabilir.

2.5. Maya ve Bor

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*), genomik manipülasyona açık olması ve tek hücreli ökaryotik bir canlı olmasından dolayı hücre biyolojik süreçlerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan model bir organizmadır (Buser 2010). *S. cerevisiae*'nin model organizma olarak avantajları arasında, hücre sayısının 30 °C'de 1.25–2 saatte iki katına çıkma özelliği, kültürlenmesinin kolay olması, düşük maliyetle hızlı üretimi ve bakımı, genetik olarak manipüle edilebilir olması vardır. Ayrıca ökaryotik organizmalardan ilk genomu tamamen dizilenen canlıdır. Bir ökaryot olarak *S. cerevisiae*, bitkiler ve hayvanlarla benzer bir iç hücre yapısına sahiptir ve ekonomik olarak bitki çalışmalarında kullanılan en önemli mikroorganizmadır (Stewart 2014).

YNL275w (*Sc-BOR1*), *AtBOR1* geninin *S. cerevisiae*'deki tek homologudur. Daha önce Zhao ve Reithmeiner (2001) tarafından plazma membranına lokalize olan bir anyon transportörü olarak tanımlanmıştır. *ScBOR1* geninin ürünü olan Bor1p proteini bir bor exportıdır (Takano vd. 2002).

Nowaza vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, borun hücre içi ve dışı taşınımında görev alan potansiyel taşıyıcıların *S. cerevisiae* model organizması kullanılarak fonksiyonel analizleri yapılmıştır. Bu kapsamda özellikle *BOR1*, *DUR3* ve *FPS1* genlerinin bor taşınımındaki rolleri detaylı şekilde incelenmiştir. Çalışmada, bu genleri taşıyan mutant maya suşları kullanılarak bor stresine karşı dayanıklılık testleri yapılmış; taşıyıcı proteinlerin borun hücre dışına atılmasında veya hücreye girişinin düzenlenmesinde nasıl işlev gördükleri değerlendirilmiştir. *BOR1* geninin, borun toksik seviyelerde hücre dışına atılmasını sağlayarak maya hücrelerini yüksek bor konsantrasyonlarına karşı koruduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, *DUR3* ve *FPS1* genlerinin de bor taşınımında doğrudan veya dolaylı roller üstlendiği, özellikle *FPS1*'in borun gliserol ile taşınmasında etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu bulgular, bor taşıma mekanizmalarının karmaşıklığını ortaya koyarken, aynı zamanda bor toleransına sahip bitkilerin geliştirilmesinde hedef alınabilecek genetik yolları anlamaya da katkı sağlamaktadır.

Takano vd. (2007) *Scbor1* geninin silindiği mutantların (*bor1Δ*), hücre içinde daha yüksek miktarda bor biriktirdiğini ve daha düşük bor dışı atım hızına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. *bor1Δ*, yüksek bor konsantrasyonlarında wild type mayaya karşı daha hassas bulunmuştur. Her iki maya suşunun da büyüme hızı bor miktarıyla ters orantılı bulunmuştur. Ayrıca BOR1-GFP vektörünü taşıyan mayalarda konfokal mikroskop ile florasan ışıma plazma membranında tespit edilmiştir. Bu da

Bor1p'nin hücre zarında görev yapan bir bor dışı atım taşıyıcısı olduğunu ortaya koymaktadır.

Daha önce Kaya vd. (2009) mayanın yüksek bora toleransının büyük bir kısmından sorumlu olan genin ATR1 olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu genin silinmesi sonucu (*atr1Δ*) bora karşı duyarlılığı artmıştır ve 50 mM'ın üzerindeki borik asitli ortamlarda büyümemiştir. Diğer taraftan bu genin aşırı ifadenmesi sonucu mayalar bora karşı tolerans göstermiştir ve 225 mM borik asit içeren ortamda hayatta kalabilmişlerdir. Aynı çalışmada Atr1-GFP füzyon proteinlerinin hücre zarında lokalize olduğunu ve bu yüzden borun hücre dışına atımında görev aldığını öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında BY4743 (MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0) diploid mayanın ATR1 geni silinmiş (*atr1Δ*) suşu kullanılmıştır. Bu sayede mayanın yüksek bora karşı kendi dayanıklılığı büyük ölçüde ortadan kaldırılarak maya fonksiyonel tarama testinde kullanımı amaçlanmıştır.

2.6. *Gypsophila perfoliata* L.

Gypsophila perfoliata L., Caryophyllaceae ailesine ait (Şekil 2.4), tuzlu topraklarda, steplerde, yamaçlarda ve tarım alanlarında yetişebilen 30–120 cm boyunda çok yıllık bir türdür ve rizomları aracılığıyla yenilenip çoğalmaktadır (Huber-Morath 1967).

Alem (Kingdom): Plantae
Bölüm (Phylum): Streptophyta
Sınıf (Class): Equisetopsida
Alt sınıf (Subclass): Magnoliidae
Takım (Order): Caryophyllales
Familya (Family): Caryophyllaceae
Cins (Genus): *Gypsophila*
Tür (Species): *Gypsophila perfoliata* L.

Şekil 2.4. *Gypsophila perfoliata* L.'nin taksonomik sınıflandırması

Bor madenleri çevresinde yaşamını sürdürebilen *G. perfoliata*, 8900 mg kg⁻¹ (erişilebilir bor miktarı=277 mg kg⁻¹) bor içeren toprakta hayatta kalabilen türlerden biridir. Bor maden arazisinde yetişebilen *G. perfoliata*'nın yapılan ICP-AES sonucuna göre yapraklarında 1490 ± 172 mg·kg⁻¹, köklerinde ise 57 ± 16 mg·kg⁻¹ (kuru madde) bor biriktirdikleri gösterilmiştir (Babaoğlu vd. 2004).

Baker (1981)'e göre hiperakümülatör bitkiler, belirli elementleri toksik seviyelere ulaşmasına rağmen bünyelerine alıp özellikle yaprak dokularında yüksek miktarlarda biriktirebilen ve fizyolojik zarar göstermeyen türlerdir. Bu yüzden, doğal

olarak yüksek bor içeren topraklarda yetişmesine ve yapraklarında 1,000 mg/kg'ın üzerinde bor biriktirmesine rağmen normal gelişimini sürdürebilmesi, *G. perfoliata*'nın bor için bir hiperakümülatör tür olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Babaoğlu vd. 2004; Baker 1981). Şekil 2.5'te *G. perfoliata* L.'ya ait görsel bulunmaktadır (<https://www.inaturalist.org/photos/507239957>, Vladimir Yu. Arkhipov, iNaturalist, Fotoğraf ID: 507239957, CC BY-NC 4.0).



Şekil 2.5. *Gypsophila perfoliata* L.'nın doğal ortamda yayılışı (Vladimir Yu. Arkhipov, iNaturalist, Fotoğraf ID: 507239957, CC BY-NC 4.0 lisansı kapsamında kullanılmıştır)

Türe ve Bell (2004) Kırka bor madeninin kenarından artan mesafede üç farklı bölge belirleyerek bitki örtülerini tespit etmişlerdir. Buna göre en düşük B konsantrasyonuna sahip bölge (0.1–2 mg/kg) 84 tür ile en yüksek çeşitliliğe sahipken, orta düzey B seviyelerine sahip ara bölgede ise 28 tür bulunmuştur. En yüksek B konsantrasyonuna (35 mg/kg) sahip bölgede ise sadece *Catapodium rigidum* (L.) C. E. Hubbard ex Dony subsp. *rigidum* var. *rigidum* (Poaceae) ve *Gypsophylla perfoliata* L. var. *perfoliata* (Caryophyllaceae)'nın kabul edilen toksik seviyelerin üzerindeki B seviyelerine direnç göstererek gelişme ve yayılma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre bu iki türün genetik olarak kontrol edilen bir bor dışlama mekanizmasına sahip olabileceği vurgulanmıştır.

G. perfoliata ile yapılan genetik çalışmalar çok kısıtlı olmakla birlikte bor toleransında görev alan genlerin ortaya konulduğu bazı çalışmalar mevcuttur. Ünver vd. yaptıkları çalışmada (2008) bor (B) toksisitesine yanıt olarak yapraklarda farklı biçimde ifade edilen genlerin tespitini hedeflenmişlerdir. Bu amaçla doğal ortamından topladıkları *G. perfoliata*'nın MS ortamında taşınımını sağlamış ve 2

haftalık Hoagland çözeltisindeki alıştırma sürecinden sonra normal 30 μM ve yüksek 500 μM (35 mg/kg) ile 1000 μM (70 mg/kg) bor uygulanmıştır. Yaprak örneklerinden differential display PCR (DDRT-PCR) yapılarak 30 bant klonlanmış ve dizilenmiştir. 18 bant ise qRT-PCR yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, yüksek bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan *G. perfoliata* yapraklarında bazı genlerin farklı biçimlerde eksprese olduğu belirlenmiş ve bu genlerin bor tolerans mekanizmasında rol oynayabilecek aday genler olabileceği ortaya konulmuştur.

Akbudak vd. (2024) yaptıkları çalışmada *G. perfoliata*'nın yaprak cDNA kütüphanesinden maya fonksiyonel tarama deneyi ile 80 mM borik asit içeren ortamda dayanıklı 10 adet koloni olduğunu tespit etmişlerdir. Bu mayalardan dayanıklıktan sorumlu olduğu düşünülen cDNA izole edildiğinde benzer dizilere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında *GpEF1A* geni tanımlanmıştır. RT-qPCR sonuçlarına göre B stresi altında gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmesi bu genin bor toleransında görev aldığını göstermektedir.

G. perfoliata'nın bor toksisitesine karşı gösterdiği tolerans, yalnızca ait olduğu Caryophyllaceae ailesinin üyelerinin değil, aynı zamanda dikotil bitkilerin de dayanabildiği bor dozlarının ötesine geçmektedir. Bu olağanüstü tolerans düzeyi, *G. perfoliata*'nın bor stresine karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenmesini önemli kılmaktadır. Özellikle bor taşıyıcı (transporter) genlerin tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik yapılacak moleküler çalışmalar hem bitki fizyolojisinin anlaşılması hem de tarımsal uygulamalar açısından büyük potansiyele sahiptir. Bu sayede, bor toksisitesinin yaygın olduğu topraklarda yetiştirilmeye uygun, bor toleransı artırılmış yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesi mümkün olabilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Gypsophila perfoliata L. Eti Maden Kırka Bor İşletmeleri Müdürlüğü arazisinden (Kırka/Eskişehir) izin alınarak toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Gypsophila perfoliata* L. tohumlarının toplandığı Eti Maden Kırka Bor madeni sahası

Bu tez çalışmasında, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Transformasyon Laboratuvarı'nda (Akdeniz Üniversitesi, Antalya) daha önceden oluşturulmuş *G. perfoliata* cDNA kütüphanesi kullanılmıştır. cDNA kütüphanesinin hazırlanması amacıyla *G. perfoliata*, MS besiyerinde çimlendirilip yaklaşık 2 ay sonra belli bir büyüklüğe geldiğinde ½ Hoagland içeren hidroponik ortama aktarılmıştır. 4 hafta aklimatizasyon sürecinden sonra *G. perfoliata*'nın besin solüsyonu 500 mg/l bor içeren ½ Hoagland (pH:5.8) ile değiştirilmiştir (Bor dozu TÜBİTAK- 215Z086 nolu 1001 projesinde belirlenmiştir). Bitkiler 6 saat bor uygulamasının ardından hasat edilerek RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lardan CloneMiner II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, ABD) protokolüne göre cDNA oluşturulmuştur. Oluşturulan cDNA'lar Gateway klonlama (Hartley vd. 2000) yöntemi ile maya ekspresyon vektörüne (pAG426GPD-ccdb, Addgene plasmid # 14156) aktarılmıştır.

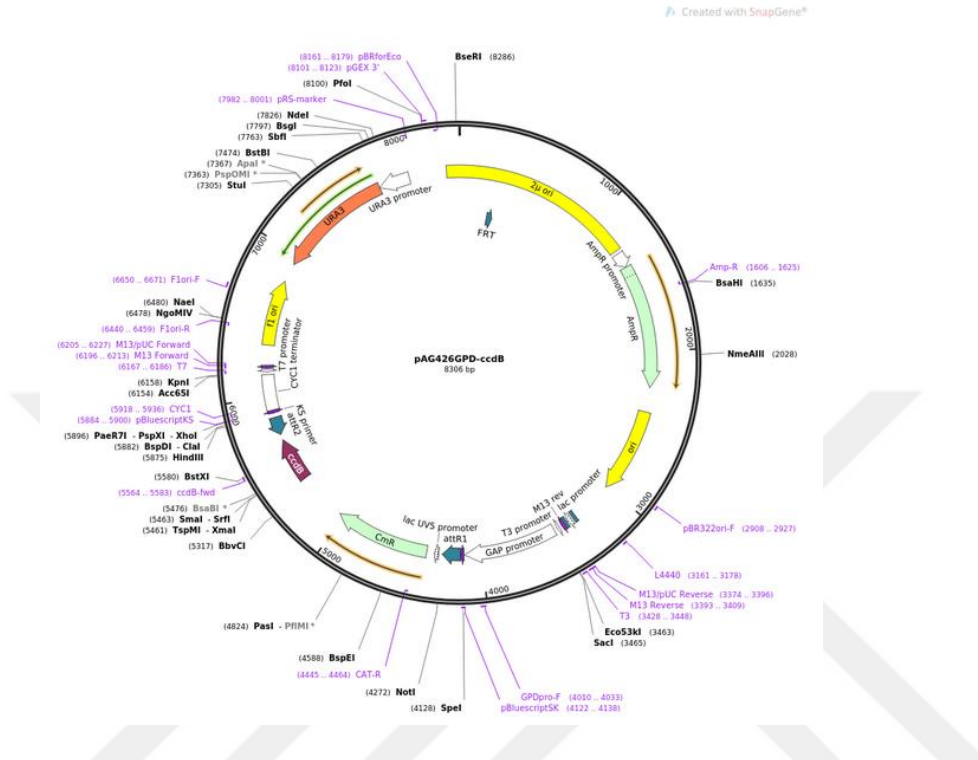
Kütüphane tarama çalışması ve mayada yapılan tüm deneylerde *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 Δ atr1(MATa/ α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 LYS2/lys2 Δ 0 met15 Δ 0/MET15 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0) ırkı kullanılmıştır.

Bitkide *GpBOR4* geninin fonksiyonunu ortaya koymak amacıyla SALK enstitüsünden temin edilen T-DNA insersiyon mutanlığı olan *Atbor4* (SALK_133793) ve laboratuvarımızda mevcut bulunan WT (Yabanıl ırk: Columbia-0) *Arabidopsis thaliana* tohumları kullanılmıştır.

3.2. Maya Fonksiyonel Tarama Testi için Toksik Bor Dozunun Belirlenmesi

Kütüphane tarama çalışmalarında kontrol olarak kullanmak amacıyla cDNA içermeyen pAG426GPD-ccdb (Addgene plasmid # 14156, Şekil 3.2) maya ekspresyon vektörü BY4743 Δ atr1 mayaya LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü (Gietz ve Schiestl, 2007) ile tranforme edilmiştir. pAG426GPD-ccdb vektörü cDNA içermediği için boş vektör anlamında Empty Vector'ün kısaltması olarak ilgili yerlerde EV olarak bahsedilmiştir. EV içeren maya (BY4743 Δ atr1) ise tezin bazı bölümlerinde wild type'ın kısaltması olarak WT maya olarak geçmektedir.

Oksotrofik bir maya olan BY4743 *Δatr1*, seçici olarak urasil içermeyen YNB-Ura ortamında büyütülebilmesi için pAG426GPD-ccdb vektörü üzerinde bulunan urasil genine ihtiyaç vardır. Bu sayede sadece vektörün transformasyonu başarılı olan mayalar urasil içermeyen YNB ortamında hayatta kalabilir.



Şekil 3.2. pAG426GPD-ccdb vektörü haritası (EV)

LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolüne göre bir gün önceden -80 °C ultra derin dondurucudan çıkarılarak katı YPD ortamına çizilen BY4743 *Δatr1* maya 3 gün süreyle 30°C etüvde büyütülmüştür.

Tek bir koloni öze ile alınarak 5 ml sıvı YPD ortamına inoküle edilerek gece boyunca 200 rpm'de 30°C çalkalanmıştır. 2 gece boyunca büyütülen hücrelerden 100 µl alınarak spektrofotometre küvetine konulmuş ve üzerine 900 µl dH₂O eklenerek AccuSkan GO spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı ile 600 nm'de OD değeri ölçülerek hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Önceden ısıtılmış erlen içindeki 50 ml 2XYPD' ye OD= 0.2 olacak şekilde hücre eklenmiştir. 30 °C'de ve 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 4 saat büyütülen hücrelerin OD değeri 1.2 olduğunda inkübasyon sonlandırılmış ve hücreleri yıkama işlemine geçilmiştir. Hücreler 5 dakika boyunca 3.000 g'de santrifüjlenerek çöktürülmüş ve pelletler 25 ml steril su ile tekrar çözündürülmüştür. Hücreleri çöktürmek için 20 °C'de 5 dakika boyunca 3.000 g'de santrifüj yapılmıştır. Oluşan pellet 25 ml steril su ile tekrar çözündürülmüş ve 5 dakika 3.000 g'de santrifüj yapılmıştır. Son olarak hücreler 1 ml steril dH₂O ile süspanse edilerek 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 13.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılarak süpernatant atılmıştır. Oluşan pellet 1 ml steril dH₂O içinde yeniden çözündürülerek her bir transformasyon için 100 µl hücre 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 13.000 g'de 30 saniye boyunca santrifüjlenen hücrelerden süpernatant

uzaklaştırılmıştır. Aynı zamanda taşıyıcı DNA (carrier DNA) kaynar su banyosunda 5 dakika boyunca denatüre edilmiş ve hemen buz üzerinde soğutulmuştur. Tablo 3.1'e göre hazırlanan karışım her bir transformasyon tüpüne 360 µl eklenmiş ve iyice vortekslenerek hücreler yeniden süspanse edilmiştir.

Çizelge 3.1. LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü reaksiyon bileşenleri

Transformasyon karışımı	µl
PEG 3350 (50% (w/v))	240
LiAc 1.0 M	36
Tek zincirli taşıyıcı DNA (2.0 mg.ml ⁻¹)	50
Plasmid DNA + steril dH ₂ O	34
Toplam hacim	360

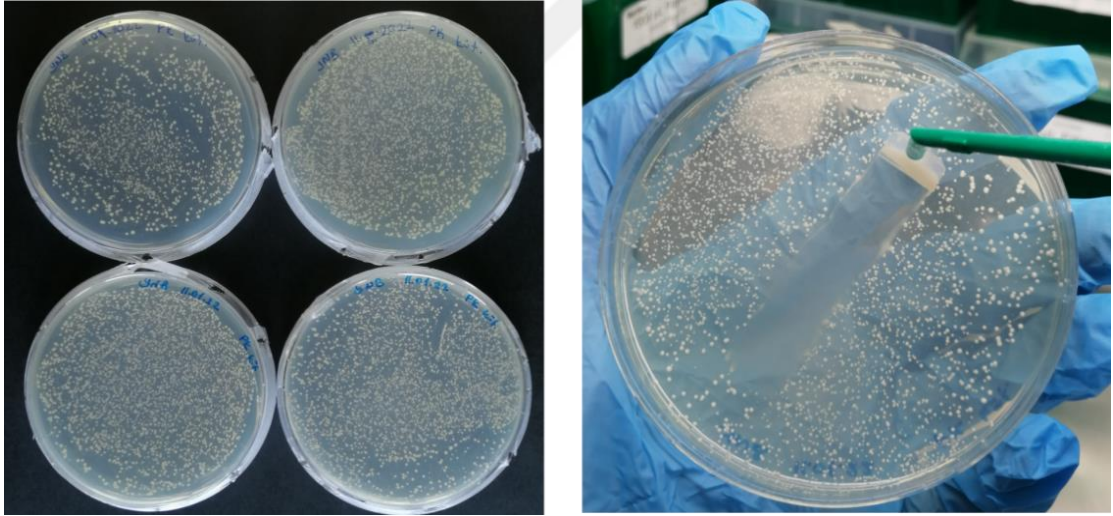
Tüpler 42°C su banyosuna yerleştirilerek 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Transformasyon tüpleri 30 saniye boyunca 13.000 g'de santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Transformasyon tüpüne 1 ml steril dH₂O eklenerek hücre peletleri steril bir pipet ucuyla karıştırılmıştır. Ardından peleti süspanse etmek için karışım vortekslenmiştir. Süspanse hücreler YNB CSM-Ura (7 g/L YNB, 0.8 g/L CSM-Ura, 24 g/L agar, %2 glikoz) ve YPD (10 g/L yeast extract, 20 g/L pepton, 24 g/L agar, %2 glikoz) besiyerlerine 200 µl olacak şekilde yayılmıştır. Aynı işlemler plazmit konulmamış negatif kontrol için de uygulanmıştır.

BY4743 maya için de transformasyon işlemi yukarıda bahsedildiği şekilde uygulanmıştır. 3 gün 30 °C etüvde büyüyen mayalardan 5 ml sıvı YNB ortamına kültür alınarak 1 gece çalkalayıcıda büyütülmüştür. BY4743(EV) ve BY4743Δ*atr1*(EV) mayaların için artan dozlarda borik asit (0, 50, 60,70, 80, 100 mM H₃BO₃) içeren YNB CSM-Ura besiyerlerine seri dilüsyon (2x10⁻¹, 2x10⁻², 2x10⁻³, 2x10⁻⁴) yapılarak büyümenin tamamen durduğu toksik doz belirlenmiştir.

3.3. *Gypsophila perfoliata* cDNA Kütüphanesinin Mayaya (BY4743Δ*atr1*) Aktarılması ve Maya Fonksiyonel Tarama Testi

Çalışma kapsamında *G. perfoliata* 'ya 500 mg/kg bor uygulanarak hazırlanmış mevcut cDNA kütüphanesi kullanılmıştır. Bora karşı hassas bir suş olan *S. cerevisiae* BY4743Δ*atr1* mayaya, kütüphane elektroporasyon (Benatuil ve ark, 2010) yoluyla transforme edilmiştir. Bunun için öncelikle BY4743Δ*atr1* maya YPD agar besiyerine çizilerek 3 gün 30 °C inkübe edilmiştir. Çıkan kolonilerden birisi steril özeye alınarak 5 ml YPD besiyerine inoküle edilmiştir ve gece boyu 225 rpm, 30 °C'de büyütülmüştür. Ertesi gün elde edilen kültürden 100 mL YPD sıvı besiyerine OD₆₀₀=0.3 olacak şekilde seyreltilmiştir. Kültür yaklaşık 5 saat 30°C, 225 rpm'de OD₆₀₀=1.2 olana kadar büyütülmüştür. Hücreler 3000 rpm, 3 dakika santrifüj yapılarak toplanmış ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Hücreler soğuk 50 ml dH₂O ile iki kez

yıkılmış, ardından 50 ml elektroporasyon tamponuyla (1 M Sorbitol / 1 mM CaCl₂) yıkılmıştır. Her yıkama aşamasından sonra santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelete 20 mL 0.1 M LiAc/10 mM DTT solüsyonu eklenerek yeniden süspanse hale getirilmiştir ve 225 rpm, 30 dk. 30 °C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler santrifüjle toplanarak 50 ml soğuk elektroporasyon tamponu ile yıkanarak santrifüj yapılmıştır. Hücre peleti 100-200 µl elektroporasyon tamponu ile son hacim 1 ml olacak şekilde çözündürülmüştür. Önceden buz üzerinde soğutulmuş her bir BioRad GenePulser küvete (0.2 cm elektrot boşluklu) 400 µl hücre konulmuştur. Deney boyunca küvetler buz üzerinde tutulmuştur. *G. perfoliata* kök kütüphanesinden 1 µg olacak şekilde her bir küvete plasmid eklenmiştir. Negatif kontrole plasmid eklenmemiştir. Hücreler ve plasmidin karışması için küvetlere nazikçe vurularak elektroporasyon yapıldıktan sonra 5 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Küvetler BioRad GenePulser cihazında 2.5 kV and 25 uF elektroporasyona tabi tutulmuştur. Küvetteki hücreler hızlı bir şekilde 8 mL 1:1 (1 M sorbitol: YPD) hazırlanan solüsyona aktararak 225 rpm, 30 °C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüj yapılarak toplanmış ve ardından steril dH₂O ile 1 ml’ ye tamamlanarak çözündürülmüştür. YNB CSM-Ura petrilere 10 ve 100 kat seyreltilen hücreler spreader yardımıyla yayılmıştır. Toplam 10 petriye *G. perfoliata* Kök kütüphanesi yayılmıştır. Petriler 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda YPD ortamına da hücreler yayılarak canlılıkları test edilmiştir. YNB(-Ura) besiyerlerinde çıkan kolonilerin tamamı sıyrılarak sıvı YNB(-Ura) ortamına aktarılmış ve çözündürülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Elektroporasyon sonrası 30°C’de 3 gün inkübasyona bırakılan *G. perfoliata* Kök cDNA kütüphanesi aktarılmış BY4743 *atr1* mayaların petrilere toplanması

WT mayalar için toksik doz 55 mM borik asit olarak belirlenmiştir ancak kütüphane taraması 80 mM borik asit içeren besiyerlerinde yapılmıştır. 10 adet 80 mM borik asit içeren YNB (-Ura) ortamlarına *atr1Δ* *G. perfoliata* kök kütüphanesi ve kontrol olarak WT maya yayılmıştır. Borik asit içermeyen YNB (-Ura) ortamlarına hem WT maya hem de kütüphane içeren mayalar pozitif kontrol olarak yayılmıştır. 3 gün 30°C inkübasyona bırakılan petrilere çıkan koloniler PKB 1-40 olarak isimlendirilmiştir.

3.3. Damlatma ve Seri Dilüsyon Testi

YNB (-Ura) petrisinden WT maya ve borik asit içeren petrilere çıkan 40 tolerant koloni katı besiyerinden kürdan yardımıyla sıvı besiyerine alınarak bir gece 30 °C 200 rpm’ de çalkalayıcıda büyütülerek artan dozlarda borik asit içeren (55, 80, 100, 125 mM) ve hiç içermeyen (0 mM) YNB (-Ura) katı ortamlarına damlatılarak tekrar dayanıklılıkları test edilmiştir. Dayanıklı görülen koloniler aynı şekilde sıvı ortamda büyütülerek artan dozlarda (80 100, 150 mM) borik asit içeren ve hiç içermeyen (0 mM) katı besiyerine 5 µl olacak şekilde seri dilüsyon (OD₆₀₀: 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002) yapılmıştır.

3.4. Dayanıklı Kolonilerden Maya Plazmiti ve *E. coli* Plazmitinin İzolasyonu

Seri dilüsyon sonucu dayanıklı görülen kolonilerden maya koloni PCR yapılmıştır. Bunun için 20 µl, 20 µM NaOH içine maya kolonisinden pipet ucuyla alınarak karıştırılmıştır. 95 °C’de 40 dakika inkübasyondan sonra tüpler 10 dakika spinlenmiştir. PCR reaksiyonuna 2 µl örnek konulmuştur, GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur. PCR sonuçlarına göre 14 örnek farklı bant boyutu verirken, 17 koloni aynı bant boyutu vermiştir. Aynı bant boyutlu örnekleri temsilen 26 numara seçilmiştir. Toplam 15 mayadan Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research) kiti ile plazmit izole edilmiştir. Maya plazmitleri ile GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır.

Mayadan izole edilen plazmitler *E. coli*’ye (DH5α) ısı şoku yöntemiyle transforme edilmiştir. Bunun için -80 °C’den buz üzerine alınan kimyasal kompatent *E. coli* hücreleri eriyene kadar bekletilmiştir. Nazikçe 100 µl hücre transformasyon tüpüne aktarılmış ve üzerine 10 µl maya plazmiti eklenmiştir. Dikkatli bir şekilde 4-5 kere tüpe vurularak karıştırılmış, karışım 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. (Mayadan plazmit izolasyon verimi düşük olduğu için standart kullanıma göre kompatent bakteri hücre ve plazmit miktarı iki katına çıkarılmıştır.)

42 °C’de 30 saniye su banyosunda ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Hemen buz üzerine alınarak 5 dakika inkübe edilmiştir. 900 µl sıvı LB eklenerek 37 °C ve 250 rpm’de 60 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler LB petrisine 100 µl ve LB + ampicilin (100 µg/ml) petrilere 900 µl olacak şekilde yayılmıştır. Petrilere gece boyu 37 °C inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün çıkan kolonilerden *E. coli* koloni PCR yapılmıştır. Pozitif çıkan kolonilerden LB + ampicilin (100 µg/ml) sıvı ortamına birer koloni alınarak gece boyu 37 °C, 250 rpm’de büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerin kalitesi BioDrop DUO UV/VIS Spektrofotometre (Biochrom, Birleşik Krallık) ile ölçülmüştür. GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur. % 1’ lik agaroz jelde plazmitler ve PCR ürünleri yan yana olacak şekilde 80 Volt’ta 60 dakika yürütülerek görüntü alınmıştır.

3.5. Re-transformasyon

Plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra LiAc/SS carrier DNA/PEG methodu (Gietz ve Schiestl 2007) ile mayaya Re-transformasyon yapılmıştır. Bunun amacı maya kolonilerinde görülen dayanıklılığın sebebinin bulunan plazmitten kaynaklı olup

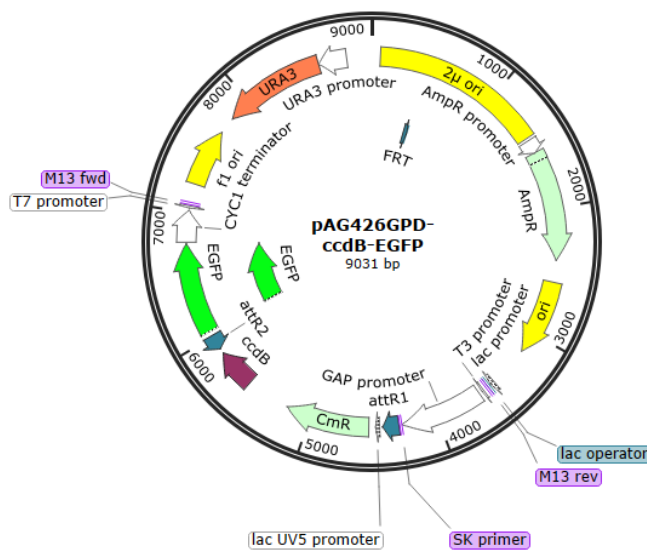
olmadığının tespit edilmesidir. Plazmitler mayaya aktarıldıktan sonra artan dozlarda (0, 55, 80, 100, 150 ve 200 mM) borik asit içeren ortamlara seri dilüsyon (0, 55, 80, 100, 150 ve 200 mM) yapılmıştır. Dayanıklı olan koloni belirlenmiştir.

3.6. Sekanslama ve Blast Analizleri

Yeni nesil sekanslama ile PKB26 olarak adlandırılan mayadan elde edilen pAG426GPD-*cDNA* vektörü sekanslatılarak dayanıklılıktan sorumlu *cDNA* dizisi elde edilmiştir. NCBI blastn ve blastx kullanılarak sekansların homoloji gösterdiği nükleotit ve protein sekansları tespit edilmiştir. Bu tanımlamadan sonra *cDNA*'nın ismi *GpBOR4* (*Gypsophila perfoliata BOR4*) olarak bahsedilecektir.

3.7. *GpBOR4* geninin maya hücrelerinde subselüler lokalizasyonu

Elde edilen toleranstan sorumlu *cDNA*'nın pAG426GPD vektöründen çıkarılması için, açık okuma çerçevesini (ORF) kapsayacak ancak sonlanma kodonunu içermeyen ve uygun restriksiyon kesim bölgesinin (*EcoRI*) eklenmesini sağlayacak şekilde ters (reverse) primer dizayn edilmiştir. Bunun için ters primerin 3' ucu genin sonlanma kodonundan önceki sekansa komplementer olacak şekilde, 5' ucu ise *EcoRI* restriksiyon enziminin tanıma sekansını içerecek şekilde primer tasarlanmıştır. GPDpro-Forward (5'-CGGTAGTATTGATTGTAATTCTG-3') ve *EcoRI*-Reverse primer (5'-GCGAATTCCGCTTTGGATGAA-3') ile Phusion DNA Polimeraz (ThermoFisher Scientific, ABD) kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek doğrulandıktan sonra *SpeI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen ürünler jelden kesilerek QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edilmiştir. BioDrop µLITE (Biodrop, UK) cihazı ile ürünlerin ölçümü yapılmıştır. pAG426GPD-*ccdB*-EGFP (Şekil 3.4) vektörü de *SpeI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kesilerek, jel elektroforezinde yürütülüp ürün jelden kesilmiş ve QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edilmiştir.



Şekil 3.4. pAG426GPD-*ccdB*-EGFP vektörünün haritası

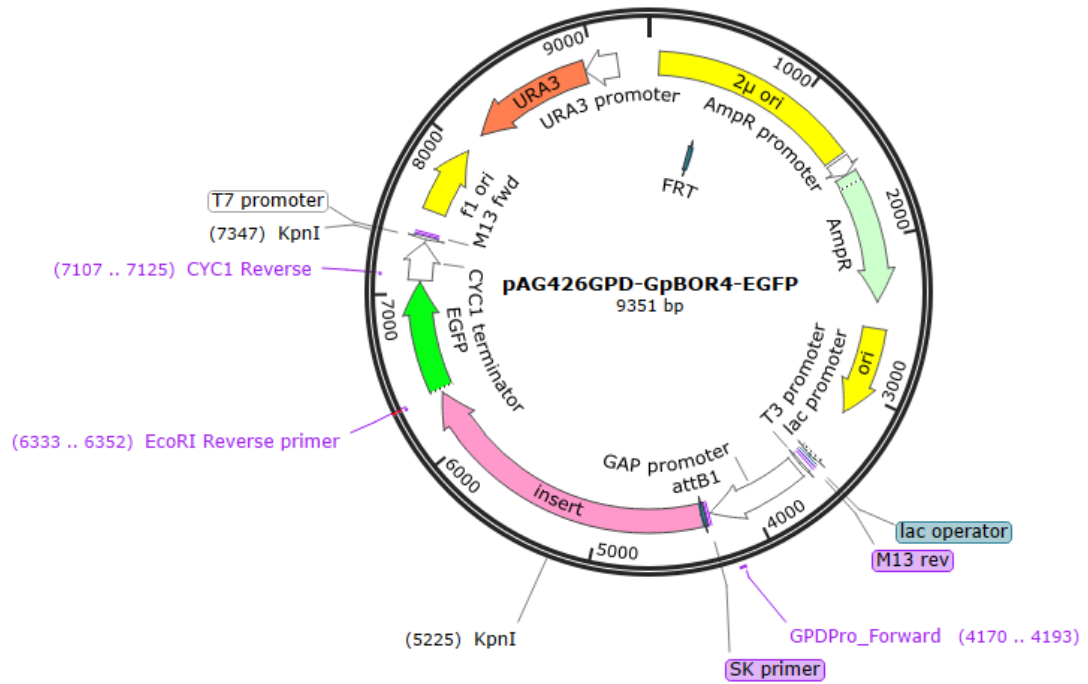
GpBOR4 cDNA ORF bölgesi ile EGFP vektörü birleştirilmek üzere ligasyon reaksiyonu Tablo 3.2'ye göre T4 DNA ligaz (NEB, ABD) ile kurulmuştur.

Çizelge 3.2. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 µl
Vektör DNA (4 kb)	50 ng (0.020 pmol)
Insert DNA (1 kb)	37.5 ng (0.060 pmol)
Nuclease-free su	toplam 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

3 µl ligasyon ürünü 50 µl *E. coli*'ye (DH5α) ısı şoku yöntemi ile aktarılmış ve Ampisilin (100 µg/ml) içeren LB agar besiyerlerine ekimi yapılmıştır. 37 °C etüvde gece boyu inkübe edilen petrilerden çıkan kolonilerden uygun primer çiftleri (GPD_{pro}-F: CCGTAGGTATTGATTGTAATTCTG, CYC1: GCGTGAATGTAAGCGTGAC) ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Pozitif çıkan koloniler Ampisilin (100 µg/ml) içeren 5 ml sıvı LB'ye alınarak gece boyu 37 °C, 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ertesi gün GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır.

KpnI restriksiyon enzimi ile doğrulanan *GpBOR4-EGFP* füzyon genini içeren pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* vektörü (Şekil 3.5) LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü (Gietz ve Schiestl, 2007) kullanılarak *S. cerevisiae* BY4743Δ*atr1* maya hücrelerine aktarılmıştır. Aynı şekilde pozitif kontrol olarak pAG426GPD-ccdB-EGFP (Addgene plasmid # 14204) vektörü de mayaya transforme edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise daha önceki deneylerde kullanılan ve EV olarak adlandırılan pAG426GPD-ccdB (Addgene plasmid # 14156) vektörünü içeren maya kullanılmıştır.



Şekil 3.5. pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörü haritası

3 gün YNB(-Ura) agar besiyerinde büyütülen pAG426GPD-ccdB, pAG426GPD-ccdB-EGFP ve pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörünü taşıyan mayaların (80 mM borik asit eklenmiştir) her birinden birer koloni alınıp 5 ml sıvı YNB ortamına konulmuştur. pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörünü taşıyan maya kolosinin sıvı kültürüne de 80 mM borik asit eklenmiştir. Gece boyu büyütülen hücreler ertesi gün sabah O.D değeri ölçülerek 0.2 olacak şekilde seyreltilmiştir. pAG426GPD-GpBOR4-EGFP maya kültürüne 80 mM borik asit eklenmiştir. OD₆₀₀=0.6 olunca (yaklaşık 3 saat) her bir hücreden 10 µl alınarak lamel üzerine damlatılmış ve lamel kapatılmıştır. Leica DMI8 İnverted Mikroskop ile hücrelerin GFP ışıkları görüntülenmiştir.

Detaylı görüntü alınmak üzere hücreler ESOGÜ, Merkezi Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne götürülmüştür. Merkezin bünyesinde bulunan ZEISS LSM800 marka Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

3.8. Mayada Hücre içi Borun Belirlenmesi

pAG426GPD-GpBOR4 ve pAG426GPD-ccdB (EV) vektörü BY4743 ve BY4743Δ*atr1* mayaya aktarılmıştır. Seçici ortam olarak YNB(-Ura) besiyeri kullanılmıştır. Hücre içi bor miktarını belirlemek amacıyla temel olarak Takano vd. (2002) protokolüne uyulmuştur. Bu doğrultuda hücreler sıvı YNB(-Ura) ortamında büyütülmüştür. Daha sonra OD₆₀₀=0.25 olacak şekilde 200 ml YNB(-Ura) besiyerinde seyreltilmiş ve mid exponential faza (logaritmik büyüme evresinin ortası) kadar büyütülmüştür (OD₆₀₀= 0.5-0.7). Hücreler 3.000 g, 4 °C'de 1 dakika santrifüj yapılarak toplanmıştır. Hücreler 50 mM borik asit içeren YNB(-Ura) besiyeri ile çözdürülerek 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Borik asit

uygulaması 1 ve 2 saat olarak yapılmıştır. 1 saat sonunda hücrelerden 50 ml alınarak 3.000 g, 4 °C’de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler toplanmıştır. Ardında 2 kere soğuk distile su ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin üzerine 25 ml dH₂O konularak 30 dk. kaynatılmıştır. Santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant başka bir falkona aktarılmıştır. Süpernatant 3 teknik okuma alınması için 75 ml’ye seyreltilerek ICP-MS cihazı ile bor içeriği tespit edilmiştir. Pellet 80 °C’de kurutulmuş ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Maya hücrelerinin bor içeriği mmol B/kg DW cinsinden hesaplanmıştır.

Deney boyunca tüm santrifüj işlemleri 3.000 g ve 4 °C’de gerçekleştirilmiştir.

3.9. Tolerans Sağlayan cDNA’nın Bitki İfade Vektörüne Klonlanması

GpBOR4 geninin fonksiyonunu tanımlamak amacıyla gen, model bitki olan *A. thaliana*’ya aktarılmıştır. Bunun için pAG426GPD-*GpBOR4* maya ekspresyon vektöründen attB1-attB2 bölgelerinin arasındaki cDNA önce BP reaksiyonla Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix kiti (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak pDONR™221 vektörüne aktarılmıştır. BP reaksiyonu Çizelge 3.3’e göre kurulmuştur. BP reaksiyonun pozitif kontrolü pexp7-tet ve pDNOR221 vektörü ile yapılmıştır.

Çizelge 3.3. BP reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Negatif kontrol	Pozitif kontrol
pAG426GPD- <i>GpBOR4</i>	6 µl	6 µl	--
pDNOR221 (150 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
pexp7-tet	--	--	2 µl
TE Buffer (pH 8)	8 µl’ye	10 µl’ye	5 µl
BP klonase	2 µl	--	2 µl

Reaksiyon karışımı 25 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 µl Proteinaz K eklenerek reaksiyon inaktivasyon için 37°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. 50 µl competent *E. coli* (DH5α) hücrelerine reaksiyon ürününden 2 µl eklenmiş ve heat shock (ısı şoku) protokolü uygulanmıştır. pDONR™221 vektörü üzerinde bulunan nptII geni sayesinde kanamisin antibiyotiği içeren besiyerlerinde hayatta kalan kolonilerden PCR yapılmıştır. Seçilen kolonilerden sıvı LB ortamına alınarak gece boyu 37 °C’de 225 rpm çalkalayıcıda büyütülen kültürlerden ertesi gün GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmitler *Bsr*GI kesim enzimi ile doğrulanmıştır.

Çizelge 3.4. LR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Negatif kontrol	Pozitif kontrol
Entry clone (50 ng/µl)	1 µl	1 µl	--
Destination vector (150 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
pENTR-gus	--	--	2 µl
TE Buffer (pH.8)	8 µl'ye tamamla	10 µl'ye tamamla	5 µl
LR clonase	2 µl	--	2 µl

Ardından attL1-attL2 bölgelerinin arasında kalan cDNA bitki ekspresyon vektörü pIPKb004'e (V005409, Novopro, Çin) LR reaksiyonla GATEWAY klonlama prensibi kullanılarak aktarılmıştır. Çizelge 3.4'teki reaksiyon bileşenleri kullanılmıştır. LR reaksiyonu gece boyu 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 10 dk. 37 °C'de Proteinaz K ile inaktivasyon yapılmıştır. Transformasyon için 100 µl *E. coli*'ye 2 µl LR reaksiyonu eklenmiştir. Ayrıca her bir tüpte 50 µl bulunan *E. coli* hücrelerine de 2'şer µl NC (Negatif kontrol), PC (pozitif kontrol) ve pUC19 vektörü de transforme edilmiştir. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu GeneJET Plazmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kiti kullanılarak yapılmıştır. Plazmitlerin doğruluğu *KpnI* restriksiyon enzimiyle kesilerek belirlenmiştir. Ayrıca yeni nesil dizileme ile (NGS) plazmitin tüm sekans bilgisi elde edilmiştir.

3.10. İfade Vektörlerinin *Agrobacterium*'a Transformasyonu ve Floral Dip ile *Arabidopsis*'e Aktarılması

Bu tez çalışmasında SALK enstitüsünden temin edilen T-DNA insersiyon mutanları olan *Atbor4* (SALK_133793) ve yabanıl (Col-0) *Arabidopsis thaliana* tohumları kullanılmıştır. SALK_133793 tohumları heterozigot olduğu için tohumlardan bir kısmı toprağa ekilmiş ve yaprakları belirli büyüklüğe ulaşan bitkilerden PCR yapılarak testlenmiştir. Bitkilerden DNA izolasyonu CTAB (Doyle 1991) ile yapılmıştır. ATLBb1.3: ATTTTGCCGATTTCGGAAC ve SALK133793_RP: TGGAGTTGCAGAACCAACTG primerleri ile T-DNA PCR, SALK133793_LP: TCCATTGAAGGAGGCAGAC ve SALK133793_RP: TGGAGTTGCAGAACCAACTG primerleriyle ise WT PCR kurulmuştur. Heterozigot bitkilerde hem WT hem de T-DNA PCR'da bant gözlemlenirken, homozigot olan bitkilerde WT PCR'da bant gözlemlenmez, T-DNA PCR'da bant olması beklenir. WT bitkilerde ise WT PCR'da bant var, T-DNA PCR'da bant yok olması beklenir. "Salk Enstitüsü'nden temin edilen T-DNA mutasyon hattının homozigotluğunu belirlemek amacıyla T-DNA insersiyonu genotiplendirme PCR'ı (T-DNA insertion genotyping PCR) yapılmıştır. PCR analizinde gen-özlü primerler (LP ve RP) ile T-DNA sol sınırına (LB) özlü primer kullanılmıştır.

Homozigot *Atbor4* (SALK_133793) mutant hatları ve WT (Yabanıl ırk: Columbia) *A. thaliana* tohumlarının yüzey sterilizasyonu sırasıyla %70 EtOH ve %50 NaClO ile 10 dakika muamele edildikten sonra distile su ile 3 kez durulanarak gerçekleştirilmiştir. ½ MS ortamına ekimi yapılmış bitkiler 1 aylık iken torf:perlit (1:1) içeren potlara 4-5 bitki olacak şekilde aktarılmıştır. Bitkilerin sürgünleri gelişip çiçek açmaya başlayınca gelişen silikleri kesilerek sadece tomurcuk ve yeni açan çiçekler bırakılmıştır.

GpBOR4 cDNA'sını içeren bitki ekspresyon vektörü (pIPKb004-*GpBOR4*) elektroporasyon ile *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna transforme edilmiştir. cDNA içermeyen pIPKb004 (Mock) vektörü ise *A. tumefaciens* LBA4404 suşuna aktarılmıştır. Ultra derin dondurucudan (-80 °C) çıkarılan 50 µl kompetent EHA105 hücreleri buz üzerine alınarak çözünmesi sağlanmıştır. İki adet 0.2 cm'lik elektroporasyon küveti soğuması amacıyla buz üzerine konulmuştur. Hücreleri içeren ependorf tüplerden birine 2 µl pIPKb004-*GpBOR4* vektöründen eklenmiştir. Negatif kontrol olarak hiçbir plazmit konulmamış EHA105 hücreleri kullanılmıştır. Tüplerde bulunan hücreler elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator® cihazı kullanılarak, 2000 V, 3-4 ms, elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon cihazından çıkarılan hücreler 15 ml'lik falkonlara aktarılıp üzerine 950 ml LB sıvı besiyeri eklenmiştir. Çalkalayıcıda 28 °C, 3 saat, 200 rpm hızında inkübe edilmiştir. Hücreler rifampisin (30 mg/l), spektinomisin (100 mg/l), ve streptomisin (100 mg/l) antibiyotiklerini içeren LB agara ekilmiştir. Kontrol olması amacıyla antibiyotik içermeyen katı LB ortamına da hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Petri kapları 28 °C etüve alınarak koloni oluşumu için 2 gün inkübasyona bırakılmıştır.

pIPKb004-*GpBOR4* ve Mock vektör (pIPKb004) *Agrobacterium*-aracılı transformasyon ile *A. thaliana*'ya floral dip (Şekil 3.6) yapılarak aktarılmıştır (Zhang ve ark.,2006).

pIPKb004-*GpBOR4* vektörü aktarılmış EHA105 *A. tumefaciens* hücreleri kullanılarak Col-0 ve *bor4* (SALK_133793) *A. thaliana*'ya yapılan floral dip sonrası bitkilerin üzeri 1 gece streçle örtülmüş ve karanlık olacak şekilde kapatılarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün üzeri açılarak çapraz tozlamayı önlemek amacıyla hava alabilen poşet geçirilmiştir. Bir hafta sonra floral sprey yapılmıştır. Bitkiler silik oluşturup kurumaya başlayana kadar sulanıp daha sonra tamamen kuruyana kadar büyütme kabininde tutulmuştur. Yaklaşık bir ay sonra kuruyan tohumlar toplanmıştır. Oda sıcaklığında 3-4 gün kurutulduktan sonra +4 °C dolapta muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6. *Arabidopsis thaliana*'ya Agrobacterium-aracılı floral dip metodu ile *GpBOR4* geninin transformasyonu

3.11. Transgenik Bitkilerin Seçimi

Floral dip yöntemiyle transformasyon yapılan (T0) bitkilerinden elde edilen tohumlar steril edildikten sonra, 150 mm × 15 mm petri kaplarında ½ MS besiyeri üzerine (25 µg/mL hygromycin ve 100 µg/mL timentin içeren) ekilmiştir. 2 gün karanlıkta 4 °C'de bekletilmiştir. Petriler bitki büyütme kabinine alınarak 16 saat aydınlık:8 saat karanlık, %60 nem şartlarında büyümeye bırakılmıştır. Col-0/pIPKb004-*GpBOR4* tohumları 3 petri kabına ve *bor4*/pIPKb004-*GpBOR4* tohumları ise 4 petri kabına ekilmiştir. 2 hafta sonunda transgenik bitkiler tek bir petri kabında sayılarak, transformasyon oranları hesaplanmıştır.

bor4/pIPKb004-*GpBOR4* ve Col-0/pIPKb004-*GpBOR4* petrilerinden 24'er bitki seçilerek toprağa aktarılmıştır (T1) ve yaprakları belirli büyüklüğe gelince DNA izolasyonu yapılmıştır. 35S_F ve qyPKB_R primerleri kullanılarak bitkilerin transgenik olup olmadığı belirlenmiştir. Pozitif sonuç veren bitkiler tohum tutup kuruyana kadar 2 ay süreyle ¼ Hoagland ile sulanmıştır. Tohumlar kurduğunda toplanarak 3 gün süreyle ependorf tüplerde oda sıcaklığında kurutulmuş daha sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Her bir hattın *GpBOR4* genine yönelik segregasyon durumunu belirlemek amacıyla, 25 µg/mL hygromycin içeren ½ MS besiyerine her hattan 100'er tohum ekilmiştir. Petriler 2 gün +4 °C'de tutulduktan sonra bitki büyütme kabinine

yerleştirilerek 23 °C, %60 nispi nem ve 16 saat ışık: 8 saat karanlık fotoperiyodunda 3 hafta büyütülmüştür. Col-0 ve SALK_133793' e ait 7 hattın 5'er transgenik bitki (T2) ve birer Mock hattından da 5'er bitki toprağa aktararak 2 ay tohum tutmaları beklenmiştir. Tohumlar kuruduktan sonra toplanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar ½ MS (25 µg/ml hygromycin) içeren besiyerlerine 50'er tane ekilmiş, 3 hafta büyüdükten sonra dayanıklı bitkiler (T3) sayılarak *GpBOR4* genine yönelik segregasyon analizi yapılmıştır. Böylece toplamda 80 petride seleksiyon yapılmıştır.

3.12. Transgenik Bitkilerin Bor Dayanımının Belirlenmesi

Segregasyon analizi sonucunda 7 transgenik hattın homozigot olduğu belirlenen 5 tanesi ile deneylere devam edilmiştir. Bunun için her hattın 5'er bitkisinden en homozigot açılım gösterenlerden biri seçilmiştir.

Artan dozlarda borik asit (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H₃BO₃) içeren ½ MS besin ortamlarına wild type (Col-0), Mock ve 5 transgenik hat (#7.4, #8.2, #10.1, #18.2, #23.3) 5'er bitki yanyana olacak şekilde ekilmiştir. Aynı şekilde *bor4* wild type (SALK_133793), mock ve 5 transgenik hat da (#4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5) artan dozlarda borik asit içeren ortamlara ekilmiştir. Petriler 2 gün +4 °C' de tutulmuştur. Bitki büyütme kabinine aktarılan petrilerin 14 gün sonunda fotoğrafları çekilmiştir.

Aynı deney, tohumların borik asit içermeyen ½ MS besiyerinde 4 gün ön çimlendirme işlemi yapılarak tekrar edilmiştir. Artan dozlarda borik asit içeren (0, 3, 5, 10, 15 mM H₃BO₃) ½ MS besin ortamlarına bitkiler pens yardımıyla steril bir şekilde aktarılmıştır. 14 günlük bitkilerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.13. Transgenik Hatlarda Gen İfadelerinin Belirlemesi

Wild type (Col-0), Col-0/Mock, Col-0/*GpBOR4* #7-4, #8-2, #10-1, #18-2, #23-3 hatlarından ve *bor4* wild type (SALK_133793), *bor4*/Mock, *bor4*/*GpBOR4* #4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5 hatlarından RNA izolasyonu için ½ MS besi ortamlarına yaklaşık 200'er tohum ayrı ayrı ekilmiştir. 21 gün büyütülen bitkiler hasat edilerek sıvı azotla dondurulmuş ve -80 °C ultra derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu için -80 °C'den çıkarılan örnekler sıvı azot ve havan ile toz haline gelene kadar öğütülmüştür. innuPREP RNA Mini Kit 2.0 protokülüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %1'lik agaroz jele 4 mikrolitre yüklenen örnekler 80 V 1 saat yürütülerek, jelin görüntüsü alınmıştır.

RNA'daki DNA kirliliklerinin uzaklaştırılması amacıyla TURBO DNA-Free Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. DNase uygulanmış RNA'lar %1'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir.

Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) ile RNA'ların konsantrasyonu ölçülmüş ve her bir örnek 5 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O ile seyreltilmiştir. QPCR reaksiyonu her bir örnek için 3 teknik tekrar olacak şekilde Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. QPCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	10 µl Reaksiyon
Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	2.5 µl
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X)	0.25 µl
İleri primer (10 µM)	0.4 µl
Geri primer (10 µM)	0.4 µl
Kalıp RNA	2 µl
Nükleazsız su	4.45 µl
TOPLAM	10 µl

Reaksiyon hazırlandıktan sonra CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System cihazı ile QPCR yapılmıştır. İnternal kontrol (housekeeping gen) olarak PDF2 kullanılmıştır.

Gen spesifik primerler QGpBOR4_F:5'-GATTGTCGGCATCGCAGAAC-3', QGpBOR4_R:5'-CAAGCAGCCCAAGCCAAGTA-3', housekeeping gen primerleri ise PDF2_F:5'-TCATTCCGATAGTCGACCAAG-3', PDF2_R:5'-TTGATTTGCGAAATACCGAAC-3' sekanslarına sahiptir.

3.14. *GpBOR4* Geninin Genomdaki Kopya Sayılarının Southern Blot ile Belirlenmesi

G. perfoliata *GpBOR4* geninin genomda kaç kopya olduğunu tespit etmek amacıyla Southern blot analizi yapılmıştır. Gen kopya sayısını belirlemek amacıyla iki strateji uygulanmıştır. Bunlardan biri *G. perfoliata* genomik DNA'sının izole edilerek uygun restriksiyon enzimleriyle rastgele kesilerek etiketlenmesidir. Diğer yöntem ise, tek kopya geni içeren plazmit ile genomik DNA'nın probun dışından kesilerek bant yoğunluğuna göre kopya sayısının belirlenmesi yoluyla yapılmıştır. Buna göre plazmit *SacI* ve *SwaI* enzimleriyle kesildiğinde oluşan 429 bazlık sekansın içinden prob dizayn edilmiştir. Bunun için öncelikle elimizde cDNA sekansı bulunan *GpBOR4* geninin genomik sekansının bir parçasını elde etmek amacıyla primer çiftleri dizayn edilmiştir. *GpBOR4* geninde ileri (southern prob_F:5'- GATTGTCGGCATCGCAGAAC-3') ve geri (southern prob_R:5'- GAGCCGTGATCAACATGC-3') primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. *GpBOR4* cDNA'sı ve *G. perfoliata*'nın genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır.

Primer çiftinin genomik DNA'dan tek bant verdiği doğrulandıktan sonra prob DNA'sını elde etmek amacıyla Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) ile PCR kurulmuştur. PCR ürünleri jelden purifiye edilerek saflaştırılmıştır ve ROCHE DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II protokolüne göre prob hazırlanmış ve probun etkinliği membrana damlatma yöntemi ile test edilmiştir.

Southern blot analizi için genomik DNA izolasyonu CTAB yöntemi ile yapılmıştır. Kesim reaksiyonlarında 50 µg genomik DNA kullanılmıştır. Plazmitten ise 100 ng kullanılarak *SwaI*- *SacI* kesimi yapılmıştır. Genomik DNA *SwaI*- *SacI*, *KpnI*, *XbaI*-*BamHI* enzimleriyle kesilmiştir. Tüm kesim ürünleri %0.8 agaroz jele yüklenerek 2 saat 200 V'ta yürütülmüştür. Jelden membrana transfer ROCHE DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.7'de Southern blot sandviç modeli gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Southern blot sandviç modeli ile agaroz jeldeki DNA'ların pozitif yüklü naylon membrana aktarılması

3.15. *GpBOR4*'ün GFPGUSPlus vektörü ile *Arabidopsis*'e Transformasyonu

Arabidopsis thaliana Col-0 ekotipinde *GpBOR4* geninin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amacıyla pGFPGUSPlus (Addgene # 64401) vektöründe bulunan GFP geni ile geleneksel klonlama yöntemi kullanılarak füzyon yapılmıştır. Bunun için öncelikle GFPGUSPlus vektörü *XbaI* kesim enzimiyle lineer hale getirilmiş, ardından yapışkan uçların birbiri üzerine kapanmasını engellemek üzere defosforilasyon için CIP (NEB) uygulanmıştır.

Diğer taraftan *GpBOR4* geninin ORF kısmı belirlenerek stop kodon çıkarılacak şekilde primer dizaynı yapılmıştır. pGFPGUSPlus vektörünü kesen *XbaI* enzimi *GpBOR4* geninin içinden kestiği için *XbaI* ile farklı tanıma sekansına sahip ancak kesim sonrası aynı yapışkan uç oluşturan *SpeI* enzimi ile *GpBOR4* geni kesilmiştir. *SpeI* enziminin tanıma sekansını içerecek şekilde *GpBOR4* geninin başına ve stop kodonun hemen öncesine komplementer olacak şekilde ileri ve geri primerler dizayn

edilmiştir ve PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bandı jelden purifiye etmek için QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılmıştır. İnsört, *SpeI* enzimi ile kesilmiştir.

Elde edilen lineer pGFPGUSPlus vektörü ve *GpBOR4*-ORF ürünü T4 DNA ligaz (NEB) enzimiyle birleştirilmiştir. Ligasyon sonrası 3 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetant *E. coli*'ye (DH5α) ısı şoku yöntemi ile aktarılmış ve antibiyotik (Kanamisin 50 µg/mL) içeren LB agar besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Ertesi gün çıkan *E.coli* kolonilerinden 10 tane seçilerek 35S_F ve M13_R primer seti ve 35S_F ve qyPKB_R primer seti kullanılarak koloni PCR yapılmıştır.

Pozitif kolonilerden biri seçilerek GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmit *BsRGI* enzimi ile kesilerek doğrulanmıştır.

Doğrulanmış plazmit *A. tumefaciens* EHA105 suşuna elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Kanamisin (50 µg/mL) içeren LB besiyerlerine ekilen hücrelerden çıkan kolonilerden 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile PCR kurulmuştur.

GpBOR4-GFPGUSPlus vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* EHA105 suşu kullanılarak çiçeklenme aşamasına gelen Col-0 ekotipinden 6'şar bitki içeren toplam 4 pot kullanılarak floral dip yapılmıştır. Daha sonra bitkiler büyütme kabininde tohum tutup sararana kadar sulanmış ardından suları kesilerek tohumların tamamen kuruması sağlanmıştır. Yaklaşık 2 ay sonra tohumlar toplanarak kurutulmuştur. Tohumlar steril edildikten sonra seleksiyonu için ½ MS (Hgyromisin 25 µl/ml +Timentin 100 µl/ml) petrisine ekilmiştir. Her bir pottan toplanan tohumlar ayrı petrilere ekilmiştir.

Yaklaşık 1 aylık bitkilerinden yaprak örneği alınarak CTAB yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA ile 35S_F ve qyPKB_R primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur.

Transgenik olduğu belirlenen bitkiler silik oluşturup kuruyana kadar bitki büyütme kabininde sulanmıştır. Kuruyan tohumların yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra bora dayanıklılığını belirlemek amacıyla artan dozlarda borik asit içeren (0, 3, 5, 10 mM) ½ MS (25 µl/ml Hgyromisin) içeren besiyerlerine ekilmiştir. 2 gün 4 °C'de bekletilen petriler bitki büyütme kabinine dikey şekilde yerleştirilmiştir. 18 gün büyüyen T2 hatlarının fotoğrafları çekilmiş ve dayanıklılık durumları belirlenmiştir.

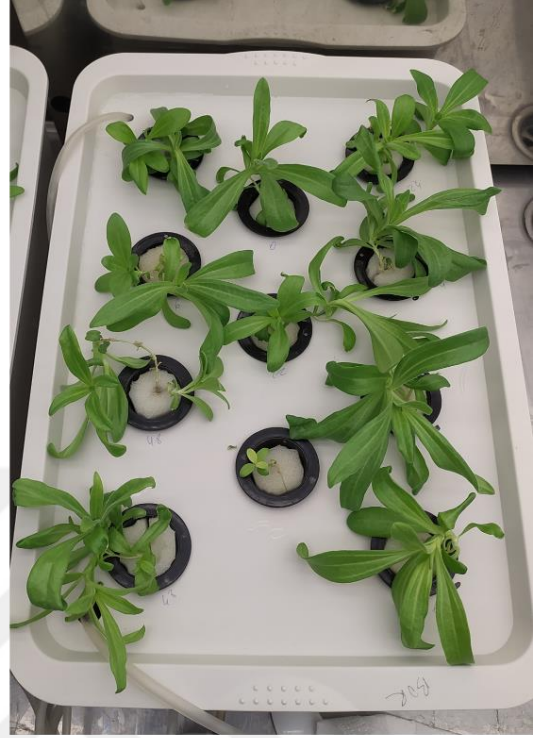
3.16. *GpBOR4*'ün Toksik Bor Koşullarında *Gypsophila perfoliata*'da İfade Profili (qPCR)

Gypsophila perfoliata, Eti Maden Kırka Bor İşletmeleri Müdürlüğü arazisinde (Kırka/Eskişehir) izin alınarak toplanmıştır. Tohumların sterilizasyonu sırasıyla %70 EtOH ve %50 NaClO ile 3 ve 10 dakika muamele edildikten sonra distile su ile 3 kez durulanarak tamamlanmıştır. *G. perfoliata* tohumları MS içeren magentalara ekilerek yaklaşık 2 ay süreyle büyütülmüştür (25 °C, %60 nispi nem ve 16 saatlik fotoperiyot). Daha sonra kontrol ve bor stresi olmak üzere iki ayrı hidroponik sistem kurulmuştur (Şekil 3.8). Bitkiler hidroponik sistemlerde 20 gün süreyle alıştırılmıştır. Bir hidroponiğin besin solüsyonu 500 mg/kg bor içeren 8 L ½ Hoagland ile

değiştirilmiştir. Kontrol hidroponiğinin ise besin solüsyonu 8 L ½ Hoagland ile değiştirilmiştir.



0 mg/L bor (Kontrol)



500 mg/L bor

Şekil 3.8. *Gypsophila perfoliata* bitkilerinin hidroponik sistemlere 20 gün alıştırılmasının ardından borik asit uygulanması

Stres saatleri 0, 6, 12, 24, 48 saat olacak şekilde kontrol ve borik asit içeren hidroponiklerden bitkiler hasat edilmiş ve sıvı azota daldırılarak dondurulmuştur. Uzun süreli muhafaza için ultra derin dondurucuda (-80 °C) saklanmıştır.

Örnekler sıvı azot kullanılarak havanda toz haline getirilmiş ve innuPREP RNA Mini Kit 2.0 protokülüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'daki DNA kirliliklerinin uzaklaştırılması amacıyla TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. DNase uygulanmış RNA'lar %1' lik agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir.

Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile RNA'ların konsantrasyonu ölçülmüş ve her bir örnek 5 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O ile seyreltilmiştir. QPCR reaksiyonu her bir örnek için 3 teknik tekrar olacak şekilde Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır.

G. perfoliata'nın sekans bilgisinin eksikliği nedeniyle, *Arabidopsis thaliana* 18S rRNA geni (GenBank erişim numarası: X16077) referans kontrol olarak kullanılmıştır ve sekansları: ileri (F: 5'-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3') ve geri (R: 5'-CAGACAAATCGCTCCACCAA-3'). Gen spesifik primerler ise: ileri (F: 5'-

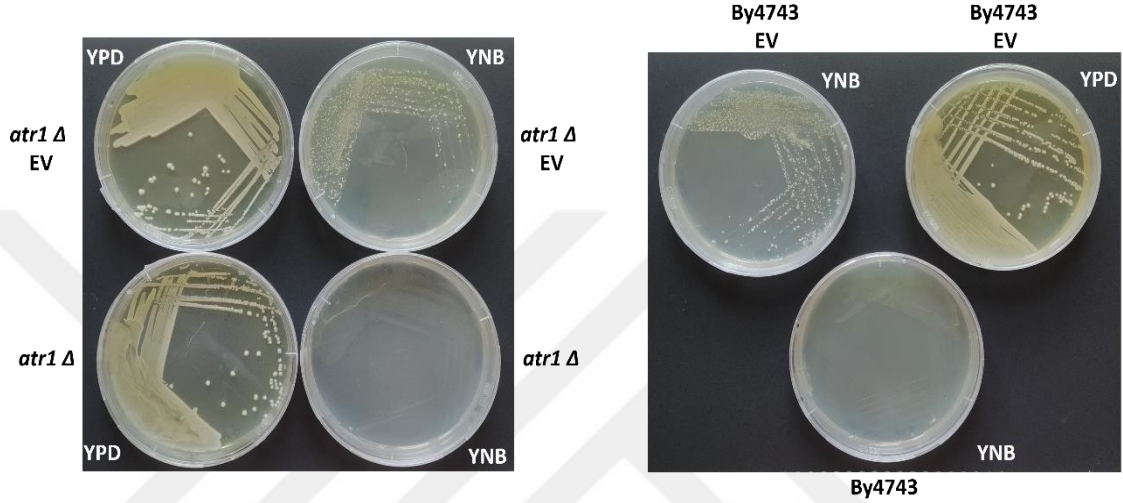
GATTGTCGGCATCGCAGAAC-3'), geri (5'-CAAGCAGCCCAAGCCAAGTA-3') sekanslarına sahiptir.



4. BULGULAR

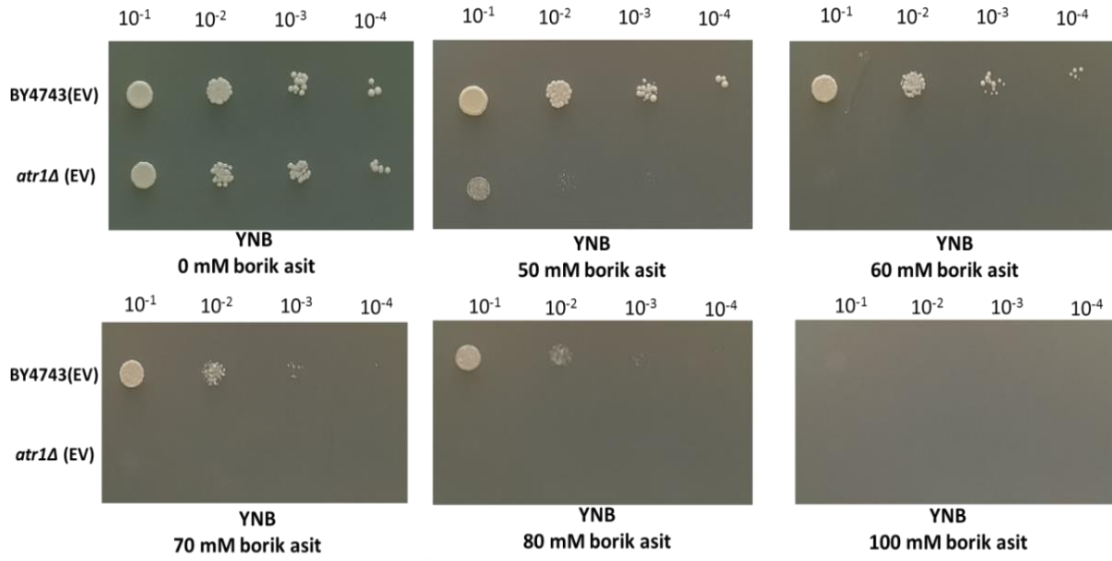
4.1. Toksik Bor Dozunun Belirlenmesi

pAG426GPD-ccdB maya ekspresyon vektörü (EV), BY4743 Δ *atr1* ve BY4743 mayaya transforme edilmiştir (Şekil 4.1). Transformasyon sonucu vektör içeren hücreler YNB(-Ura) besiyerinde büyüyebilirken, vektör içermeyen WT mayalar (BY4743 ve BY4743 Δ *atr1*) büyümemektedir. Pozitif kontrol olarak hücreler YPD besiyerine de ekilerek canlılıkları kontrol edilmiştir.



Şekil 4.1. pAG426GPD-ccdB (EV) vektörünün BY4743 ve BY4743 Δ *atr1* mayaya transformasyonu sonucu mayaların besiyerlerindeki görüntüsü

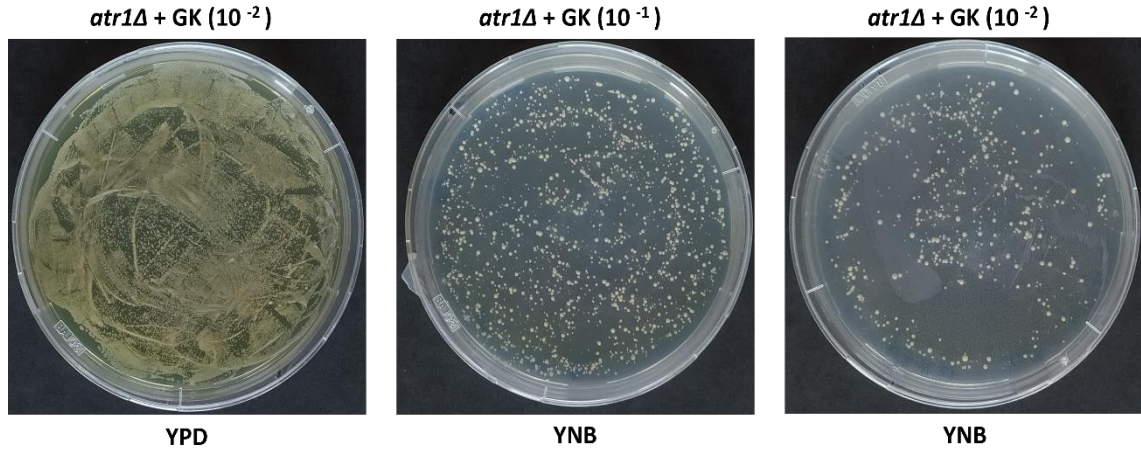
pAG426GPD-ccdB (EV) vektörü taşıyan BY4743 ve BY4743 Δ *atr1* mayalar artan dozlarda borik asit (H_3BO_3) içeren YNB (-Ura) besiyerlerine (0, 50, 60, 70, 80, 100 mM) seri dilüsyon yapıldığında, *atr1*Δ(EV) mayanın büyümesi 50 mM’da azalmaya başlarken 60 mM borik asitte tamamen durduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Buna karşın BY4743(EV) ise 80 mM’da hayatta kalabiliyorken, 100 mM’da gelişimi neredeyse durmuştur.



Şekil 4.2. Empty Vector (EV) taşıyan maya suşlarında, artan konsantrasyonlarda borik asit (H_3BO_3) içeren YNB (-Ura) besiyerlerinde toksik bor dozunun belirlenmesi

4.2. cDNA Kütüphanesinin Mayaya Transformasyonu ve Toksik Bor Dozunda Maya Fonksiyonel Tarama Testi

Elektroporasyon yoluyla BY4743 Δ *atr1* mayaya transforme edilen *G. perfoliata* kök cDNA kütüphanesi YPD ve YNB (-Ura) besiyerlerine 10 ve 100 kat seyreltilerek yayılmıştır (Şekil 4.3). 3 gün inkübasyon sonunda çıkan kolonilerin tamamı besiyerinde sıyrılmış ve sıvı YNB(-Ura) besiyerinde çözdürülmüştür.



Şekil 4.3. *G. perfoliata* Kök (GK) cDNA kütüphanesinin YPD ve YNB(-Ura) besiyerlerine 10 ve 100 kat seyreltilerek yayılması

WT (*atr1Δ*-EV) mayalar için 50 mM borik asit toksik doz olarak belirlenmiştir. Ancak kütüphane tarama çalışmaları daha yüksek doz olan 80 mM borik asit içeren besiyerlerinde yapılmıştır. 80 mM borik asit içeren 10 adet YNB (-Ura) ortamına *atr1Δ*-*G. perfoliata* kök kütüphanesi ve kontrol olarak WT (*atr1Δ*-EV) maya petri başına 15 μ l

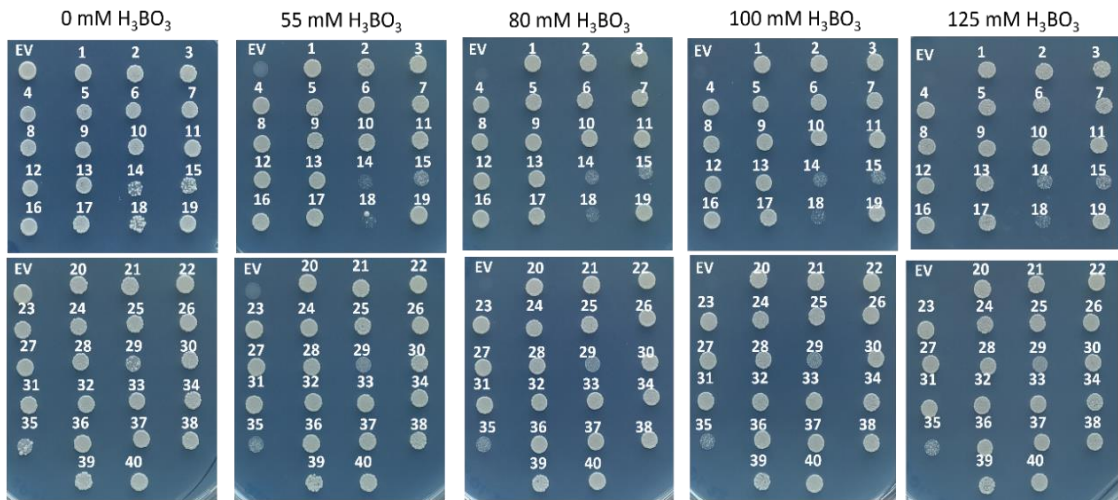
yayılmış, 3 gün 30 °C inkübe edilmiştir. Petrilerden çıkan 40 adet muhtemel tolerant koloni 1’den 40’a kadar numaralandırılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 80 mM borik asit içeren toksik dozda YNB (-Ura) ortamlarında *atr1Δ*- *G. perfoliata* kök kütüphanesinin fonksiyonel tarama testinde dayanıklı çıkan koloniler

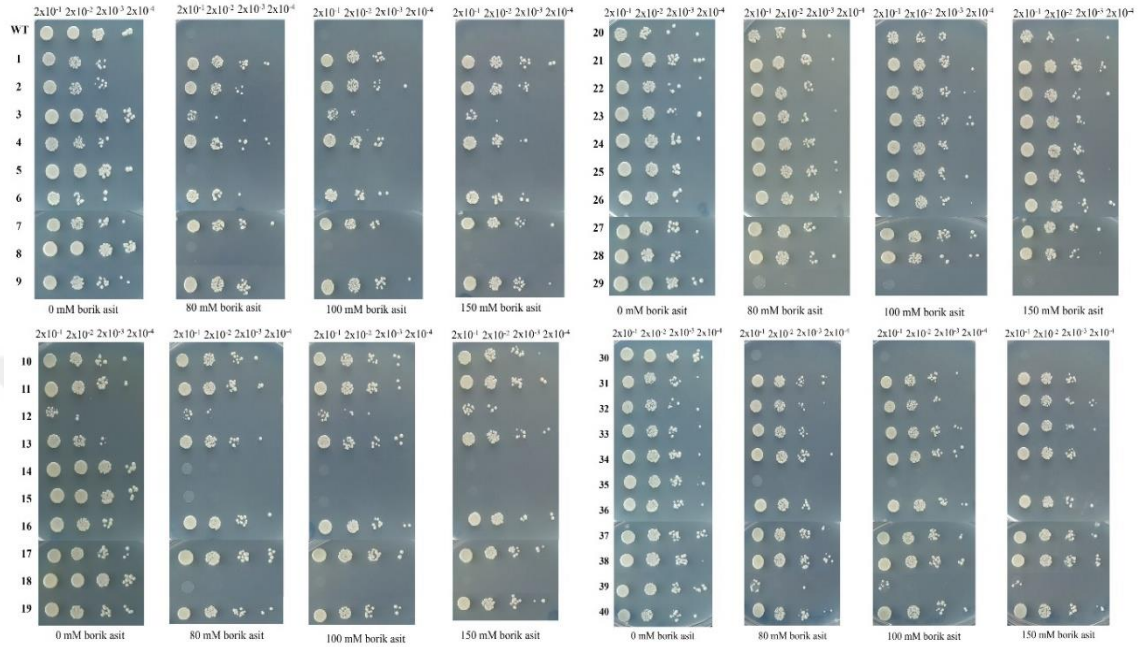
4.3. Damlatma ve Seri Dilüsyon Testi

YNB petrisinden WT maya (EV) ve borik asit içeren petrilerden çıkan 40 adet tolerant koloni katı besiyerinden kürdan yardımıyla sıvı besiyerine alınarak bir gece 30 °C 200 rpm’ de çalkalayıcıda büyütüldü. Artan dozlarda borik asit içeren ve hiç içermeyen YNB(-Ura) katı ortamlarına damlatılarak tekrar dayanıklılıkları test edildi (Şekil 4.5). Maya fonksiyonel tarama sonucu dayanıklı görülen koloniler benzer şekilde damlatma testinde de dayanıklı çıkmıştır. Ancak #14, #15, #18 ve #35 numaralı kolonilerin gelişimi diğerlerine göre zayıftır.



Şekil 4.5. Artan dozlarda borik asit (0, 55, 80 100, 125 mM H₃BO₃) içeren ortamlarda dayanıklı kolonilerin damlatma testi

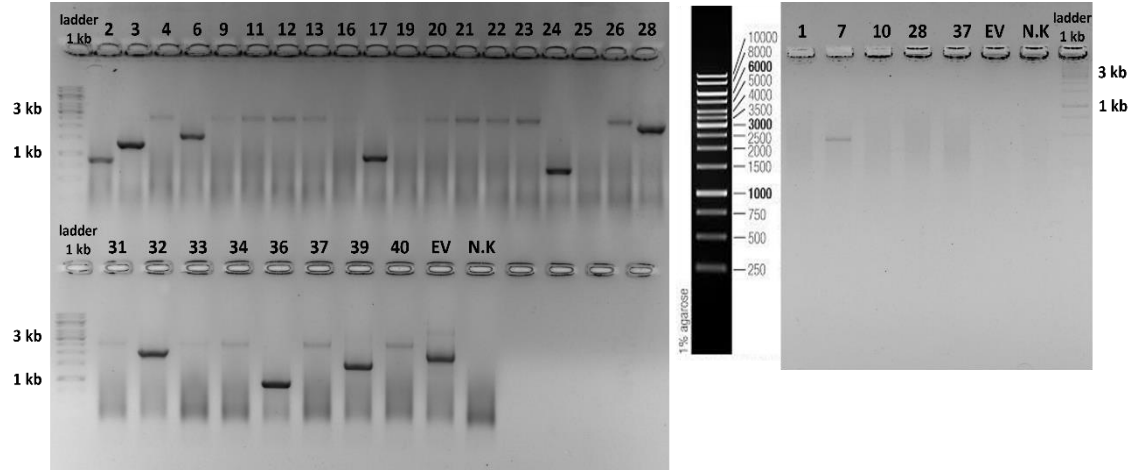
Damlatma testinde dayanıklı görülen koloniler aynı şekilde sıvı ortamda büyütülerek artan dozlarda ve hiç borik asit içermeyen katı besiyerine 5 µl olacak şekilde seri dilüsyon (OD_{600} 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002) yapılmıştır. Seri dilüsyon sonucunda #5, #8, #14, #15, #18, #29, #30 ve #35 numaralı örneklerin dayanıklılığını sürdüremediği görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Artan dozlarda borik asit (0, 80, 100, ve 150 mM H_3BO_3) içeren YNB (-Ura) ortamlarında seri dilüsyon sonucu dayanıklı bulunan koloniler

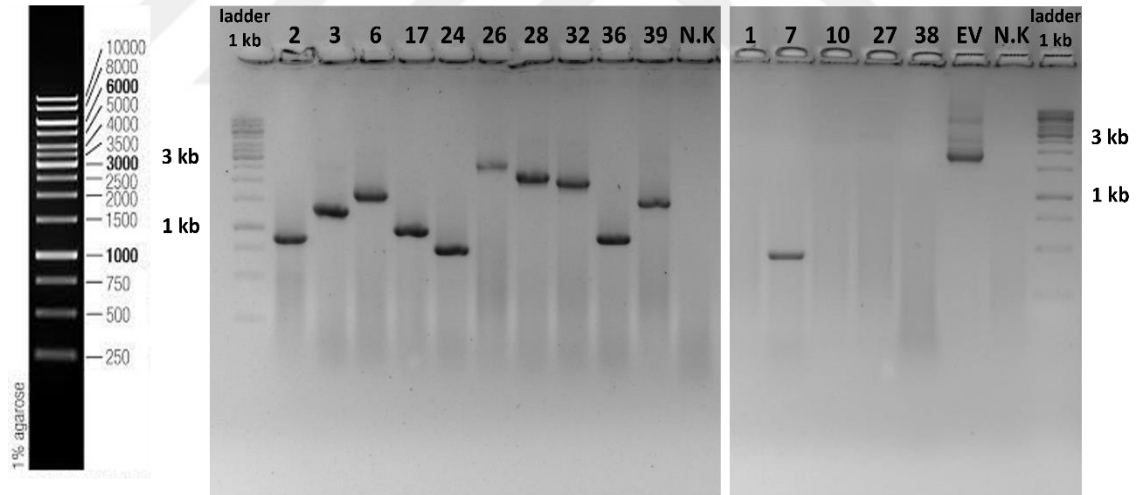
4.4. Dayanıklı Kolonilerden Maya Plazmit İzolasyonu ve *E. coli* Plazmit İzolasyonu

Seri dilüsyon sonucu dayanıklılığı gösterilmiş kolonilerden GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak maya koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.7). PCR sonuçlarına göre 11 koloni farklı bant boyutu verirken, 17 koloni aynı bant boyutu vermiştir. cDNA'ların sekans boyutlarının ~750 ila ~2500 baz çifti arasında değiştiği saptanmıştır. Aynı bant boyutu veren örneklerin ifadesi yüksek bir gen olduğu düşünülerek temsilen #26 numara seçilmiştir.



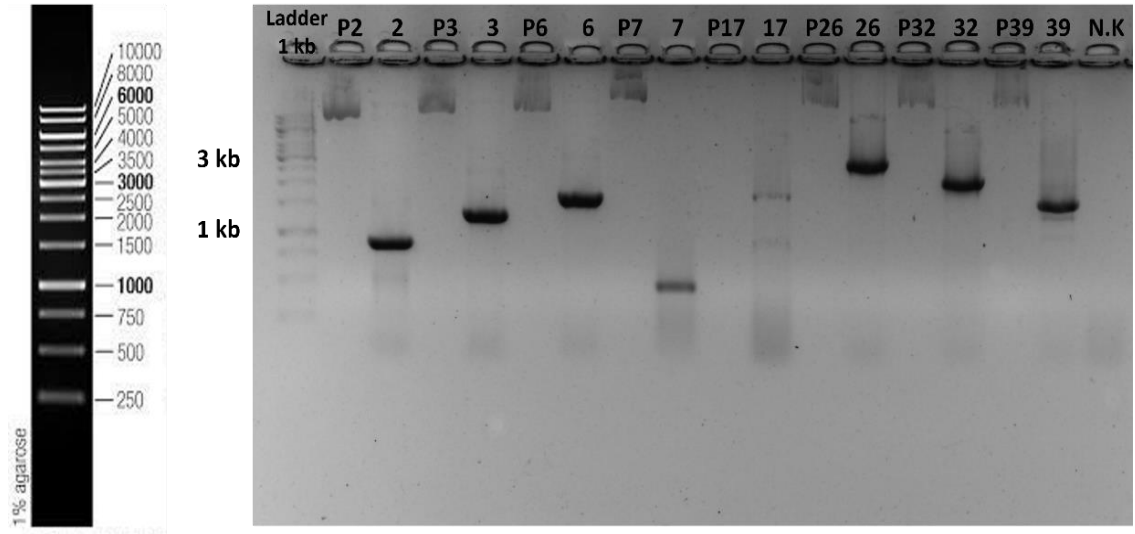
Şekil 4.7. Dayanıklı mayalardan GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak yapılan maya koloni PCR jel görüntüsü, EV: *atr1Δ*-pAG426GPD-ccdB, N.K: negatif kontrol (templete içermeyen)

Toplam 15 mayadan Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research) kiti ile plazmit izole edilmiştir. Maya plazmitleri ile GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Buna göre 11 plazmitten PCR amplifikasyonu alınabilmektedir (Şekil 4.8).



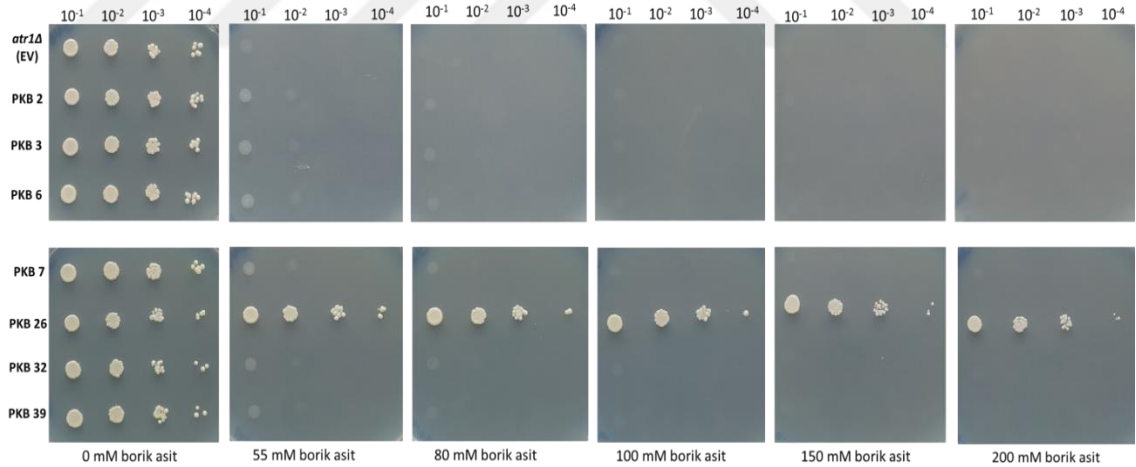
Şekil 4.8. Mayalardan izole edilen plazmitlerin GPDpro-F ve CYC1-R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması, EV: *atr1Δ*-pAG426GPD-ccdB, N.K: negatif kontrol (templete içermeyen)

Mayadan izole edilen plazmitlerin *E. coli*'ye (DH5α) transformasyonu ısı şoku yöntemiyle gerçekleştirilmiş, 8 plazmitin transformasyonu pozitif çıkmıştır. Plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. Plazmitlerden GPDpro-F ve CYC1 primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. Plazmitler ve PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.9).



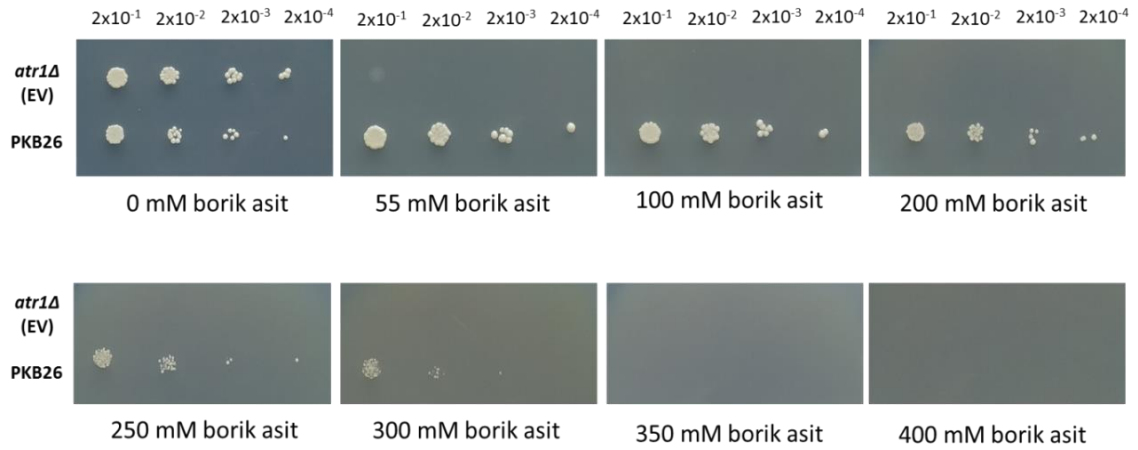
Şekil 4.9. *E. coli*'den izole edilen plazmitler ve PCR ürünleri, P: Plazmit; #2: PCR ürünü, N.K: negatif kontrol

Elde edilen plazmitler, tekrar dayanıklılık sağlayıp sağlamadığının test edilmesi amacıyla mayaya LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü (Gietz ve Schiestl 2007) ile tekrar transforme edilmiştir (Re-transformasyon). Artan dozlarda borik asit içeren YNB besiyerlerine seri dilüsyon yapılmış ve sadece #26 numaralı koloninin dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Re-transformasyon sonrası mayaların artan dozlarda (0, 55, 80, 100, 150, 200 mM H₃BO₃) borik asitli ortamlarda dayanımı

PKB26 kolonisinin dayanabildiği en yüksek bor dozunun belirlenmesi amacıyla 400 mM'a kadar artan dozlarda borik asit içeren besiyerlerine seri dilüsyonu yapılmıştır (Şekil 4.11). EV'nin 55 mM' a dahi dayanamadığı bor dozunda PKB26 maya kolonisi 300 mM borik asitte hayatta kalabilmektedir.



Şekil 4.11. PKB26'nın dayanabildiği en yüksek bor dozunun belirlenmesi

4.5. Sekanslama ve Blast Analizleri

Yeni nesil sekanslama ile dayanıklı mayanın taşıdığı pAG426GPD-cDNA vektörü sekanslatılarak cDNA dizisi elde edilmiştir. NCBI blastn (Şekil 4.12) ve blastx (Şekil 4.13) kullanılarak sekansların homoloji gösterdiği nükleotit ve protein sekansları tespit edilmiştir. Buna göre cDNA sekansının farklı organizmalardaki *BOR4* geniyle homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bu yüzden gene *GpBOR4* ismi verilmiştir.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110703290), transcript variant X2...	<i>Chenopodium...</i>	1362	1362	74%	0.0	80.27%	2716	XR_002507666.1
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110703290), transcript variant X1...	<i>Chenopodium...</i>	1362	1362	74%	0.0	80.27%	3448	XM_021881068.1
☒ PREDICTED: <i>Spinacia oleracea</i> boron transporter 4-like (LOC110787892), mRNA	<i>Spinacia olera...</i>	1291	1291	79%	0.0	78.78%	2473	XM_021992531.1
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110703292), transcript variant X2...	<i>Chenopodium...</i>	1279	1279	81%	0.0	78.44%	2807	XM_021881076.1
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110703292), transcript variant X1...	<i>Chenopodium...</i>	1279	1279	81%	0.0	78.44%	2790	XM_021881075.1
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110698704), transcript variant X2...	<i>Chenopodium...</i>	1277	1277	80%	0.0	78.49%	2982	XM_021876208.1
☒ PREDICTED: <i>Chenopodium quinoa</i> boron transporter 4-like (LOC110698704), transcript variant X1...	<i>Chenopodium...</i>	1277	1277	80%	0.0	78.49%	2999	XM_021876207.1
☒ PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> boron transporter 4 (LOC104904612), transcript variant ...	<i>Beta vulgaris s...</i>	1219	1219	78%	0.0	78.35%	2484	XM_048636499.1
☒ PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> boron transporter 4 (LOC104904612), transcript variant ...	<i>Beta vulgaris s...</i>	1184	1184	74%	0.0	78.62%	2465	XM_048636498.1
☒ PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> boron transporter 4 (LOC104904614), mRNA	<i>Beta vulgaris s...</i>	1182	1182	78%	0.0	77.95%	2447	XM_048636798.1
☒ PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> boron transporter 4 (LOC104904615), transcript variant ...	<i>Beta vulgaris s...</i>	1158	1158	79%	0.0	77.58%	2647	XM_010692916.3
☒ PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> boron transporter 4 (LOC104904615), transcript variant ...	<i>Beta vulgaris s...</i>	1107	1107	74%	0.0	77.72%	2468	XM_048636562.1
☒ PREDICTED: <i>Vitis riparia</i> boron transporter 4-like (LOC117924938), mRNA	<i>Vitis riparia</i>	641	641	72%	1e-178	73.50%	2252	XM_034843682.1
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> HCO3- transporter family (BOR4), mRNA	<i>Arabidopsis th...</i>	551	551	69%	2e-151	72.90%	2579	NM_001332167.1
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> HCO3- transporter family (BOR4), mRNA	<i>Arabidopsis th...</i>	551	551	69%	2e-151	72.90%	2455	NM_101415.4
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> HCO3- transporter family (BOR4), mRNA	<i>Arabidopsis th...</i>	551	551	69%	2e-151	72.90%	2469	NM_001332166.1
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> At1g15460/T16N11_24 mRNA, complete cds	<i>Arabidopsis th...</i>	551	551	69%	2e-151	72.90%	2301	AY069887.1
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> AT1G15460 mRNA, partial sequence, clone: RAF123-11-O03	<i>Arabidopsis th...</i>	549	549	69%	8e-151	72.90%	2368	AK317661.1
☒ PREDICTED: <i>Olea europaea</i> var. <i>silvestris</i> boron transporter 4-like (LOC111367334), mRNA	<i>Olea europaea...</i>	547	547	70%	3e-150	72.81%	2365	XM_022988151.1
☒ <i>Arabidopsis thaliana</i> HCO3- transporter family (BOR4), mRNA	<i>Arabidopsis th...</i>	534	534	69%	2e-146	72.81%	2190	NM_001332168.1
☒ PREDICTED: <i>Capsella rubella</i> boron transporter 4 (LOC17899922), mRNA	<i>Capsella rubella</i>	490	490	69%	5e-133	72.16%	2484	XM_023790042.1

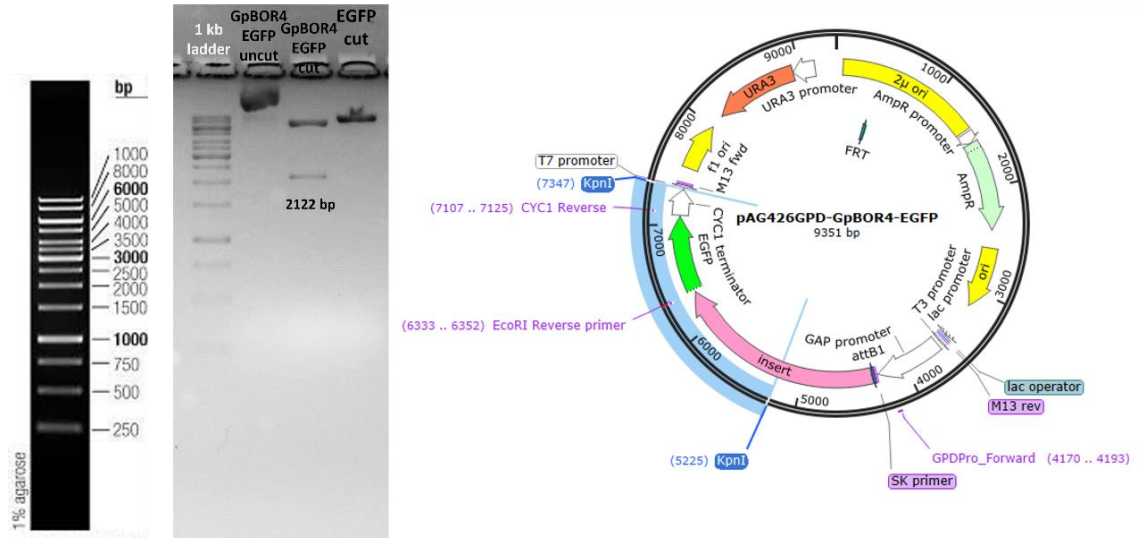
Şekil 4.12. PKB26 maya kolonisine dayanıklılık kazandıran cDNA sekansının NCBI blastn sonuçları

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	hypothetical protein KSS87_009936 (Heliosperma pusillum)	Heliosperma pusillum	1129	1129	80%	0.0	85.30%	659	KAH9612487.1
✓	boron transporter 4-like isoform X1 (Spinacia oleracea)	Spinacia oleracea	1071	1071	80%	0.0	79.82%	657	XP_021848218.1
✓	hypothetical protein SOVF_135800 (Spinacia oleracea)	Spinacia oleracea	1069	1069	80%	0.0	79.82%	657	KNA11377.1
✓	hypothetical protein KSS87_021377 (Heliosperma pusillum)	Heliosperma pusillum	1047	1047	79%	0.0	83.69%	651	KAH9615462.1
✓	boron transporter 4-like (Spinacia oleracea)	Spinacia oleracea	1047	1047	79%	0.0	79.45%	660	XP_021848223.1
✓	hypothetical protein BVRB_9q220160 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1045	1045	80%	0.0	77.44%	657	KMT00731.1
✓	boron transporter 4-like (Chenopodium quinoa)	Chenopodium quinoa	1044	1044	80%	0.0	78.64%	658	XP_021736767.1
✓	LOW QUALITY PROTEIN, boron transporter 4 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1042	1042	80%	0.0	77.13%	657	XP_048492755.1
✓	boron transporter 4-like (Chenopodium quinoa)	Chenopodium quinoa	1042	1042	80%	0.0	78.79%	658	XP_021731899.1
✓	boron transporter 4 isoform X2 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1040	1040	80%	0.0	77.00%	657	XP_048492456.1
✓	boron transporter 4-like (Spinacia oleracea)	Spinacia oleracea	1039	1039	80%	0.0	77.54%	662	XP_021848192.1
✓	boron transporter 4-like (Chenopodium quinoa)	Chenopodium quinoa	1038	1038	79%	0.0	78.93%	663	XP_021736761.1
✓	boron transporter 4 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1037	1037	79%	0.0	78.34%	650	XP_010691213.2
✓	hypothetical protein BVRB_9q220150 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1037	1037	79%	0.0	78.49%	650	KMT00730.1
✓	boron transporter 4-like (Chenopodium quinoa)	Chenopodium quinoa	1032	1032	79%	0.0	78.63%	663	XP_021731898.1
✓	boron transporter 4 isoform X1 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1030	1030	80%	0.0	76.33%	657	XP_010691218.2
✓	hypothetical protein BVRB_9q220170 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1028	1028	80%	0.0	76.44%	658	KMT00732.1
✓	boron transporter 4-like (Chenopodium quinoa)	Chenopodium quinoa	1019	1019	79%	0.0	79.02%	658	XP_021736760.1
✓	boron transporter 4 isoform X1 (Beta vulgaris subsp. vulgaris)	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1000	1000	76%	0.0	77.34%	631	XP_048492455.1
✓	Bicarbonate transporter, eukaryotic (Cochorus capsularis)	Cochorus capsularis	973	973	78%	0.0	76.55%	666	QMO54251.1
✓	boron transporter 4 isoform X1 (Populus trichocarpa)	Populus trichocarpa	971	971	80%	0.0	75.19%	665	XP_024485515.2
✓	hypothetical protein H0E87_002232 (Populus deltoides)	Populus deltoides	969	969	80%	0.0	75.41%	665	KAH8521094.1
✓	HCO3- transporter family (Arabidopsis thaliana)	Arabidopsis thaliana	944	944	80%	0.0	72.40%	683	NP_001319010.1

Şekil 4.13. PKB26 maya kolonisine dayanıklılık kazandıran cDNA sekansının NCBI blastx sonuçları

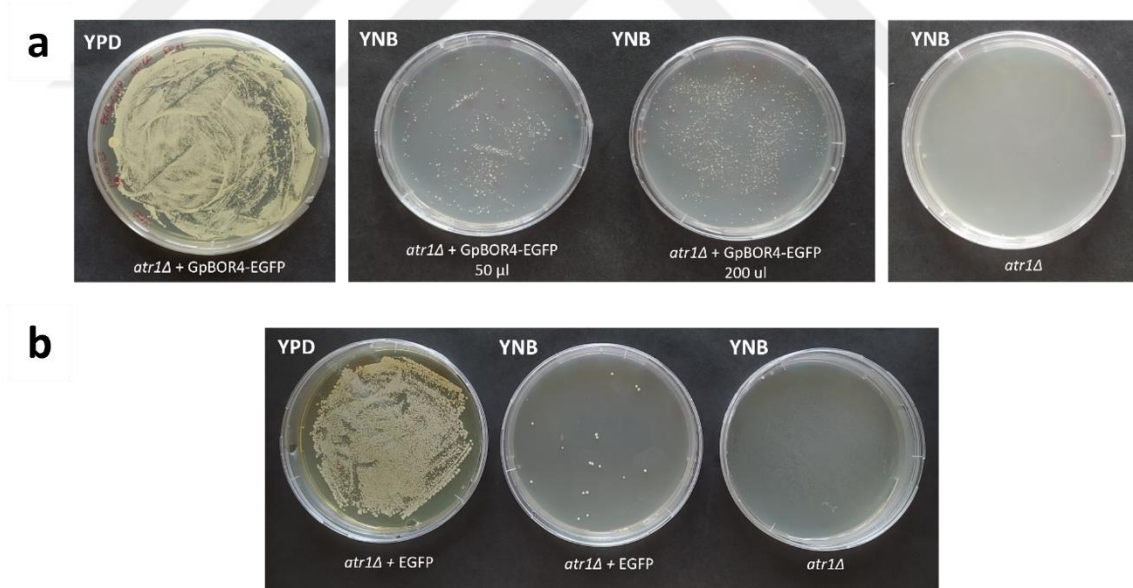
4.6. Mayada GpBOR4 Proteinin Hücre içi Lokalizasyonun Görüntülenmesi

GpBOR4-EGFP füzyon genini içeren pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörü *KpnI* restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.14). Vektör, LiAc/SS carrier DNA/PEG protokolü (Gietz ve Schiestl, 2007) kullanılarak *S. cerevisiae* BY4743 *atr1* maya hücrelerine aktarılmıştır. Aynı şekilde pozitif kontrol olarak pAG426GPD-ccdB-EGFP (Addgene plasmid # 14204) vektörü de mayaya transforme edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise daha önceki deneylerde kullanılan ve EV olarak adlandırılan pAG426GPD-ccdB (Addgene plasmid # 14156) vektörünü içeren maya kullanılmıştır.



Şekil 4.14. *KpnI* kesim enzimi ile doğrulanmış pAG426GPD- *GpBOR4-EGFP* vektörü

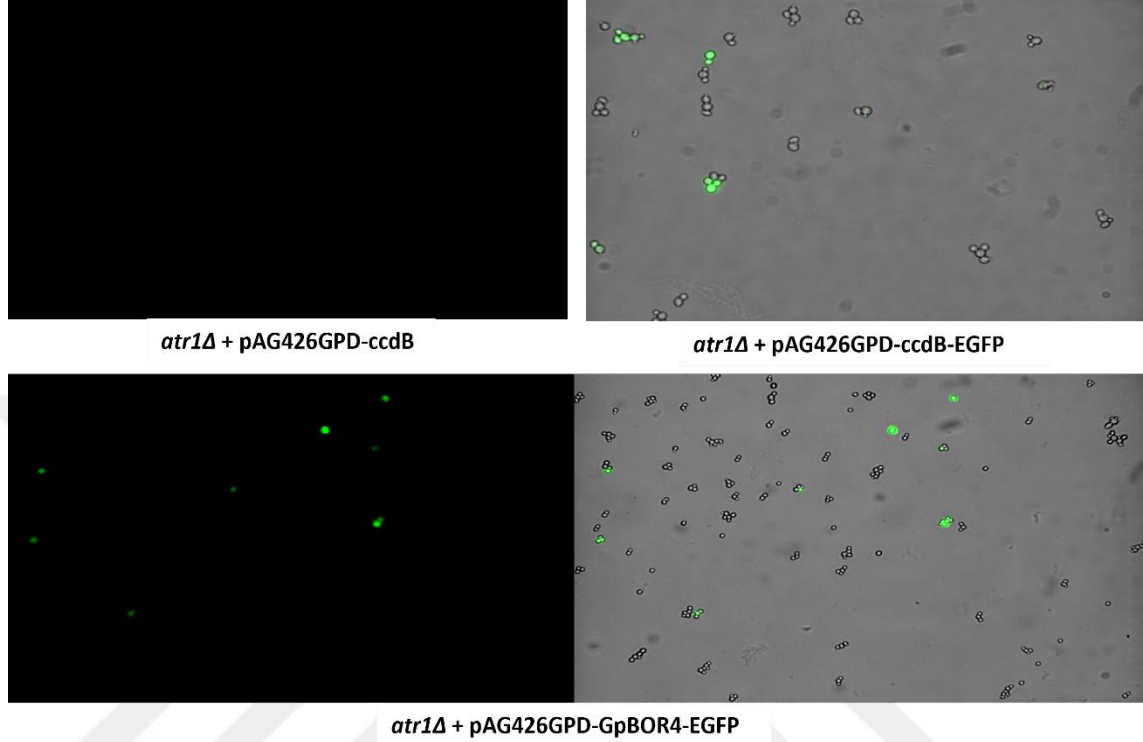
Transformasyon sonrası pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* vektörünü içeren hücreler YNB besiyerine 50 ve 200 µl, YPD' ye ise 50 µl olacak şekilde yayılmıştır (Şekil 4.15a). pAG426GPD-*ccdB-EGFP* vektörünü içeren hücreler ise YNB ve YPD besiyerlerine yayılmıştır. Kontrol olarak *atr1Δ* maya YNB besiyerine yayılmış ve herhangi bir koloni gözlemlenmemiştir (Şekil 4.15b).



Şekil 4.15. Transformasyon sonrası YNB ve YPD besiyerinde; **a)** *atr1Δ* + *GpBOR4-EGFP*; **b)** *atr1Δ* + *EGFP* vektörü içeren mayalar

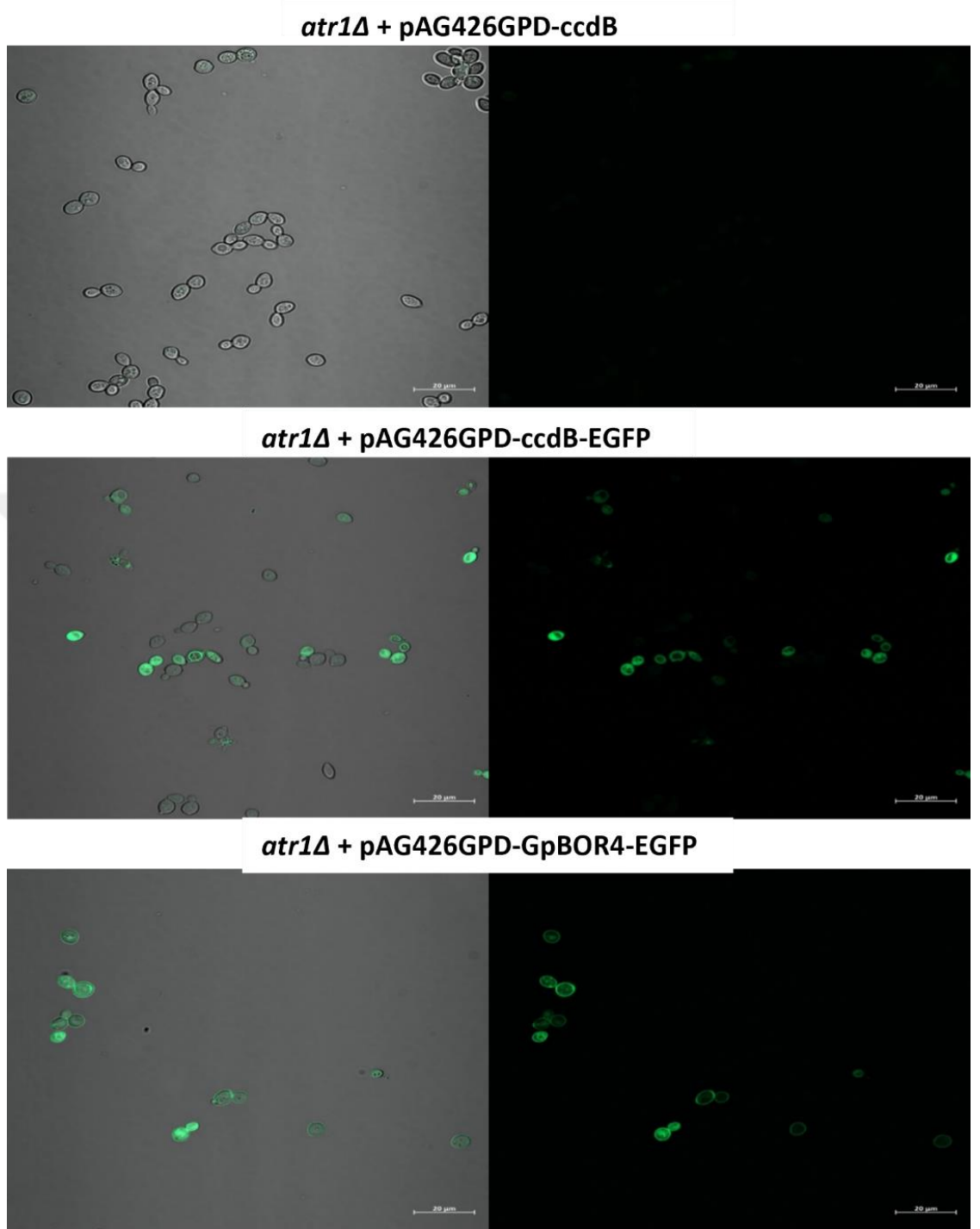
pAG426GPD-*ccdB*, pAG426GPD-*ccdB-EGFP* ve pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* (80 mM borik asit eklenmiştir) vektörlerini taşıyan mayaların her birinden birer koloni alınıp 5 ml sıvı YNB(-Ura) ortamına konulmuştur. *GpBOR4-EGFP* vektörünü taşıyan maya kültürüne 80 mM borik asit eklenmiştir. Hücreler OD₆₀₀ 0.2' den 0.6 olana kadar büyütülmüştür. Hücrelerin sabit bir şekilde mikroskopta görüntülenmesi amacıyla

lam üzerine %3'lük agaroz ped hazırlanarak her bir hücreden 10 µl alınarak lam üzerindeki agaroz üzerine damlatılmıştır ve lamel kapatılmıştır. Leica DMI8 İverted Mikroskop ile 40X'de hücrelerin GFP ışınmaları görüntülenmiştir. pAG426GPD-*ccdB* vektörünü içeren mayalarda herhangi bir GFP ışınmasına rastlanmamıştır (Şekil 4.16).



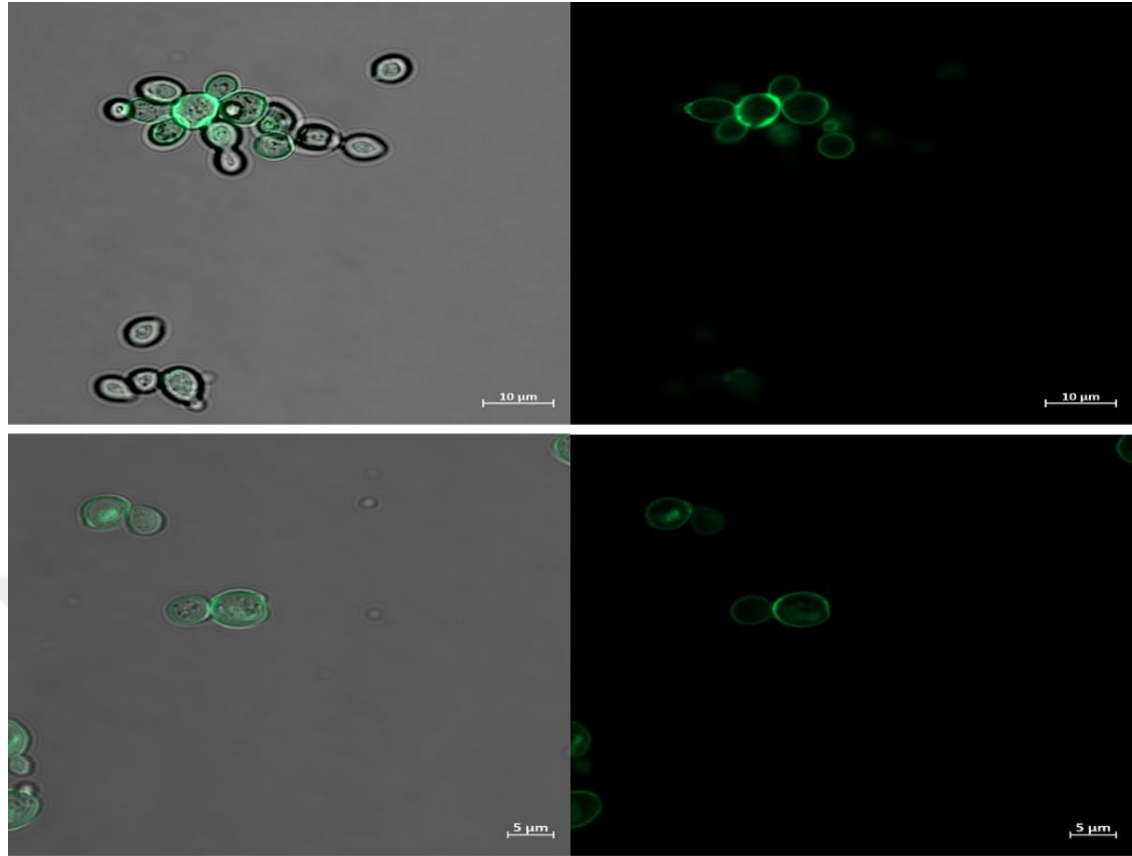
Şekil 4.16. pAG426GPD-*ccdB*, pAG426GPD-*ccdB-EGFP* ve pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* vektörünü içeren BY4743Δ*atr1* mayaların Leica DMI8 İverted Mikroskop altında GFP ışınması

Detaylı görüntü alınmak üzere hücreler ESOGÜ, Merkezi Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne götürülmüştür. Merkezin bünyesinde bulunan ZEISS LSM800 marka Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen görüntülere göre EGFP, pozitif kontrol maya hücrelerinde florasan ışınması sitoplazmaya dağınık bir şekilde görülürken, GpBOR4-EGFP ışınmasının ise plazma membranına lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. pAG426GPD-*ccdB*, pAG426GPD-*ccdB-EGFP* ve pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* vektörü içeren BY4743 Δ *atr1* mayaların ZEISS LSM800 marka Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri

pAG426GPD-*GpBOR4-EGFP* vektörünü taşıyan mayaların daha yakından (5 μ m ve 10 μ m) görüntüsü ve proteinin lokalizasyonu Şekil 4.18’de daha ayrıntılı görülmektedir.



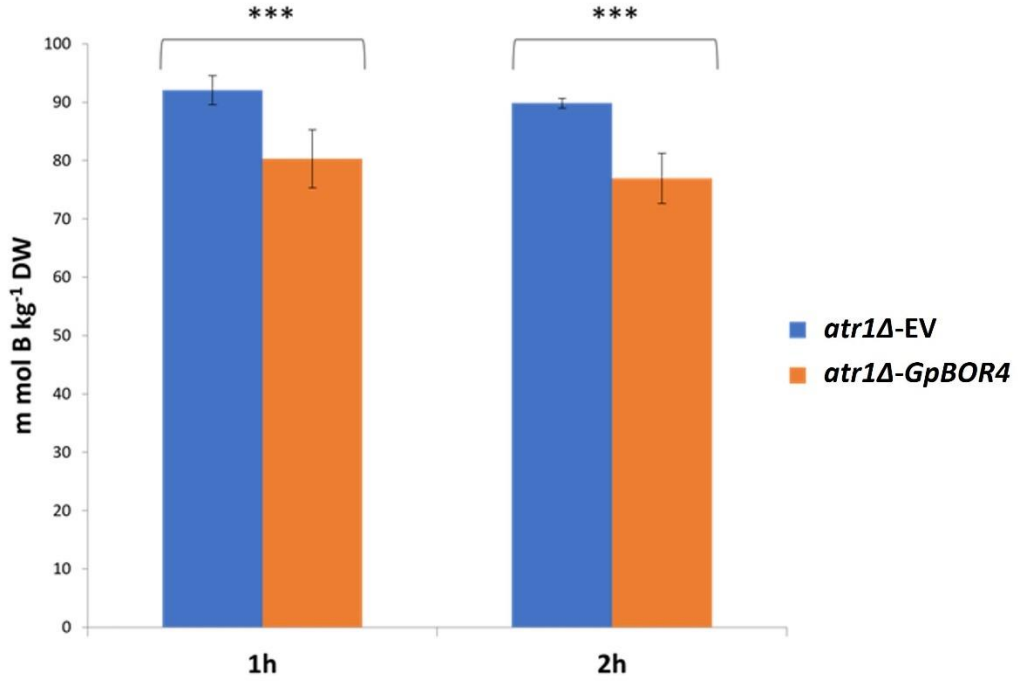
atr1Δ + pAG426GPD-GpBOR4-EGFP

Şekil 4.18. pAG426GPD-GpBOR4-EGFP vektörünü taşıyan BY4743Δ*atr1* mayanın 5 ve 10 µm görüntüsü

4.6. Mayada Hücre içi Borun Belirlenmesi

pAG426GPD-GpBOR4 ve pAG426GPD-ccdB (EV) vektörü aktarılan BY4743 ve BY4743Δ*atr1* mayaların hücre içi bor miktarları, 55 mM borik asit uygulaması sonucu hücre içi bor içerikleri suya çıkarılarak, su örneklerinden ICP-MS yapılarak belirlenmiştir. Buna göre *GpBOR4* geninin mayanın bor atımında etkili olduğu, pAG426GPD-ccdB vektörünü içeren mayalarla karşılaştırıldığında belirgin bir farkla ortaya konulmuştur. Bu durum her iki hücre tipi için de geçerli olmuştur (BY4743 ve BY4743Δ*atr1*). 1 saat ve 2 saat borik asit uygulaması sonucu, 2. saatte hücre içi bor miktarlarında 1. saate göre daha fazla düşüş gözlemlenmiştir. Bu da borun zamana bağlı olarak hücreden daha fazla atıldığını göstermektedir.

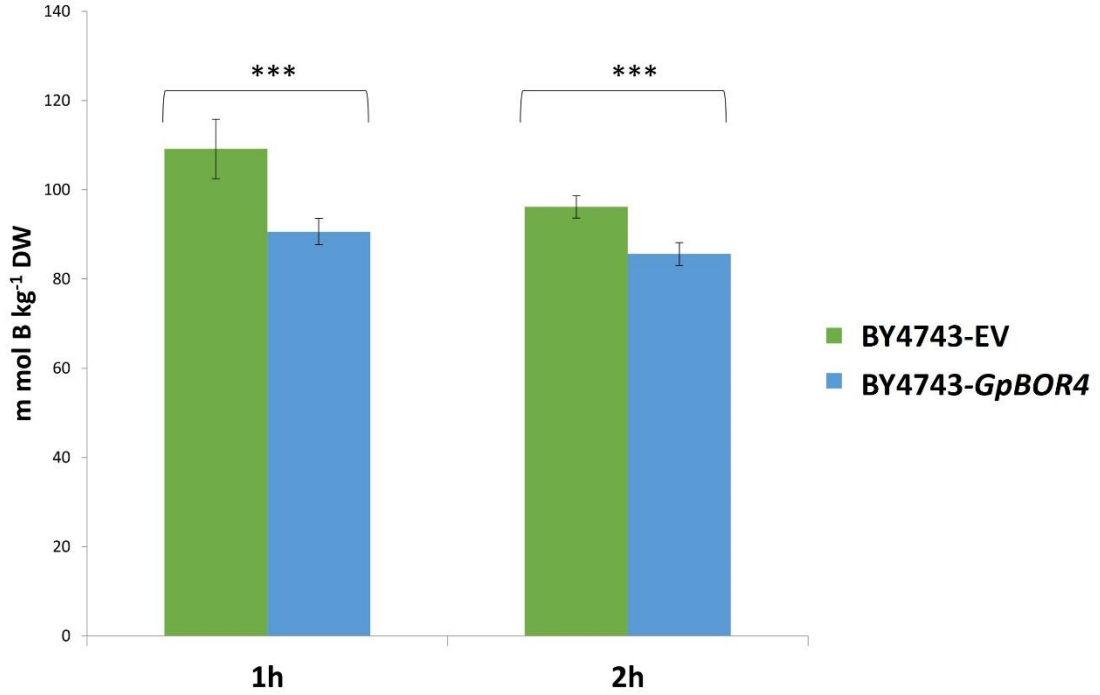
atr1Δ-EV maya hücreleri 1. saatteki bor içeriği 92.06 ± 2.49 mmol B kg⁻¹ bulunurken, *atr1Δ*-*GpBOR4* maya hücreleri ise 80.29 ± 4.99 mmol B kg⁻¹ içermektedir. 2. saatte ise hücreler sırasıyla 89.80 ± 0.81 mmol B kg⁻¹, 76.95 ± 4.31 mmol B kg⁻¹ içermektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 55 mM borik asit uygulaması sonucu *atr1Δ-GpBOR4* ve *atr1Δ-EV* mayalarının 1. ve 2. saatlerdeki hücre içi bor miktarları, ANOVA sonucuna göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$), ancak saatler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$), (Her bir sütun, 3 biyolojik tekrarın ortalaması olup, hata çubukları o gruba ait standart hatayı temsil etmektedir.)

BY4743-EV maya hücreleri de 1.ve 2. saatte BY4743-*GpBOR4*'e kıyasla daha fazla hücre içi bora sahiptir. Ancak saatler arasında düşüş olmasına rağmen fark az bulunmuştur. BY4743-EV 1. saatte 109.14 ± 6.67 mmol B kg⁻¹ iken, 2. saatte 96.13 ± 2.51 mmol B kg⁻¹ dır (Şekil 4.20).

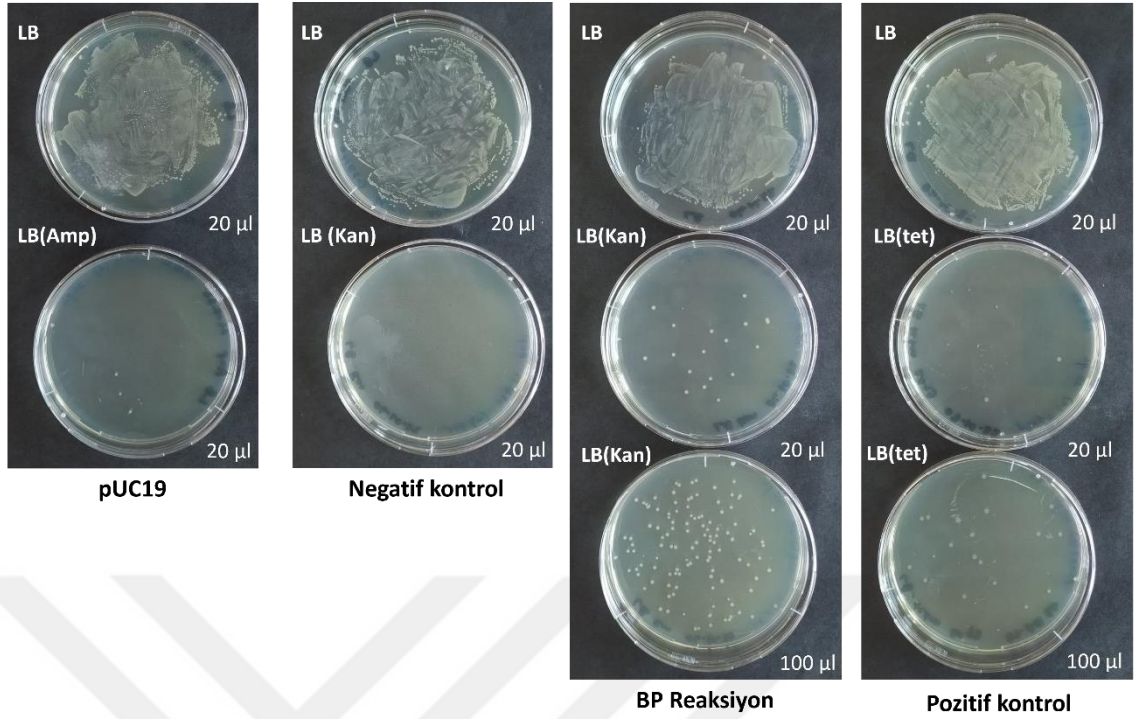
atr1Δ-GpBOR4 ise 1. saatte 90.63 ± 2.90 mmol B kg⁻¹ , 2. saatte ise 85.60 ± 2.56 mmol B kg⁻¹ olarak bulunmuştur. Yani saatler arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır.



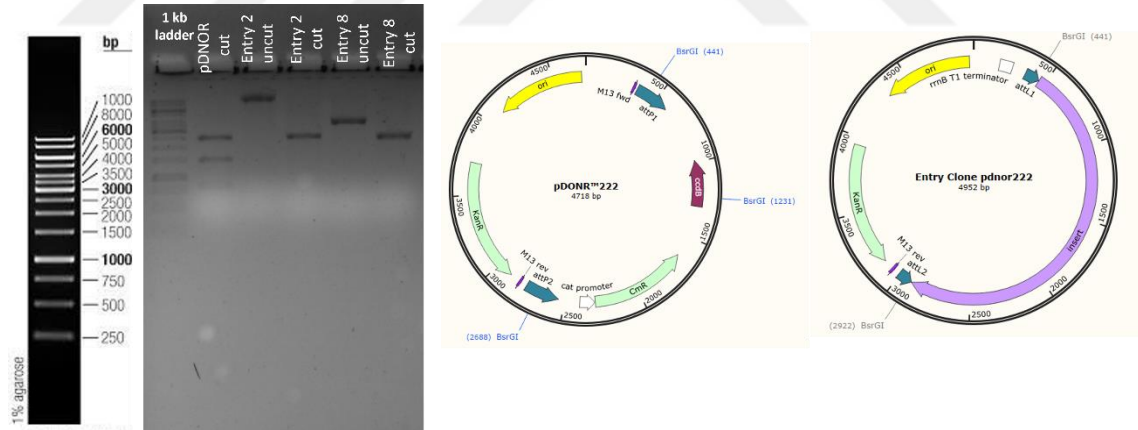
Şekil 4.20. 55 mM borik asit uygulaması sonucu BY4743-GpBOR4 ve BY4743-EV mayalarının 1. ve 2. saatlerdeki hücre içi bor miktarları, one-way ANOVA sonucuna göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$), ancak saatler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$), (Her bir sütun, 3 biyolojik tekrarın ortalaması olup, hata çubukları o gruba ait standart hatayı temsil etmektedir.)

4.7. *GpBOR4* cDNA'sının Bitki İfade Vektörüne Klonlanması

pAG426GPD-*GpBOR4* maya ekspresyon vektöründen attB1-attB2 bölgelerinin arasındaki cDNA önce BP reaksiyonla Gateway™ pDONR222 vektörüne aktarılmıştır. Reaksiyon ürünü DH5α' ya ısı şoku yoluyla transforme edilmiştir (Şekil 4.21). Transformasyon sonrası kolonilerden plazmit izolasyonu ile *GpBOR4* cDNA bölgesini içeren ve Entry clone olarak adlandırılan vektör elde edilmiştir. Entry clone ve pDONR vektör *BsrGI* restriksiyon kesimi ile doğrulanmıştır. Bu kesime göre agaroz jel elektroforezinde pDONR vektörü üç parçaya (790, 1457 ve 2471 bp), Entry clone-*GpBOR4* ise iki parçaya (2471, 2481 bp) ayrılmıştır (Şekil 4.22).

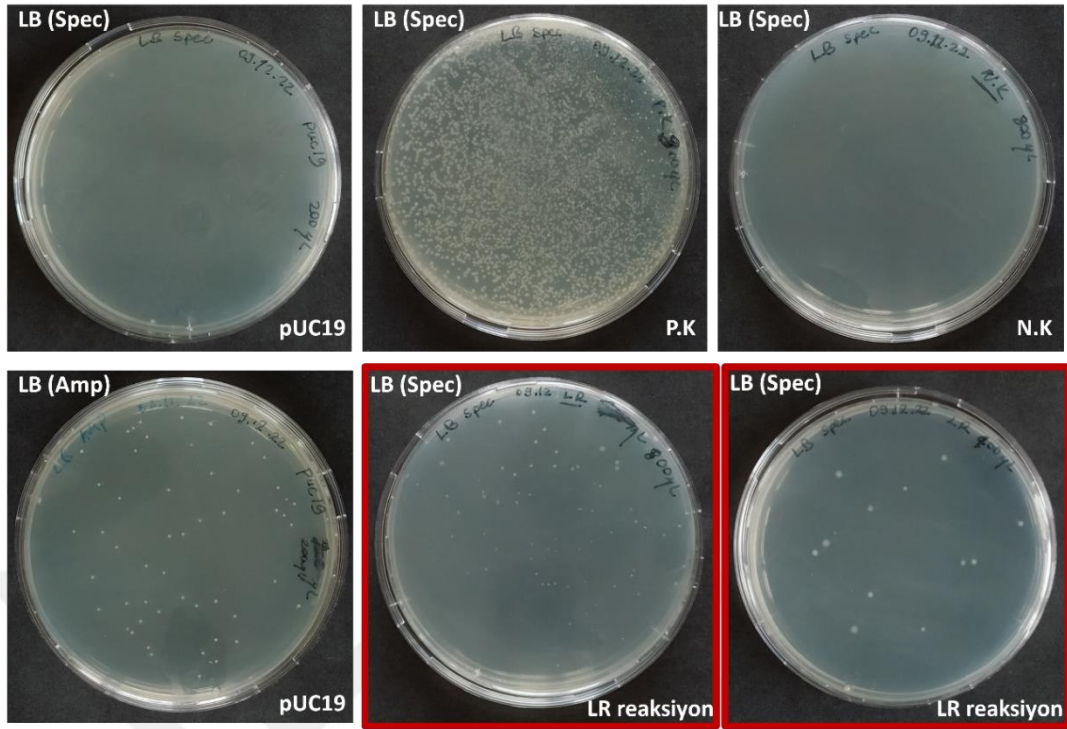


Şekil 4.21. BP reaksiyon ürününün ısı şoku yöntemiyle DH5α *E. coli* hücrelerine transformasyonu sonrası antibiyotikli ve antibiyotiksiz ortamlardaki seçilimi

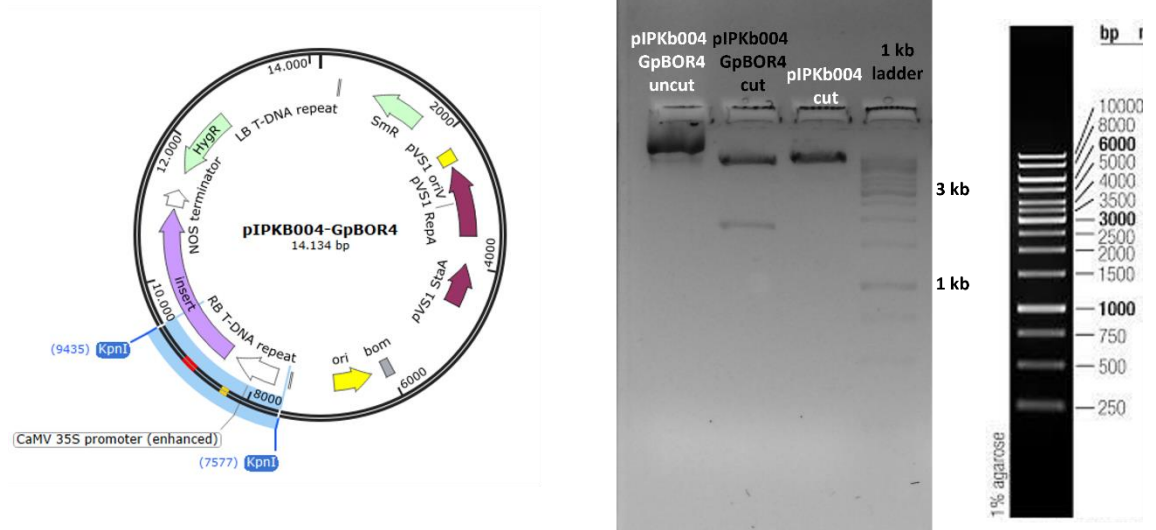


Şekil 4.22. pDNOR ve Entry clone-*GpBOR4*'ün *BsRGI* enzimiyle kesimi

attL1-attL2 bölgelerinin arasında kalan cDNA, bitki ekspresyon vektörüne (pIPKb004) LR reaksiyonla GATEWAY klonlama prensibi kullanılarak aktarılmıştır. Reaksiyon ürünü, pU19 vektörü, negatif kontrol (N.K), pozitif kontrol (P.K) ısı şoku yöntemiyle DH5α *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır (Şekil 4.23). Plazminin doğruluğu *KpnI* restriksiyon enzimi ile kesilerek belirlenmiştir. Bu kesime göre pIPKb004-*GpBOR4* vektörü 1.858 ve 12.276 bp olacak şekilde bant oluşturmuştur. pIPKb004 boş vektörü ise tek yerden kesildiği için lineer bir tek bant vermiştir (Şekil 4.24). Ayrıca yeni nesil sekanslama ile vektörün dizi bilgisi doğrulanmıştır.



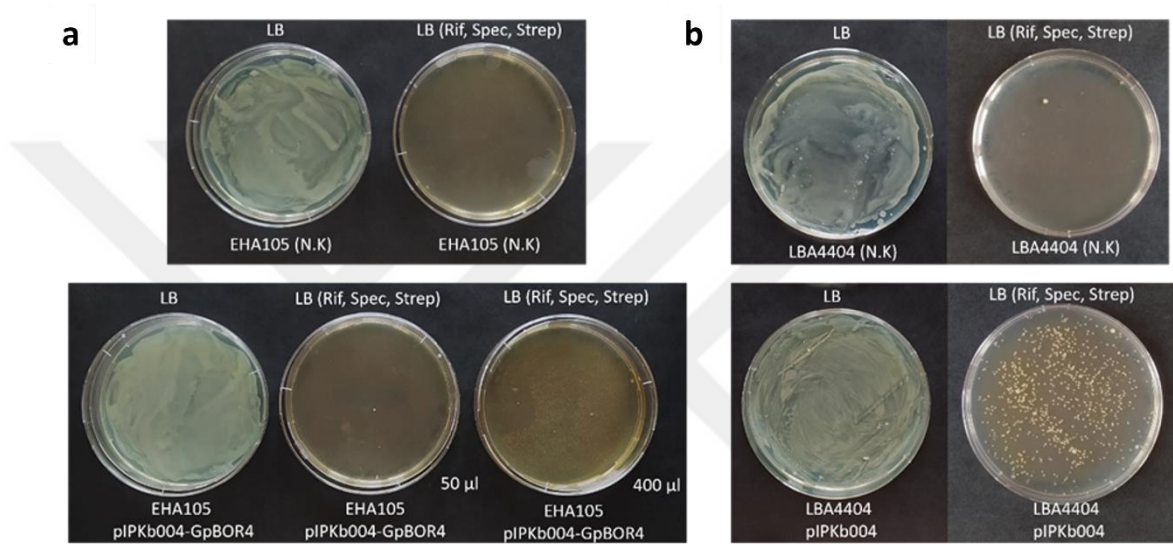
Şekil 4.23. LR reaksiyon ürünü, pU19 vektörü, negatif kontrol (N.K) ve pozitif kontrolün (P.K) ısı şoku yöntemiyle DH5α *E. coli* hücrelerine transformasyonu sonrası antibiyotikli ortamlardaki seçilimi



Şekil 4.24. pIPKb004-GpBOR4 ve pIPKb004 vektörlerinin *KpnI* enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

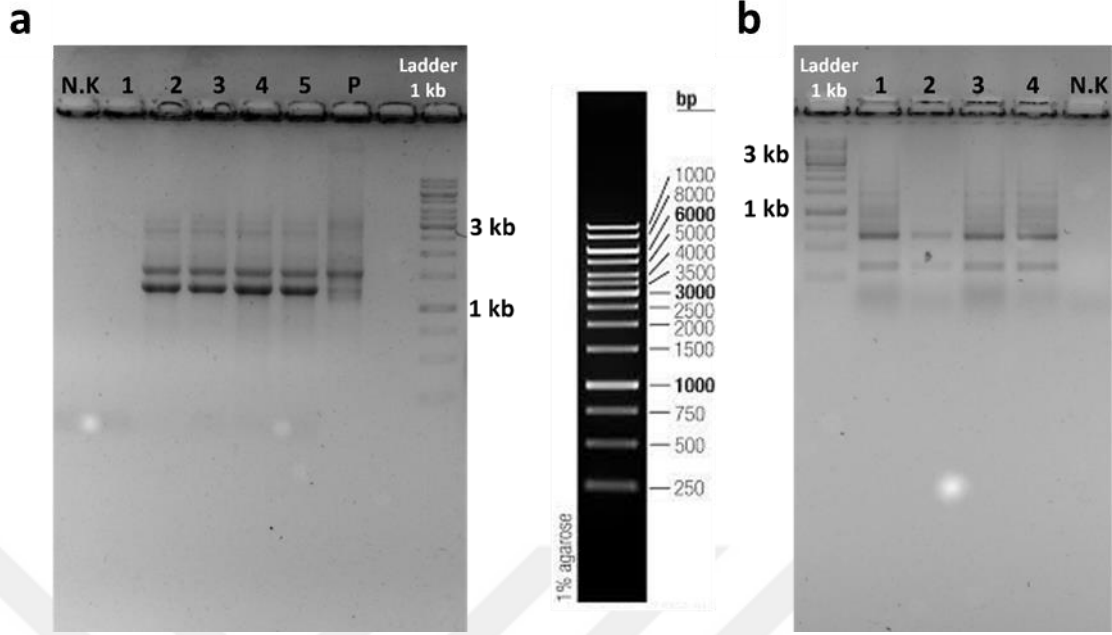
4.8. İfade Vektörlerinin *Agrobacterium tumefaciens*'e Transformasyonu ve Floral Dip ile Arabidopsise Aktarılması

GpBOR4 cDNA'sını içeren bitki ekspresyon vektörü (pIPKb004-*GpBOR4*) elektroporasyon ile *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşuna transforme edilmiştir (Şekil 4.25a). Ayrıca Mock vektör de (pIPKb004) kontrol olarak LBA4404'e transforme edilmiştir (Şekil 4.25b). Pozitif koloniler uygun rifampisin (25 µg/mL), streptomisin (100 µg/mL), spectinomisin (100 µg/mL) içeren LB besiyerlerinde seçilmiştir. Antibiyotikli petrilere 50 ve 400 µl yayılan hücrelerden her iki petride de koloni oluşu gözlemlenmiştir. Buna karşın negatif kontrol petrisinde herhangi bir koloni oluşumu gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.25. a) pIPKb004-*GpBOR4* vektörü aktarılmış *A. tumefaciens* EHA105; **b)** pIPKb004 vektörü (mock) aktarılmış *A. tumefaciens* LBA4404 suşunun rifampisin (25 µg/mL), streptomisin (100 µg/mL), spectinomisin (100 µg/mL) içeren LB ve antibiyotiksiz LB besiyerlerinde seçilimi

Antibiyotik içeren petrilere seçilen kolonilerle PCR kurularak *Agrobacterium* hücrelerinin aktardığımız vektörleri içerip içermediği kontrol edilmiştir. Buna göre pIPKb004-*GpBOR4* vektörü aktarılmış EHA105 kolonilerine 35S_F ve qyPKB_R (gen spesifik) primerleri ile yapılan PCR sonucunda 1559 ve 1232 bp bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.26a). pIPKb004 vektörü (mock) aktarılmış LBA4404 kolonilerinde ise 35S_F ve 35S_R primerleri ile yapılan PCR sonucunda 323 ve 650 bp bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.26b).



Şekil 4.26. a) pIPKb004-*GpBOR4* vektörü aktarılmış EHA105 kolonilerine 35S F-qyPKB_R primerleri ile yapılan PCR sonucu, P: plazmit PCR, N.K: negatif kontrol, **b)** pIPKb004 vektörü (mock) aktarılmış LBA4404 kolonilerinden yapılan PCR sonucu N.K: negatif kontrol

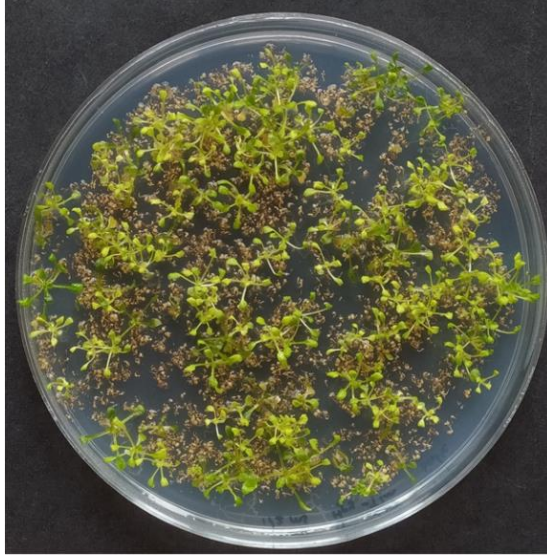
SALK enstitüsünden temin edilen T-DNA insersiyon mutanları olan *Atbor4* (SALK_133793) ve WT (Yabanıl ırk: Columbia-0) *A. thaliana* tohumlarının ekimi yapılmış ve çiçek açma aşamasına gelen uygun bitkiler floral dip için kullanılmıştır. Bitki ekspresyon vektörü (pIPKb004-*GpBOR4*) ve Mock vektör (pIPKb004) *Agrobacterium*-aracılı transformasyon (Zhang ve ark.,2006) ile Col-0 ve *bor4* *A. thaliana*'ya floral dip yapılmıştır.

pIPKb004-*GpBOR4* vektörü aktarılmış EHA105 *A. tumefaciens* hücreleri kullanılarak Col-0 ve *bor4* *A. thaliana*'ya yapılan floral dip sonrası bitkiler silik oluşturup kurumaya başlayana kadar sulanıp daha sonra tamamen kuruyana kadar büyütme kabinde tutulmuştur. Yaklaşık bir ay sonra kuruyan tohumlar toplanmıştır. Oda sıcaklığında 3-4 gün kurutulduktan sonra +4 °C dolapta muhafaza edilmiştir.

4.9. Transgenik Bitkilerin Seçimi

Floral dip sonucunda elde edilen tohumlar ½ MS (25 µg/mL hygromycin + 100 µg/mL timentin) besiyerine ekildikten 2 hafta sonra transgenik bitkiler tek bir petri kabında sayılarak, transformasyon oranları hesaplanmıştır. Buna göre transformasyon oranı sırasıyla *bor4*/pIPKb004-*GpBOR4* ve Col-0/pIPKb004-*GpBOR4* petrilerinde %0,96 ve % 3,59 olarak bulunmuştur.

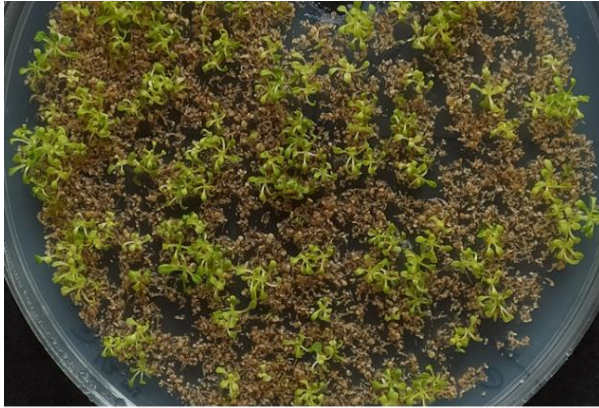
bor4/pIPKb004-*GpBOR4* ve Col-0/pIPKb004-*GpBOR4* petrilerinden 24'er bitki seçilerek toprağa aktarılmıştır ve aynı şartlarda büyütme kabinde tohum verip tohumlar sararana kadar sulanmıştır (Şekil 4.27, Şekil 4.28).



Ekilen tohum	Aday transgenik bitkiler
6204	60
6204x4 petri= 24816	240



Şekil 4.27. Floral dip sonucu elde edilen potansiyel transgenik bitkiler *bor4/pIPKb004-GpBOR4* ve transformasyon oranı

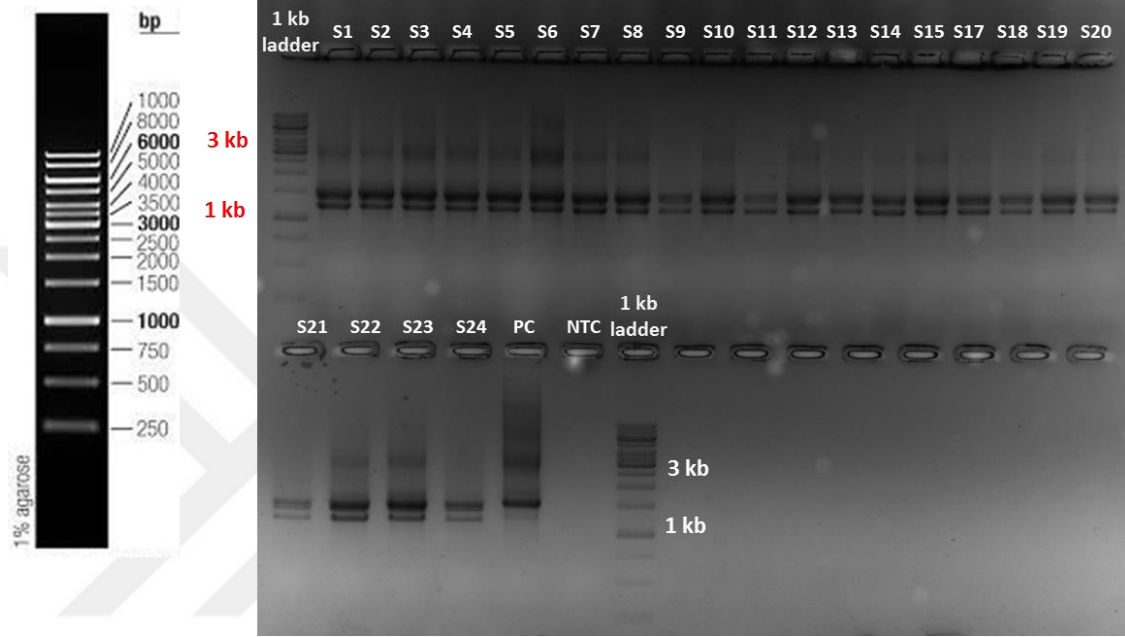


Ekilen tohum	Aday transgenik bitkiler
7796	280
7796x3 petri= 23.388	840

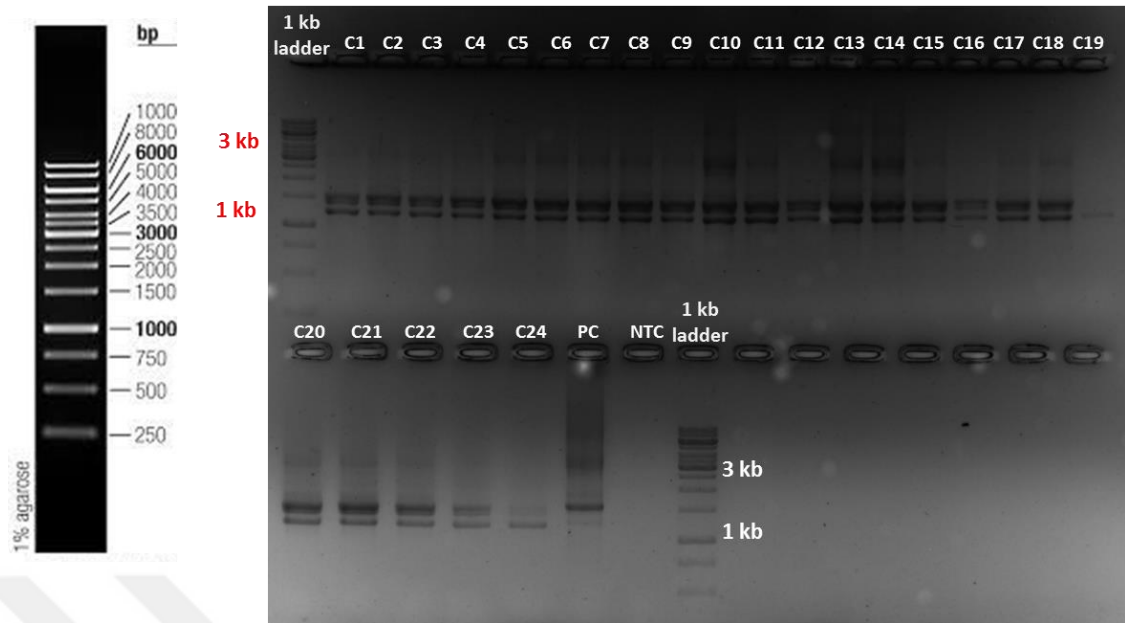


Şekil 4.28. Floral dip sonucu elde edilen potansiyel transgenik bitkiler *Col-0/pIPKb004-GpBOR4* ve transformasyon oranı

Toprağa aktarılan Col-0 ve *bor4* bitkileri belirli büyüklüğe ulaşınca yapraklarından örnek alınarak CTAB ile DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle 1991). pIPKb004-*GpBOR4* vektörünün üzerinde bulunan 35S_F ve *GpBOR4* geninin içinde bulunan qyPKB_R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 35S promotörü enhanced olduğu için sekans tekrarı bulundurmaktadır. Bu yüzden 35S_F primeri promotor üzerinde iki hedef bölgeye bağlanmaktadır. Bu yüzden PCR sonucunda 1232 ve 1559 bp boyutunda iki bant elde edilmiştir. Bitkilerin 35S-*GpBOR4* gen bölgesini genomunda taşıdığı doğrulanmıştır (Şekil 4.29 ve 4.30).

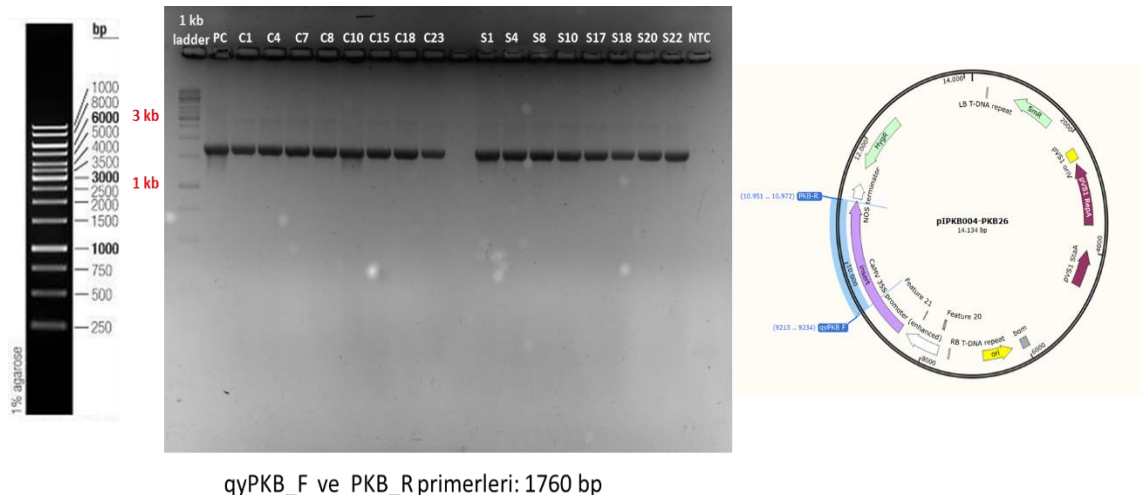


Şekil 4.29. pIPKb004-*GpBOR4* vektörünü içeren transgenik Salk_133793 (*bor4*) bitkilerinin 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile kurulan PCR sonucunun jel elektroforezinde görüntüsü. S: Salk_133793 (*bor4*), PC: positive control (pIPKb004), NTC: non-template control



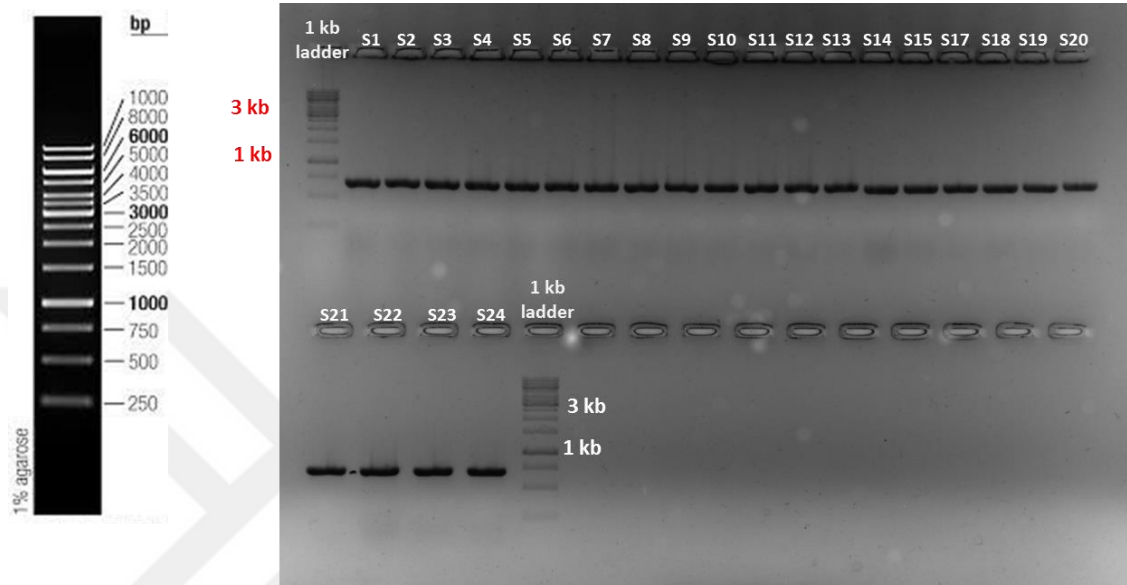
Şekil 4.30. pIPKb004-*GpBOR4* vektörünü içeren transgenik Col-0 bitkilerinin 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile PCR sonucu jel elektroforezinde görüntüsü. C: Col-0, PC: positive control(pIPKb004), NTC: non-templete control

23 adet Salk_133793 (*bor4*) hattından ve 24 adet Col-0 hattından ayrı ayrı olmak üzere 8'er hat seçilmiştir. Bu hatların DNA'ları ile *GpBOR4* geninin içinden çoğaltacak qyPKB_F ve PKB_R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Beklenen bant boyutu 1760 bp'dir ve tüm hatlarda beklenen bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.31). Bu sayede transgenik bitkiler iki kez doğrulanmıştır.

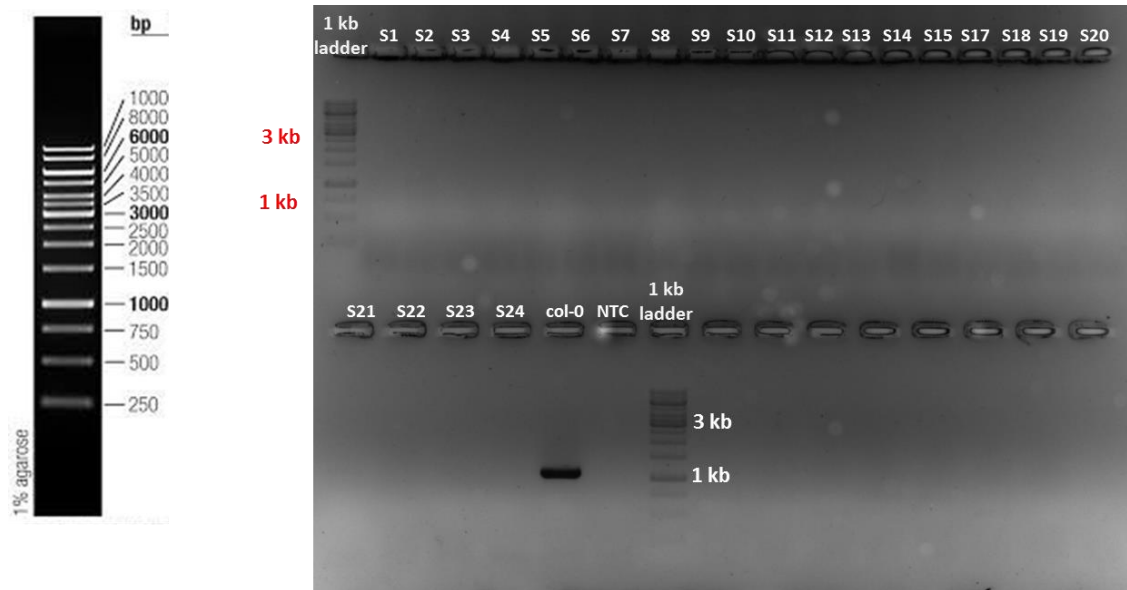


Şekil 4.31. pIPKb004-*GpBOR4* vektörünü içeren transgenik col-0 ve Salk_133793 (*bor4*) bitkilerinin gen spesifik qyPKB_F - PKB_R primerleri ile PCR reaksiyonu sonucu jel elektroforezinde görüntüsü. C: Col-0, S: Salk_133793 (*bor4*), PC: positive control (pIPKb004), NTC: non-templete control

Salk_133793 (*bor4*) hatları *BOR4* geni bakımından mutanttır. Bu hatların mutasyonu T-DNA insersiyonu genotiplendirme PCR'ı ile kısaca T-DNA PCR (SALK133793_RP ve ATLBb1.3 primerleri) ve WT (wild type) PCR (SALK133793_LP ve SALK133793_RP primerleri) ile test edilmiştir. PCR sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir, buna göre 24 pIPKb004-*GpBOR4* vektörünü içeren transgenik Salk_133793 (*bor4*) hattının tamamının homozigot *bor4* mutant olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33).

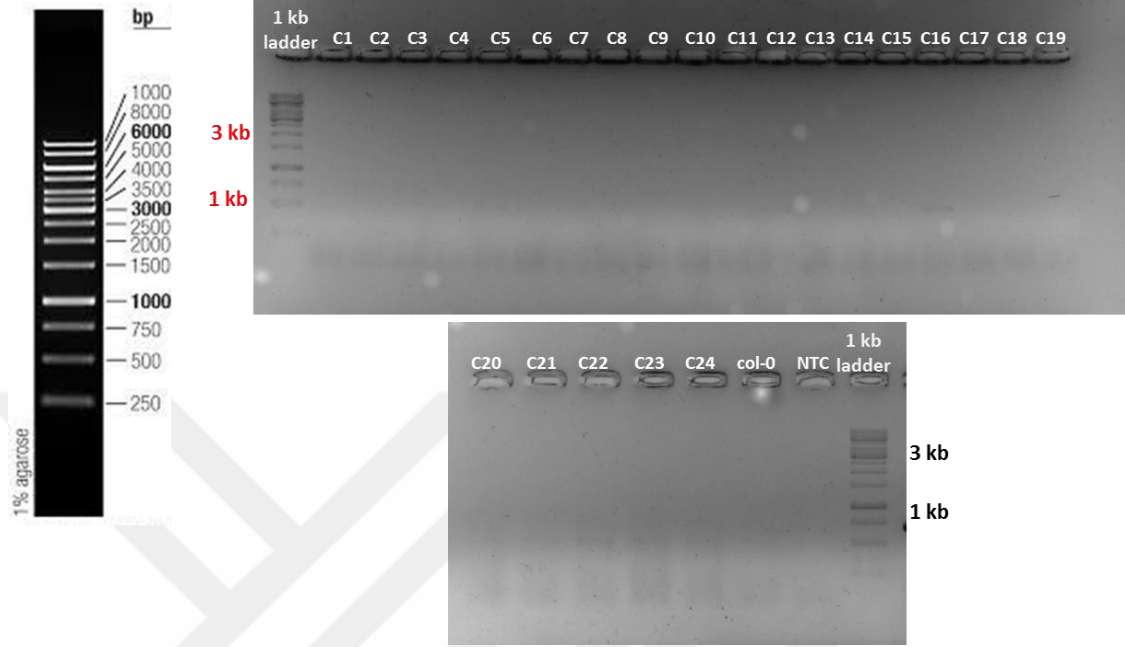


Şekil 4.32. Salk_133793 (*bor4*) hatlarının T-DNA PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, S: Salk_133793 (*bor4*)

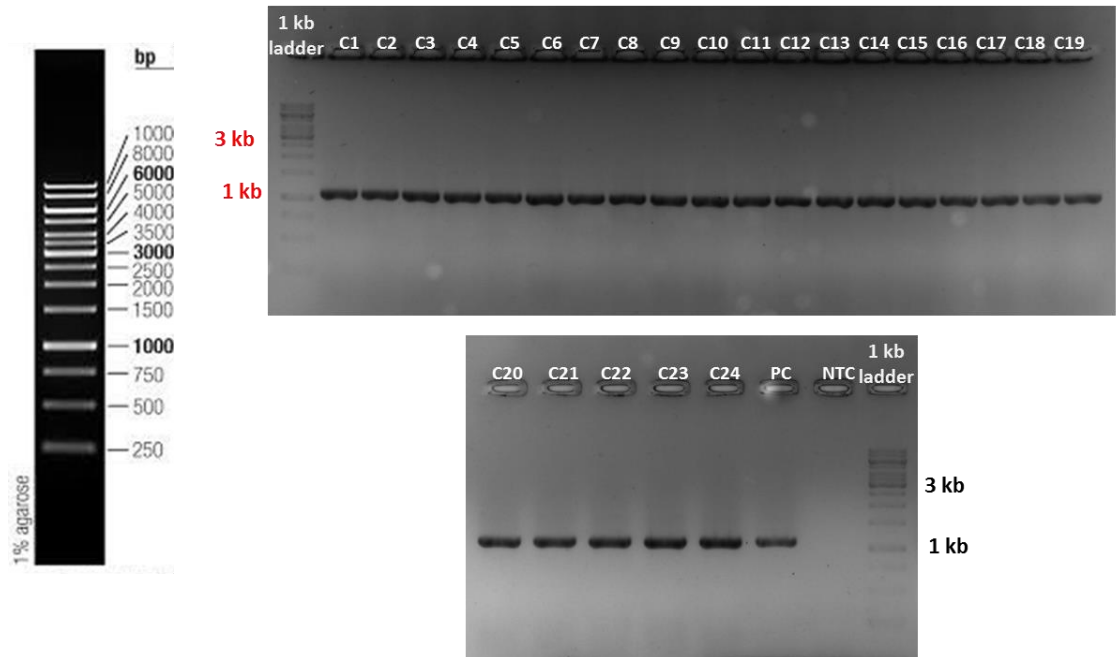


Şekil 4.33. Salk_133793 (*bor4*) hatlarının WT PCR sonucu jel elektroforezinde görüntüsü, S: Salk_133793 (*bor4*), NTC: non-template control

Col-0 bitkileri *BOR4* geni bakımından bir mutasyon taşımadıkları için T-DNA PCR’ da (Şekil 4.34) herhangi bir bant elde edilmezken, WT PCR (Şekil 4.35) sonucunda tüm hatlarda bant elde edilmiştir. Bu profil Col-0 hatlarının *BOR4* geni bakımından homozigot olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.34. Col-0 hatlarının T-DNA PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, C: col-0, NTC: non-templete kontrol



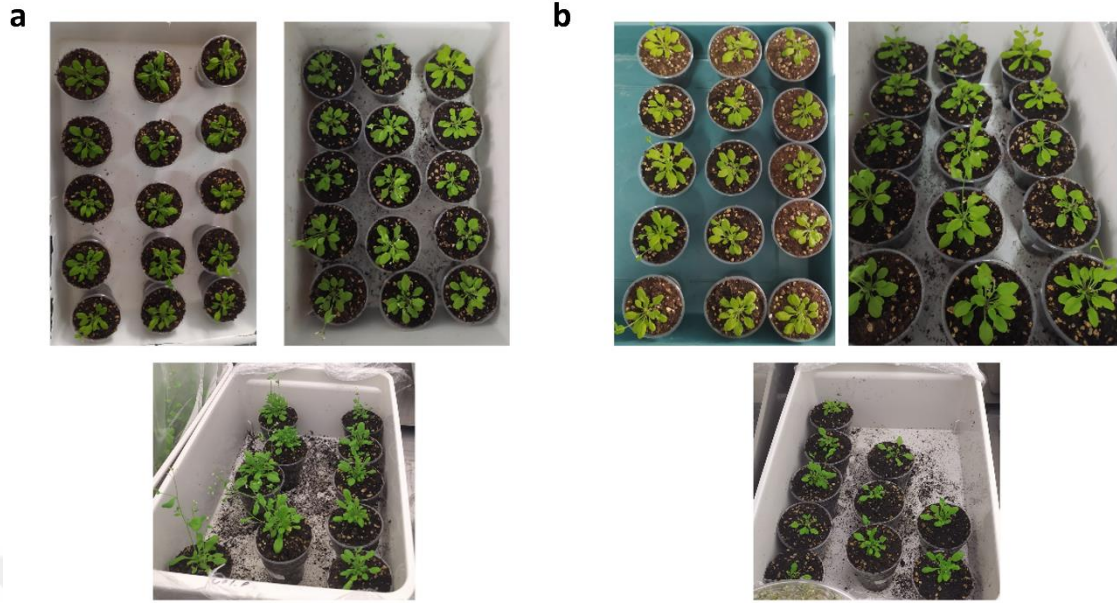
Şekil 4.35. Col-0 hatlarının WT PCR sonucunun jel elektroforezinde elde edilen görüntüsü, C: Col-0, PC: pozitif kontrol, NTC: non-templete kontrol

Çeşitli PCR reaksiyonları ile doğrulanan transgenik bitkilerden tohum toplanarak kurutulmuş ve 4 °C’de saklanmıştır. Sterilizasyonu yapılmış 7 tane Col-0/*GpBOR4* hattı ve Col-0/Mock, 7 tane Salk_133793 (*bor4*)/*GpBOR4* hattı ve Salk_133793 (*bor4*)/Mock bitkileri ½ MS (25 µg/ml Hgy) ortamına 100’er tohum olacak şekilde ekilmiştir. Bu petriler yukarıda belirtilen aynı şartlarda bitki büyütme kabininde 3 hafta büyütülmüştür. Seçici petri kaplarında çimlenen bitkiler T2 bitkileridir. Bu petrilerdeki dayanıklı ve dayanıksız bitkiler sayılmıştır (Çizelge 4.1) ve aktarılan gen bakımından heterozigot bir açılım göstermektedir.

Çizelge 4.1. 7 tane Col-0/*GpBOR4* hattı ve Col-0/Mock, 7 tane Salk_133793 (*bor4*) / *GpBOR4* hattı ve Salk_133793 (*bor4*)/Mock bitkilerinin ½ MS (25 µg/ml Hgy) ortamında dayanım durumları

Transgenik Hatlar	Dayanıklı Bitki Sayısı	Dayanıksız Bitki Sayısı
Col-0 /Mock	87	5
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #4	57	18
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #7	71	7
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #8	50	19
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #10	61	9
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #18	39	16
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #23	67	30
Col-0 / <i>GpBOR4</i> #15	45	12
<i>bor4</i> / Mock	70	30
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> # 4	94	3
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #8	69	16
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #17	70	16
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #18	72	21
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #20	75	3
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #22	85	5
<i>bor4</i> / <i>GpBOR4</i> #10	65	19

GpBOR4 geni ve Mock içeren transgenik bitkilerden 7 hattan 5’er bitki toprağa aktararak (Şekil 4.36) yaklaşık 2 ay sonra tohum toplanmıştır.



Şekil 4.36. Toprağa aktarılan; **a)** 7 Col-0/GpBOR4 hattı ve Col-0/Mock; **b)** 7 Salk_133793 (*bor4*)/GpBOR4 hattı ve Salk_133793 (*bor4*)/Mock bitkileri (her hattan 5'er bitki)

Tohumlar ½ MS (25 µg/ml Hgy) ortamına ekilmiştir ve 3 hafta sonra homozigot açılım gösteren hatlar belirlenmiştir. Buna göre Çizelge 4.2'ye göre Col-0 transgenik hatlarından, Çizelge 4.3'e göre Salk_133793 (*bor4*) hatlarından sarı ile işaretlenmiş olanlar seçilmiştir.

Çizelge 4.2. *A. thaliana* T3 jenerasyonu (Col-0) transgenik hatların segregasyonu

Col-0	Dayanıklı	Dayanaksız	Çimlenmemiş
Col-0 #mock-1	45	3	2
Col-0 #mock-2	49	1	X
Col-0 #mock-3	47	X	3
Col-0 #mock-4	46	1	3
Col-0 #mock-5	47	1	2
Col-0 / GpBOR4 #4-1	30	16	4
Col-0 / GpBOR4 #4-2	27	13	10
Col-0 / GpBOR4 #4-3	28	3	19
Col-0 / GpBOR4 #4-4	33	12	5
Col-0 / GpBOR4 #4-5	40	4	6
Col-0 / GpBOR4 #7-1	BİTKİ ÖLDÜ		
Col-0 / GpBOR4 #7-2	43	4	3
Col-0 / GpBOR4 #7-3	46	4	X
Col-0 / GpBOR4 #7-4	46	3	1
Col-0 / GpBOR4 #7-5	34	16	X
Col-0 / GpBOR4 #8-1	38	9	3
Col-0 / GpBOR4 #8-2	48	X	2

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.2.'nin devamı

Col-0 / GpBOR4 #8-3	38	10	2
Col-0 / GpBOR4 #8-4	35	12	3
Col-0 / GpBOR4 #8-5	42	7	1
Col-0 / GpBOR4 #10-1	49	1	X
Col-0 / GpBOR4 #10-2	47	X	3
Col-0 / GpBOR4 #10-3	44	3	3
Col-0 / GpBOR4 #10-4	48	2	X
Col-0 / GpBOR4 #10-5	47	3	X
Col-0 / GpBOR4 #15-1	15	1	34
Col-0 / GpBOR4 #15-2	41	3	5
Col-0 / GpBOR4 #15-3	11	7	32
Col-0 / GpBOR4 #15-4	20	8	22
Col-0 / GpBOR4 #15-5	39	1	10
Col-0 / GpBOR4 #18-1	40	5	1
Col-0 / GpBOR4 #18-2	47	X	3
Col-0 / GpBOR4 #18-3	35	10	5
Col-0 / GpBOR4 #18-4	33	7	10
Col-0 / GpBOR4 #18-5	36	12	2
Col-0 / GpBOR4 #23-1	48	2	X
Col-0 / GpBOR4 #23-2	48	1	1
Col-0 / GpBOR4 #23-3	49	1	X
Col-0 / GpBOR4 #23-4	49	1	X
Col-0 / GpBOR4 #23-5	48	2	X
Col-0 (1/2 MS)	47	X	3
Col-0 (1/2 MS+Hgy)	X	27	23

Çizelge 4.3. A. thaliana T3 jenerasyonu Salk_133793 (bor4) transgenik hatların segregasyonu

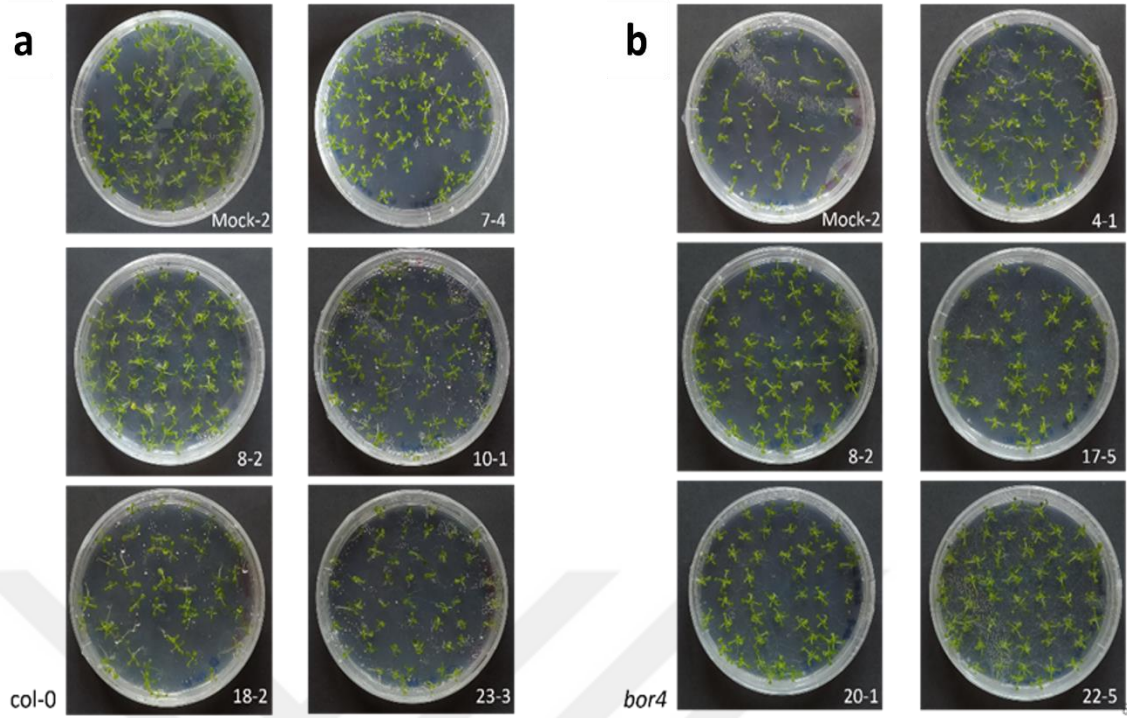
bor4	Dayanıklı	Dayanıksız	Çimlenmeyen
bor4 / GpBOR4 #mock-1	39	11	X
bor4 / GpBOR4 #mock-2	50	X	X
bor4 / GpBOR4 #mock-3	49	X	1
bor4 / GpBOR4 #mock-4	48	X	2
bor4 / GpBOR4 #mock-5	49	X	1
bor4 / GpBOR4 #4-1	49	X	1
bor4 / GpBOR4 #4-2	44	3	3
bor4 / GpBOR4 #4-3	42	8	X
bor4 / GpBOR4 #4-4	32	3	15
bor4 / GpBOR4 #4-5	47	X	3
bor4 / GpBOR4 #8-1	35	8	7
bor4 / GpBOR4 #8-2	48	X	2
bor4 / GpBOR4 #8-3	33	17	X
bor4 / GpBOR4 #8-4	33	14	3
bor4 / GpBOR4 #8-5	38	11	1
bor4 / GpBOR4 #10-1	35	1	14

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.3' ün devamı

<i>bor4 / GpBOR4 #10-2</i>	31	11	8
<i>bor4 / GpBOR4 #10-3</i>	32	9	9
<i>bor4 / GpBOR4 #10-4</i>	37	8	5
<i>bor4 / GpBOR4 #10-5</i>	34	12	4
<i>bor4 / GpBOR4 #17-1</i>	30	10	10
<i>bor4 / GpBOR4 #17-2</i>	38	5	7
<i>bor4 / GpBOR4 #17-3</i>	32	10	8
<i>bor4 / GpBOR4 #17-4</i>	22	14	14
<i>bor4 / GpBOR4 #17-5</i>	38	1	11
<i>bor4 / GpBOR4 #18-1</i>	28	5	17
<i>bor4 / GpBOR4 #18-2</i>	25	10	15
<i>bor4 / GpBOR4 #18-3</i>	32	9	5
<i>bor4 / GpBOR4 #18-4</i>	31	9	10
<i>bor4 / GpBOR4 #18-5</i>	28	11	11
<i>bor4 / GpBOR4 #20-1</i>	46	4	X
<i>bor4 / GpBOR4 #20-2</i>	43	1	6
<i>bor4 / GpBOR4 #20-3</i>	21	2	27
<i>bor4 / GpBOR4 #20-4</i>	46	4	X
<i>bor4 / GpBOR4 #20-5</i>	45	1	4
<i>bor4 / GpBOR4 #22-1</i>	47	1	2
<i>bor4 / GpBOR4 #22-2</i>	44	X	6
<i>bor4 / GpBOR4 #22-3</i>	46	3	1
<i>bor4 / GpBOR4 #22-4</i>	39	7	4
<i>bor4 / GpBOR4 #22-5</i>	50	X	X
<i>bor4 (1/2 MS)</i>	40	X	10
<i>bor4 (1/2 MS+Hgy)</i>	X	35	15

Yukarıdaki tablolara göre homozigot olan bitkilerin (sarı ile işaretlenmiş) seleksiyon petrisindeki görüntüleri Şekil 4.37'de verilmiştir.

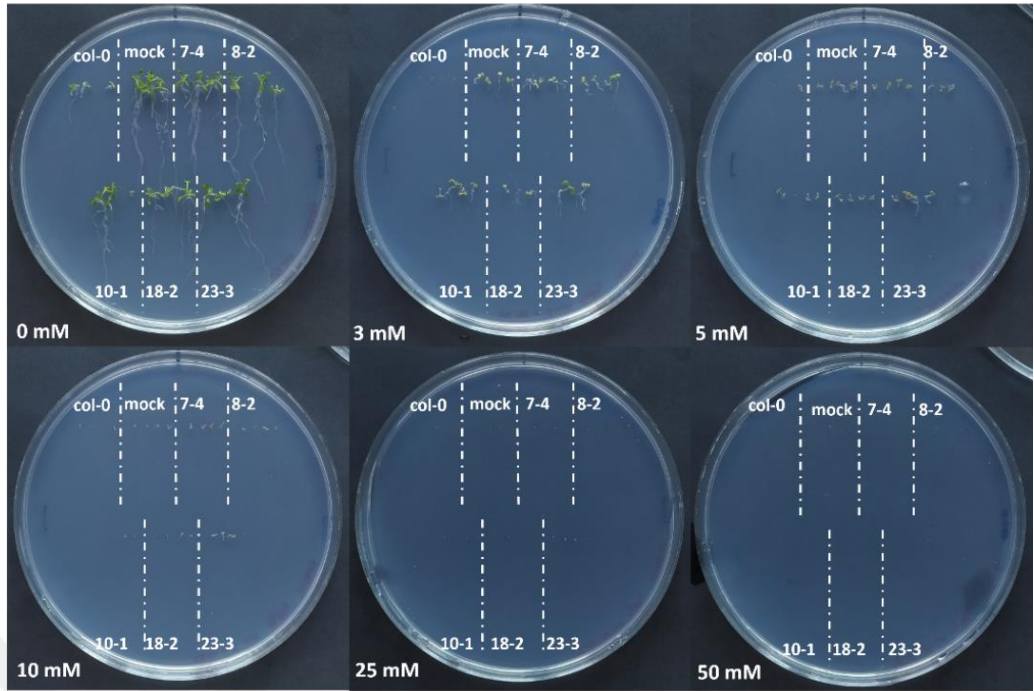


Şekil 4.37. *A. thaliana* T3 jenerasyonu; **a)** Col-0; **b)** Salk_133793 (*bor4*) homozigot seçilen hatlar

4.10. Transgenik Arabidopsis Hatlarının Bor Dayanım Testleri

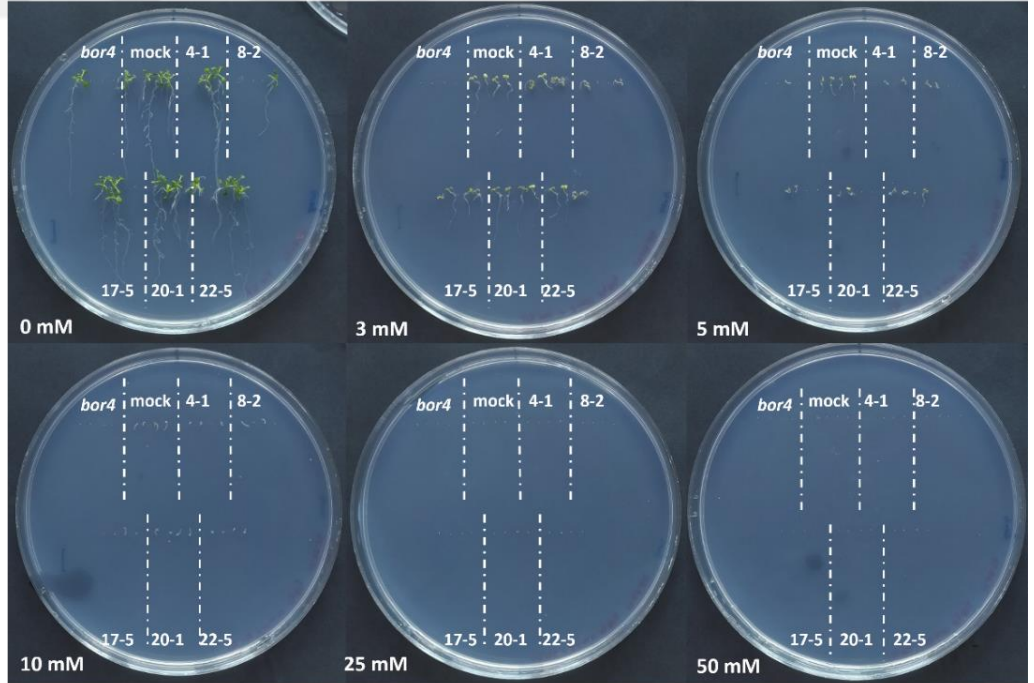
Artan dozlarda borik asit (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H_3BO_3) içeren $\frac{1}{2}$ MS besiyerlerine dikey şekilde ekilen Col-0 (WT) ve Col-0#Mock, #7.4, #8.2, #10.1, #18.2, #23.3 transgenik hatları 14 gün büyütülmüştür (Şekil 4.38). Aynı şekilde Salk_133793 (*bor4*) WT ve *bor4* #Mock, #4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5 transgenik hatları da dikey petrilerde 14 gün büyütülmüştür (Şekil 4.39). Bazı tohumlarda çimlenme sorunu yaşanmıştır. Ayrıca transgenik bitkiler 10 mM borik asit içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında gelişim gösterememiştir.

col-0



Şekil 4.38. Col-0 hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H₃BO₃) gelişimi

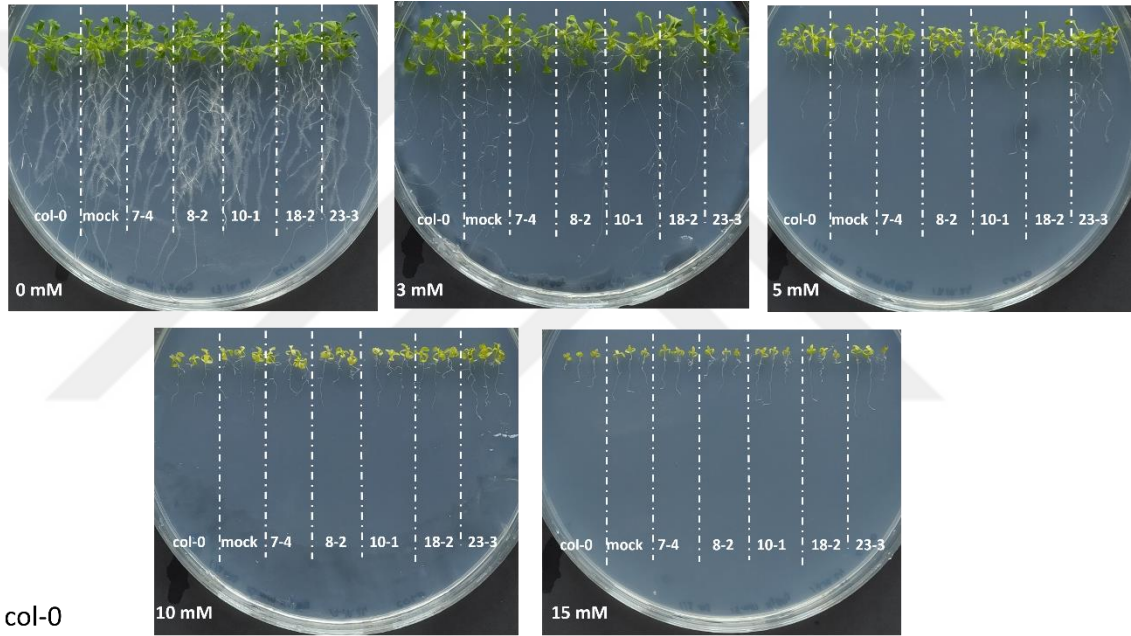
bor4



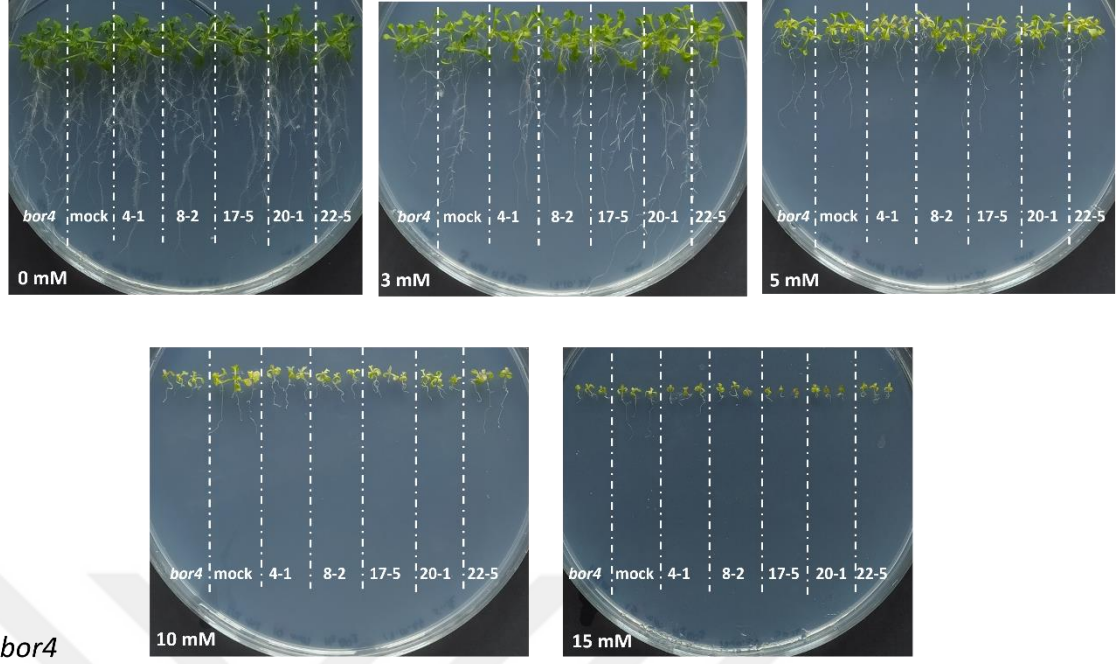
Şekil 4.39. bor4 hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 25, 50 mM H₃BO₃) gelişimi

İkinci denemede her bir hat için yaklaşık 10 tohum, borik asit içermeyen ½ MS ortamına ekilerek 2 gün +4 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından petrilere bitki büyütme kabinine alınarak dikey konuma getirilmiştir. 4 gün süreyle çimlendirilen bitkiler 0, 3, 5, 10, 15 mM borik asit içeren petrilere steril şekilde çalışılarak pens yardımıyla aktarılmıştır. 14 gün büyütülen bitkilerin fotoğrafı çekilmiştir. Şekil 4.40’ta Col-0 hatlarının, Şekil 4.41’de ise *bor4* hatlarının artan bor dozlarında fenotipik değişikliği görülmektedir. Bu sonuçlara göre *GpBOR4* genini taşıyan Col-0#23.3 transgenik hattının 5 ve 10 mM borik asit içeren ortamda wild type ve #mock bitkilerine kıyasla ufak da olsa gelişiminde bir fark gözlemlenmiştir. 15 mM borik asit içeren ortamda da #23.3 hattının kök boyu ve sürgün gelişiminin diğer hatlara kıyasla daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

bor4 hatlarından ise #22.5’in 10 mM borik asitte kök boyunun *bor4*’e (WT) kıyasla daha uzun olduğu gözlemlenmiştir.



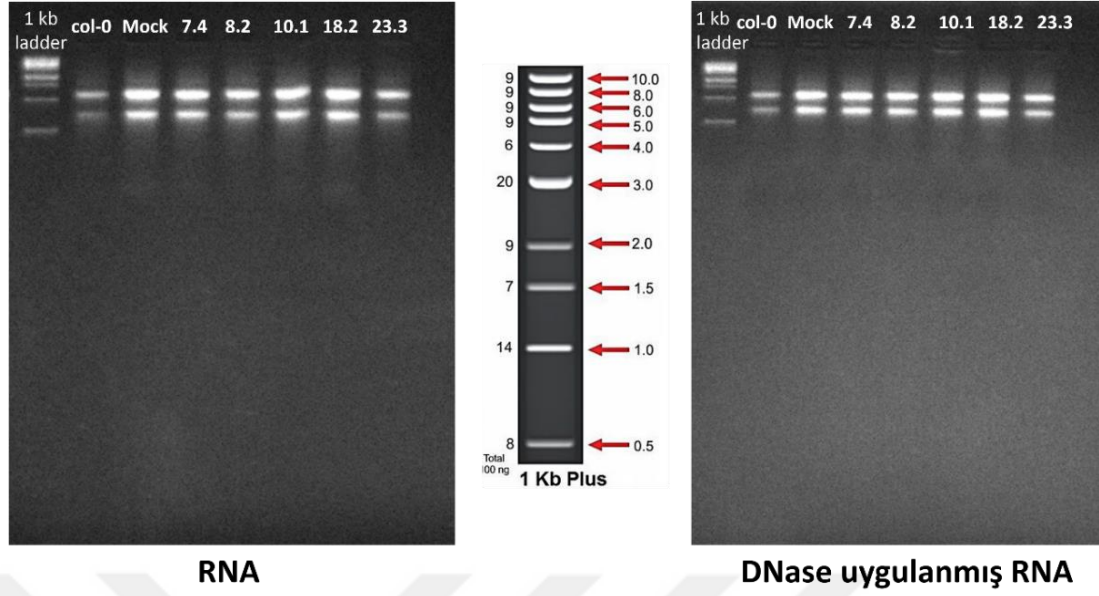
Şekil 4.40. Col-0 hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 15 mM H₃BO₃) gelişimi



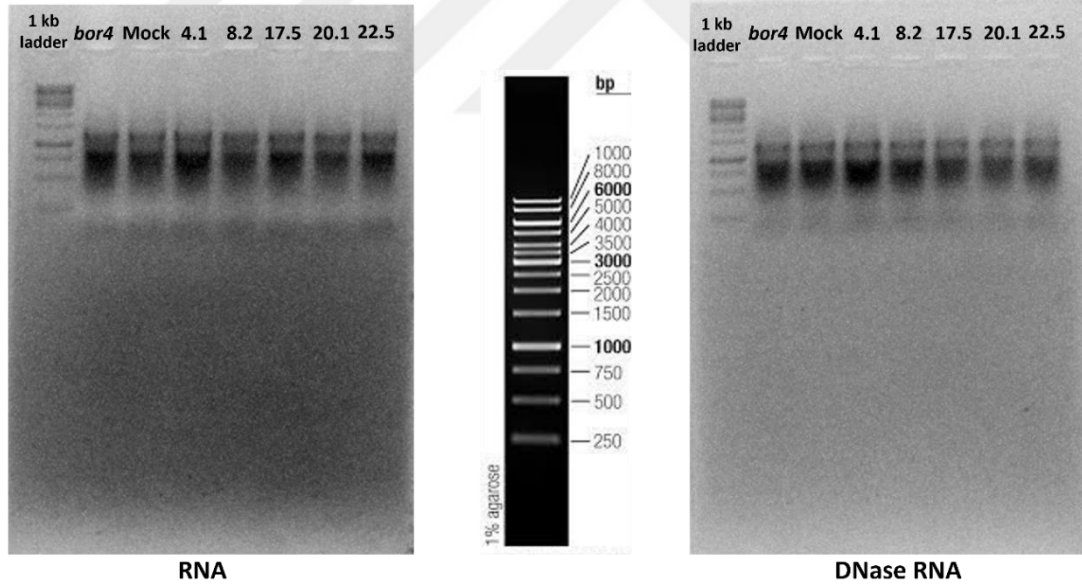
Şekil 4.41. *bor4* hatlarının artan borik asit konsantrasyonlarında (0, 3, 5, 10, 15 mM H₃BO₃) gelişimi

4.11. Transgenik Hatların Gen İfadelerini Belirleme

Col-0, Col-0#Mock ve Col-0 #7-4, #8-2, #10-1, #18-2, #23-3 hatlarından ve *bor4*, *bor4*#Mock, *bor4* #4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5 hatlarından RNA izolasyonu için yaklaşık 200'er tohum ½ MS besi ortamlarına ayrı ayrı ekilmiştir. 21 gün büyütülen bitkilerden innuPREP RNA Mini Kit 2.0 protokülüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %1,5'lik agaroz jele 4 µl yüklenen örnekler 80 V, 1 saat yürütülerek, jelin görüntüsü alınmıştır. RNA'daki DNA kirliliklerinin uzaklaştırılması amacıyla TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. DNase uygulanmış RNA'lar tekrar jele yüklenerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43).



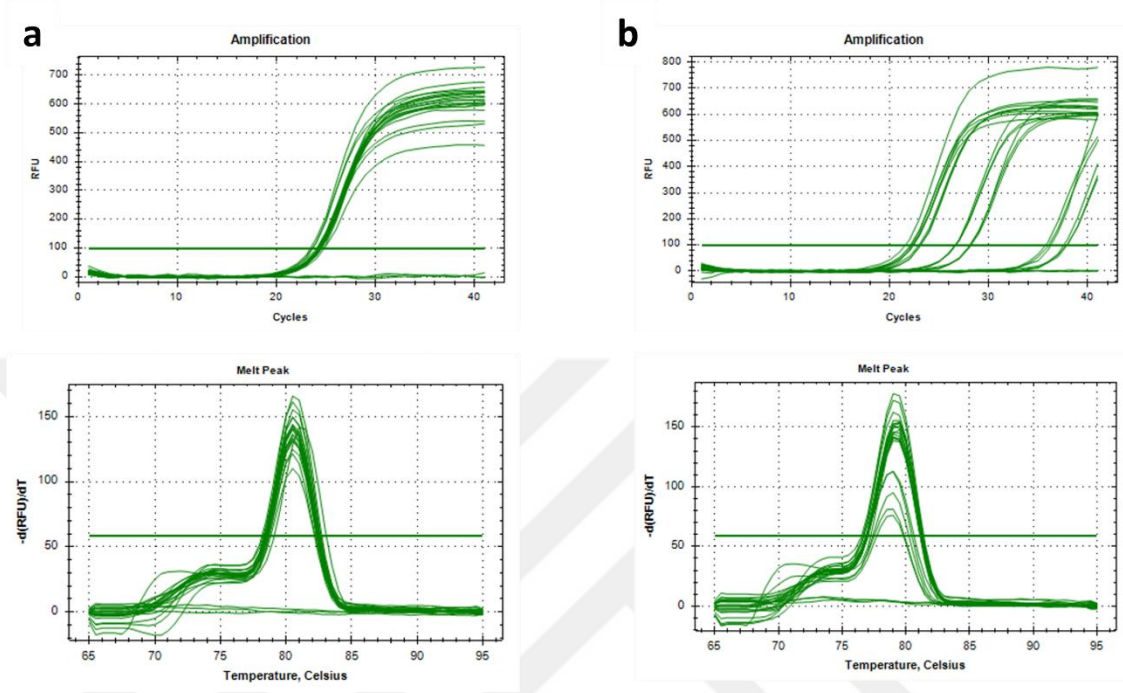
Şekil 4.42. Col-0 hatlarına ait RNA'lar ve DNase uygulanmış RNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü



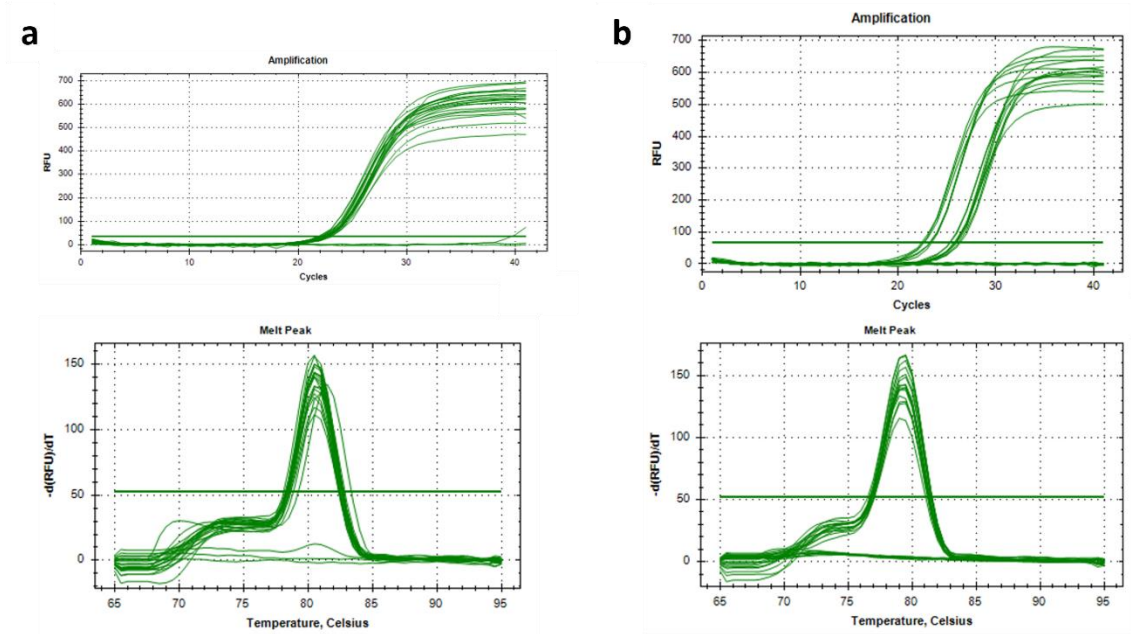
Şekil 4.43. *bor4* hatlarına ait RNA'lar ve DNase uygulanmış RNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü

Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile RNA'ların konsantrasyonu ölçülmüş ve her bir örnek 5 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O ile seyreltilmiştir. QPCR reaksiyonu her bir örnek için 3 teknik tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır.

Reaksiyon hazırlandıktan sonra CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System cihazı ile QPCR yapılmıştır. İnternal kontrol (housekeeping gen) olarak *PDF2* kullanılmıştır. QPCR sonuçlarına göre Col-0 hatlarına ait *PDF2* ve *GpBOR4* genlerinin amplifikasyon eğrisi, erime piki Şekil 4.44'te verilmiştir. *bor4* hatlarına ait *PDF2* ve *GpBOR4* genlerinin amplifikasyon eğrisi, erime piki Şekil 4.45'te verilmiştir.

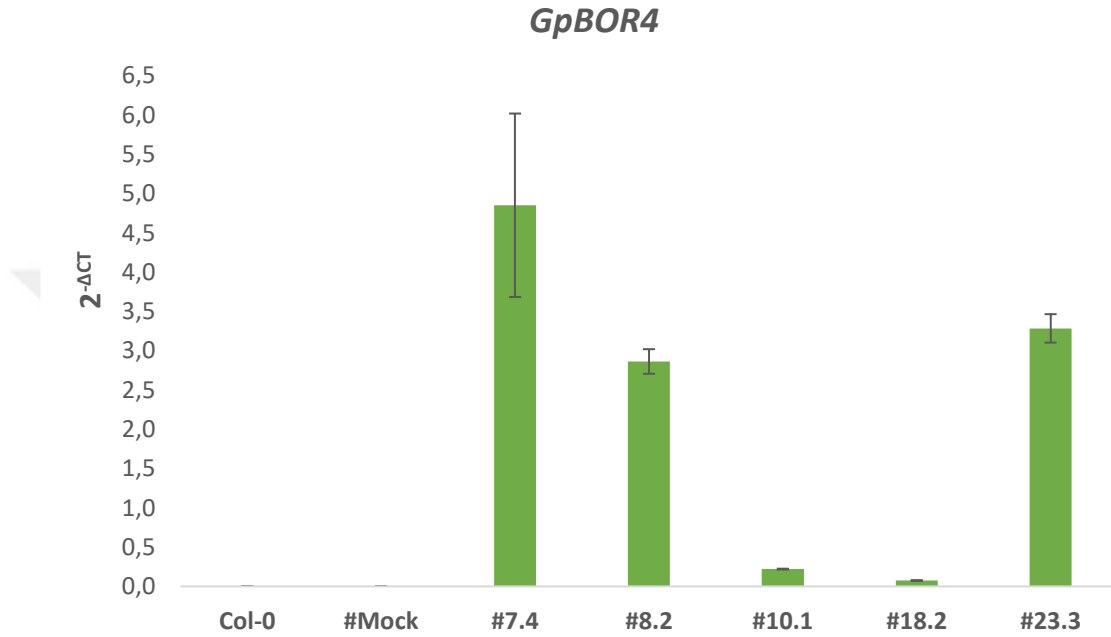


Şekil 4.44. Col-0 hatlarına ait; **a)** *PDF2* geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki; **b)** *GpBOR4* geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki



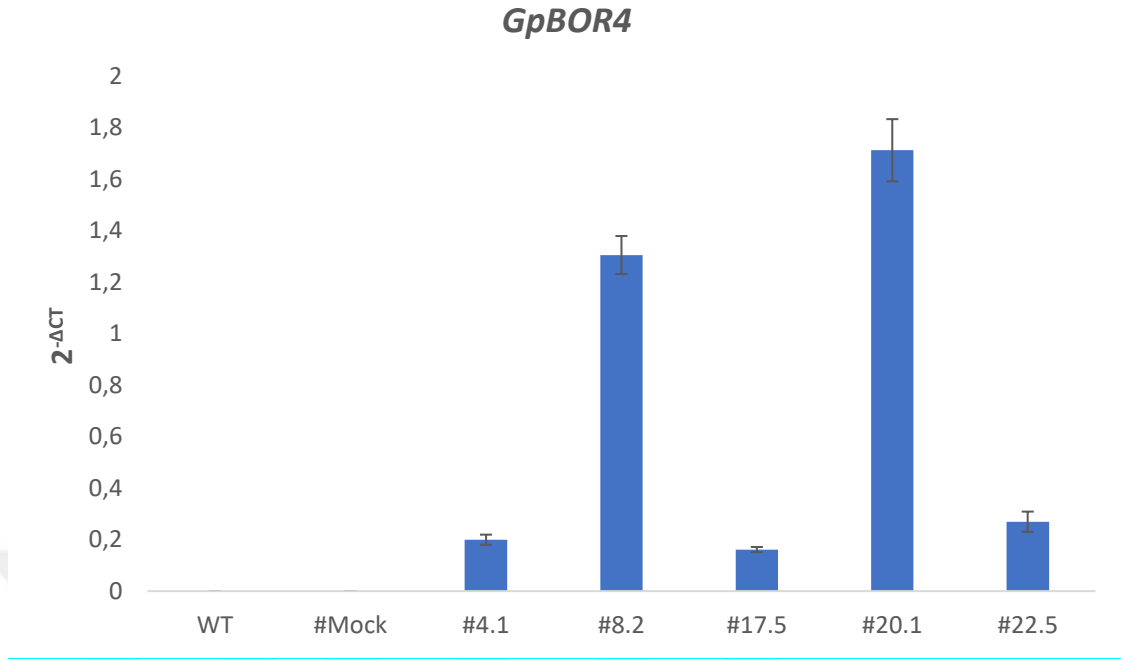
Şekil 4.45. *bor4* hatlarına ait; **a)** *PDF2* geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki; **b)** *GpBOR4* geni için amplifikasyon eğrisi, erime piki

GpBOR4 geninin Ct değerleri *PDF2* (housekeeping) geni ile normalize edilerek ΔCt değerleri hesaplanmıştır. Görelî gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması için $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Buna göre Col-0 (wild type) ve Col-0#Mock bitkilerinde gen ifadesi görülmemiştir. Bunun sebebi *GpBOR4* genini içermemelerinden kaynaklanır. *GpBOR4* geni aktarılan transgenik bitkilerde ise gen ifadesi en yüksek #7.4 (4,85) hattında görülürken, en düşük #18.2 (0,074) hattında görülmüştür (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Col-0 (WT), Col-0#Mock, #7.4, #8.2, #10.1, #18.2, #23.3 transgenik hatlarına ait *GpBOR4* geninin ekspresyonu ($2^{-\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır, Normalizasyon için referans gen *PDF2* kullanılmıştır.)

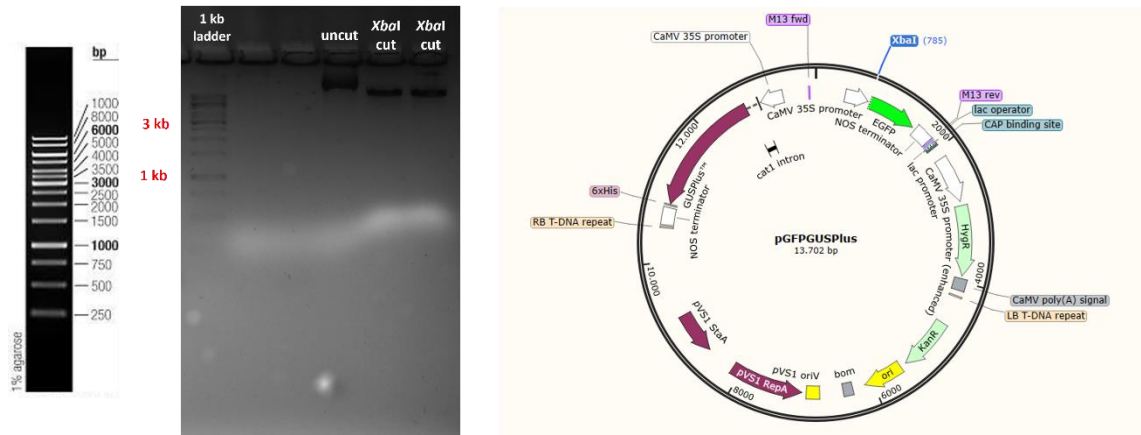
bor4 wild type ve *bor4*#Mock bitkilerinde gen ifadesi görülmemiştir. *GpBOR4* genini içeren transgenik bitkilerde ise gen ifadesi en yüksek #20.1 (1,71) hattında çıkarken, en düşük #18.2 (0,161) hattında görülmüştür (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. *bor4* (WT), *bor4*#Mock, #4.1, #8.2, #17.5, #20.1, #22.5 transgenik hatlarına ait *GpBOR4* geninin ekspresyonu ($2^{-\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır, normalizasyon için referans gen *PDF2* kullanılmıştır.)

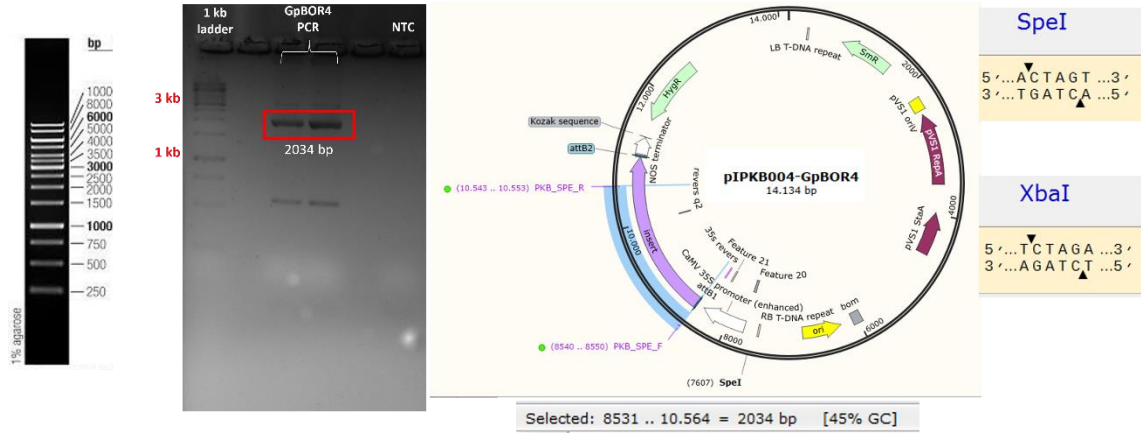
4.12. *GpBOR4*'ün GFPGUSPlus vektörü ile Arabidopsis'e Transformasyonu

GFPGUSPlus vektörü *XbaI* kesim enzimiyle lineer hale getirilmiş (Şekil 4.48), ardından yapışkan uçların birbiri üzerine kapanmasını engellemek üzere defosforilasyon için CIP (NEB) uygulanmıştır.



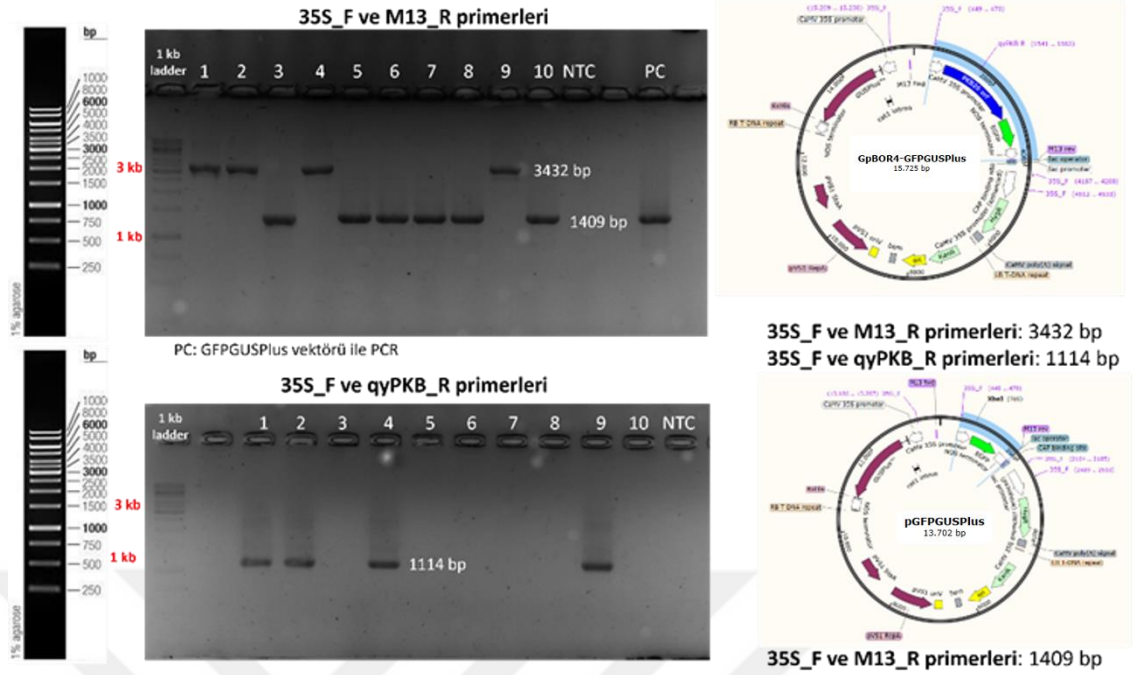
Şekil 4.48. GFPGUSPlus vektörünün *XbaI* enzimiyle kesim sonucu jel görüntüsü

GpBOR4 geninin başına ve stop kodunun hemen öncesine komplementer olacak şekilde dizayn edilen ileri (5'-GTACTAGTCACCTCTCACGT-3') ve geri (5'-GAAGTCTCTCTTTGGATGAA-3') primerler ile yapılan PCR sonucu 2034 baz çifti ürün elde edilmiştir (Şekil 4.49). Elde edilen bandı jelden purifiye etmek için QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) kullanılmıştır. İnsört, *SpeI* enzimi ile kesilmiştir.



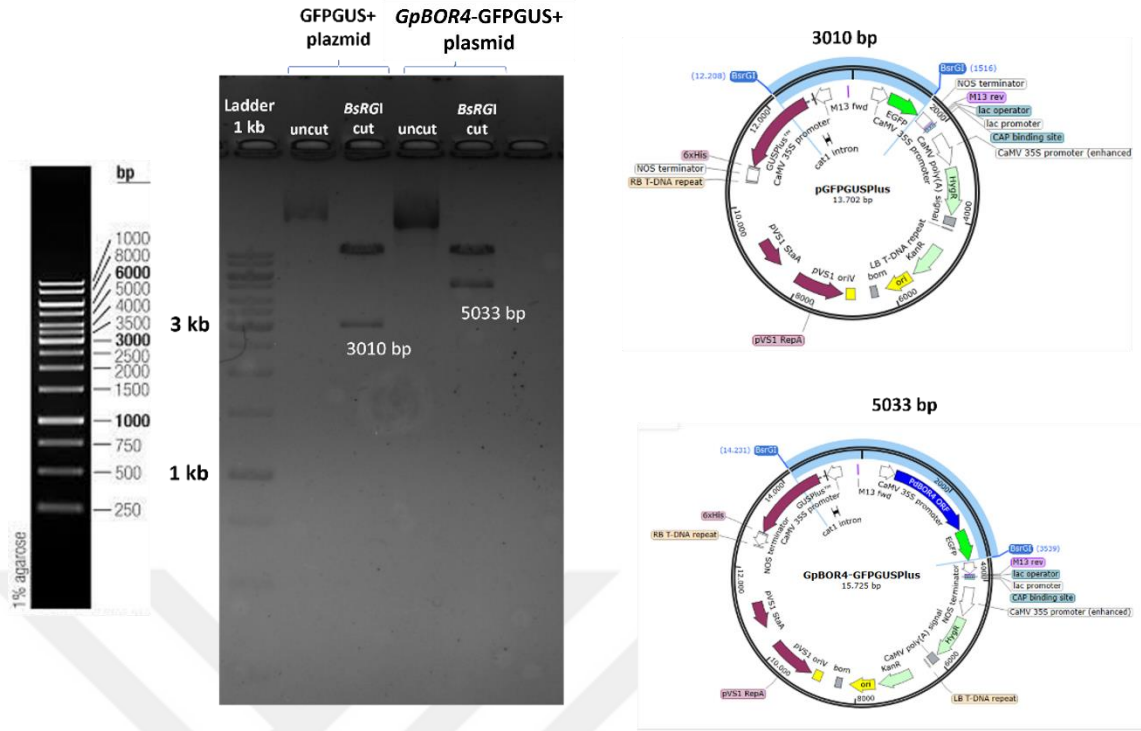
Şekil 4.49. *GpBOR4* geninin ORF bölgesini kapsayan primeler ile yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü

Elde edilen lineer pGFPGUSPlus vektörü ve *GpBOR4*-ORF ürünü T4 DNA ligaz (NEB) enzimiyle birleştirilmiştir. Ligasyon sonrası 3 µl ligasyon ürünü 50 µl kompetant *E. coli*'ye (DH5α) ısı şoku yöntemi ile aktarılmış ve antibiyotik (Kanamisin 50 µg/mL) içeren LB agar besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Ertesi gün çıkan *E. coli* kolonilerinden 10 tane seçilerek 35S_F ve M13_R primer seti ve 35S_F ve qyPKB_R primer seti kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. 35S_F ve M13_R primerleri arası GFPGUSPlus vektöründe 1409 baz çiftidir. Yeni oluşturulan *GpBOR4*-GFPGUSPlus vektöründe ise 3432 baz çiftidir. Buna göre 1, 2, 4 ve 9 numaralı koloniler *GpBOR4*-GFP füzyon geni bakımından pozitif çıkmıştır. Diğer koloniler ise kendi üzerine kapanan boş GFPGUSPlus vektörünü içine alarak dayanıklılık sağlamış kolonilerdir ve PCR'da 1409 bazlık bir bant vermiştir (Şekil 4.50, üst panel). Diğer taraftan 35S_F ve gene spesifik qyPKB_R primerleri ile yapılan PCR sonucunda 1114 baz ürün veren 1, 2, 4 ve 9 numaralı kolonilerin istenilen vektörü taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.50, alt panel). Boş vektör içeren kolonilerde ise herhangi bir bant gözlemlenmemiştir.



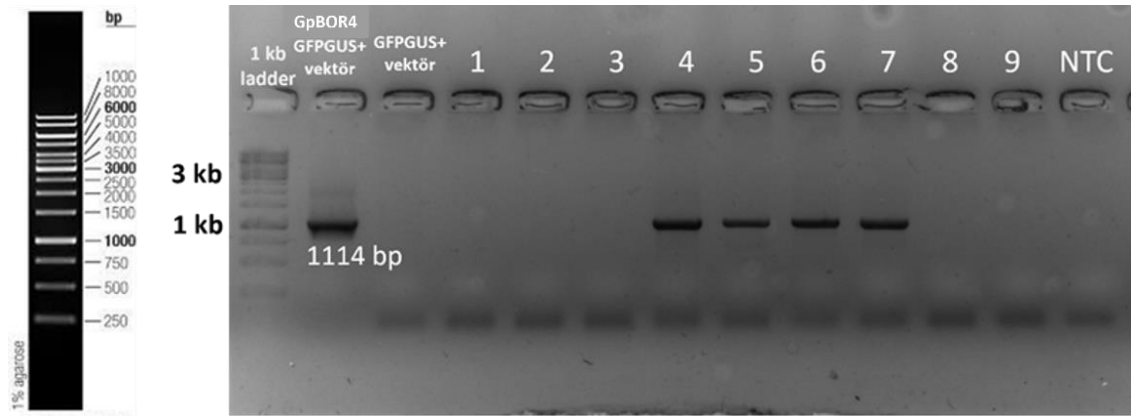
Şekil 4.50. Ligasyon ürününün *E. coli*'ye transformasyonu sonucu çıkan kolonilerin PCR jel elektroforezi görüntüsü, PC: pozitif kontrol (*GpBOR4-GFPUSPlus* plazmit PCR), NTC: Negatif kontrol

Pozitif kolonilerden biri seçilerek GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit *BsRGI* enzimi ile kesilerek doğrulanmıştır. GFPUSPlus vektörünü 3010, *GpBOR4-GFPUSPlus* ise 5033 bazlık bir bant oluşmuştur, geri kalan vektör parçaları aynı boyutta ve 10.692 bazdır (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. BsrGI enzimi ile kesim yapılarak GFPUSPlus ve GpBOR4-GFPUSPlus vektörlerinin doğrulanması

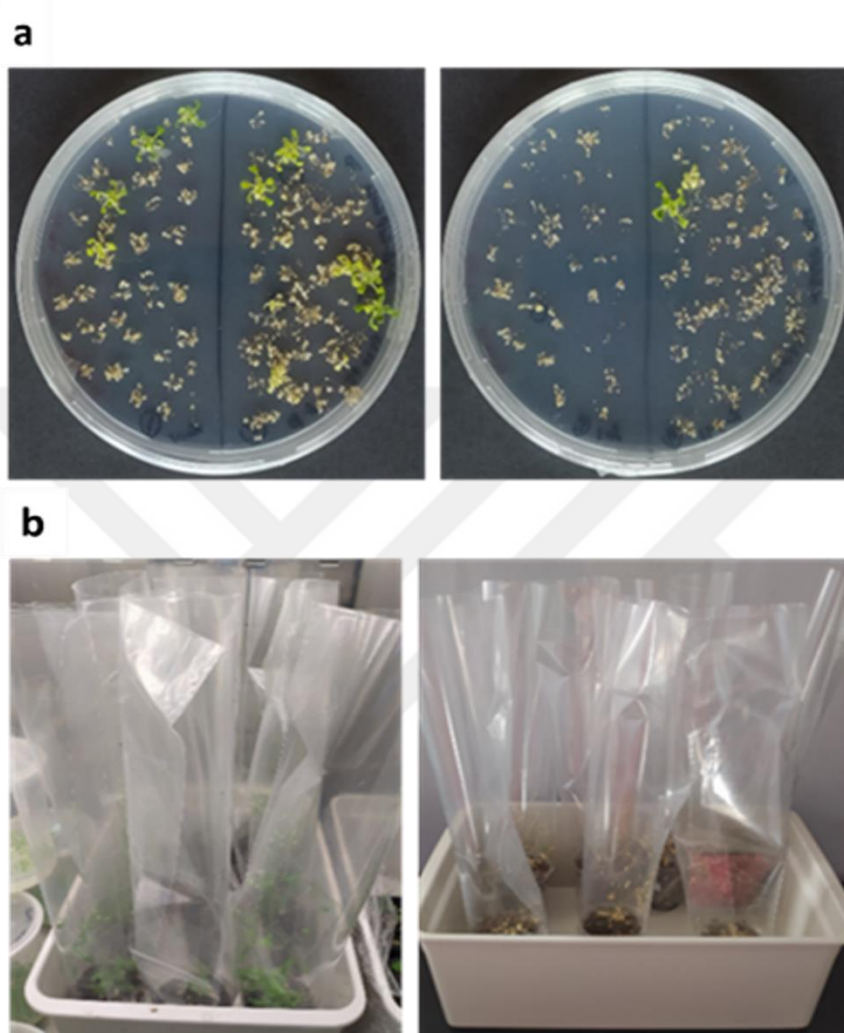
GpBOR4- GFPUSPlus vektörü doğrulandıktan sonra *A. tumefaciens* EHA105 suşuna eletroporasyon yoluyla aktarılmıştır. 2 gün sonunda çıkan kolonilerden yapılan PCR sonucunda 4 tanesinde pozitif bant elde edilmiştir (Şekil 4.52). Bu kolonilerden bir tanesi seçilmiştir.



Şekil 4.52. GpBOR4-GFPUSPlus vektörü aktarılan *A. tumefaciens* EHA105 suşuna 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü

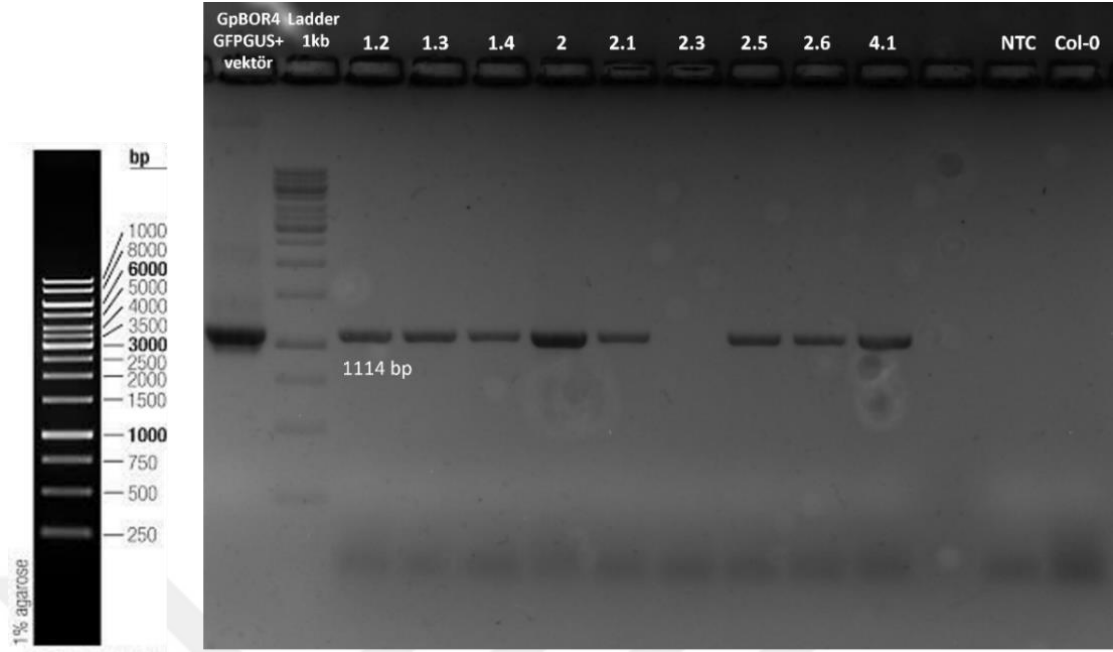
GpBOR4-GFPUSPlus vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* EHA105 suşu kullanılarak çiçeklenme aşamasına gelen Col-0 ekotipinden 6'şar bitki içeren toplam 4 pot kullanılarak floral dip yapılmıştır. Daha sonra bitkiler büyütme kabinde tohum

tutup sararana kadar sulanmış ardından suları kesilerek tohumların tamamen kuruması sağlanmıştır. Yaklaşık 2 ay sonra tohumlar toplanarak kurutulmuştur. Tohumlar steril edildikten sonra seleksiyonu için ½ MS (Hgyromisin 25 µg/mL + Timentin 100 µg/mL) petrilere ekilmiştir (Şekil 4.53).



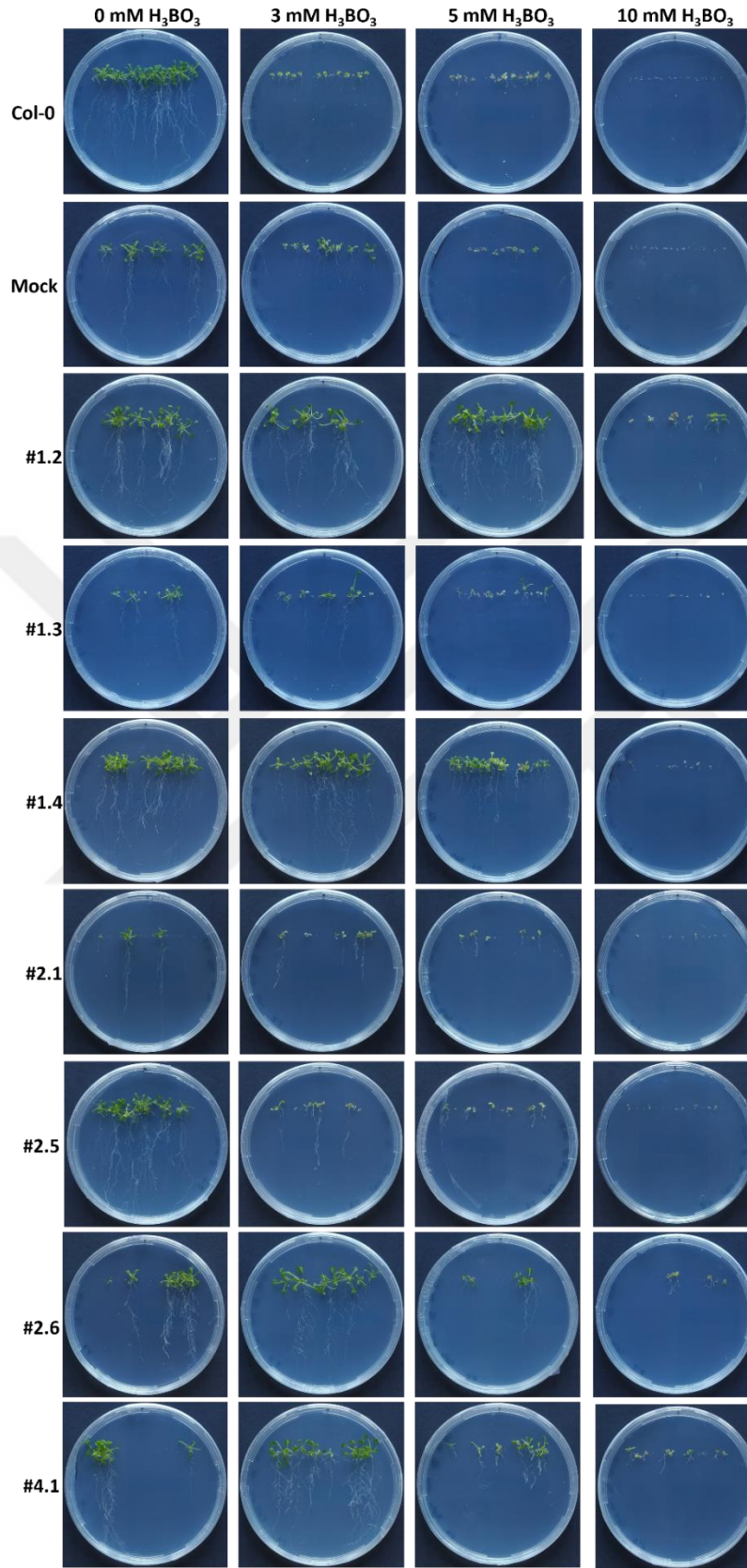
Şekil 4.53. a) T0 tohumlarının ½ MS (Hgyromisin 25 µg/ml +Timentin 100 µg/ml) ortamlarında seçilimi; **b)** Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi

Transgenik olduğu düşünülen 9 bitkiden DNA izolasyonu yapılmış ve 35S_F ve qyPKB_R primerleri ile yapılan PCR sonucunda 8 örnekten 1114 bazlık ürün elde edilmiştir. Böylelikle bitkilerin transgenik olduğu ve *GpBOR4* genini taşıdığı doğrulanmıştır (Şekil 4.54). Toplam 4 pot floral dip yapıldığı ve her pottan toplanan tohumlar ayrı ayrı petrilere seleksiyon yapıldığı için transgenik bitkiler pot ismi ve çıkan bitki sayısına göre isimlendirilmiştir (örneğin; 1.1: pot 1 bitki 1).



Şekil 4.54. Transgenik hatlardan elde edilen DNA ile 35S_F ve qyPKB_R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü

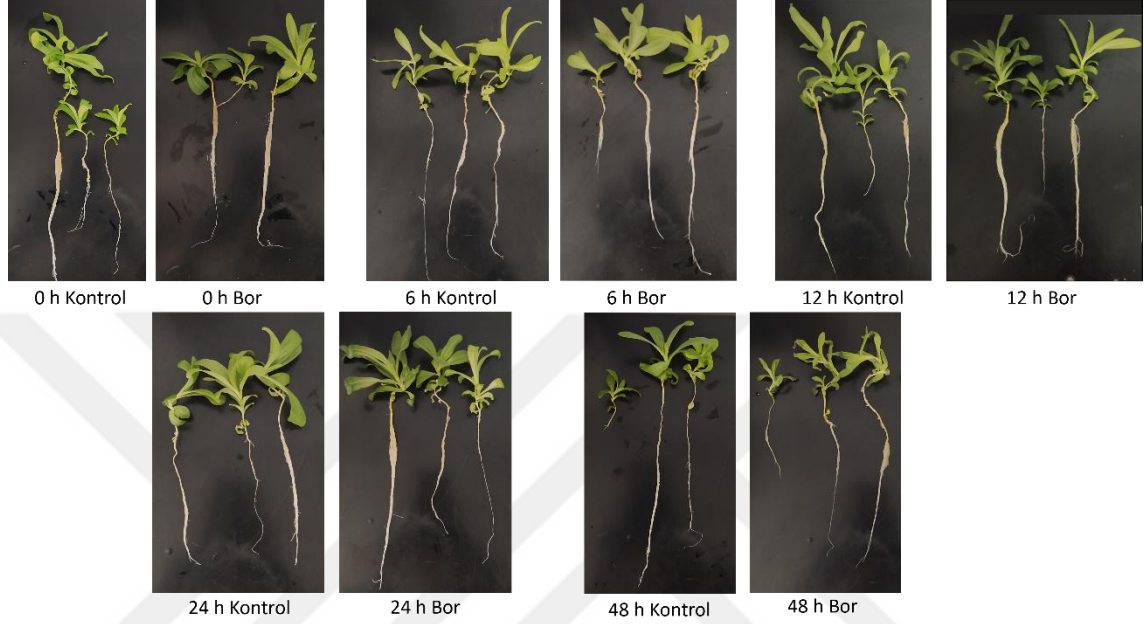
Transgenik bitkiler silik oluşturup tohumları kuruduktan sonra toplanarak 2 gün oda sıcaklığında ependorf tüpte kurutulmuştur. 7 adet transgenik T1 hattına ait tohumlar, Col-0 (wild type) ve Mock (GFPUSPlus vektörünü taşıyan T1 tohumları) artan dozlarda (0, 3, 5, 10 mM) borik asit içeren ½ MS besiyerine 15' er tohum olacak şekilde dikey ekilmiştir (Col-0 haricinde tüm petrilere 25 µg/ml Hgyromisin eklenmiştir). Bitki büyütme kabininde 18 gün süreyle büyüyen transgenik hatların bor stresine karşı dayanıklılıkları belirlenmiştir. Buna göre Col-0 ve Mock bitkilerine kıyasla 5 mM H₃BO₃ içeren ortamda #1.2, #1.4, #2.6, ve #4.1 T2 hatları dayanıklı bulunmuştur. 10 mM H₃BO₃ içeren ortamda ise #1.2, #2.6, ve #4.1 hatları dayanıklı bulunmuştur (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. Artan dozlarda (0, 3, 5, 10 mM) borik asit içeren ½ MS besiyerlerinde Col-0, Mock ve *GpBOR4* genini içeren transgenik T2 bitkilerinin dayanıklılığı

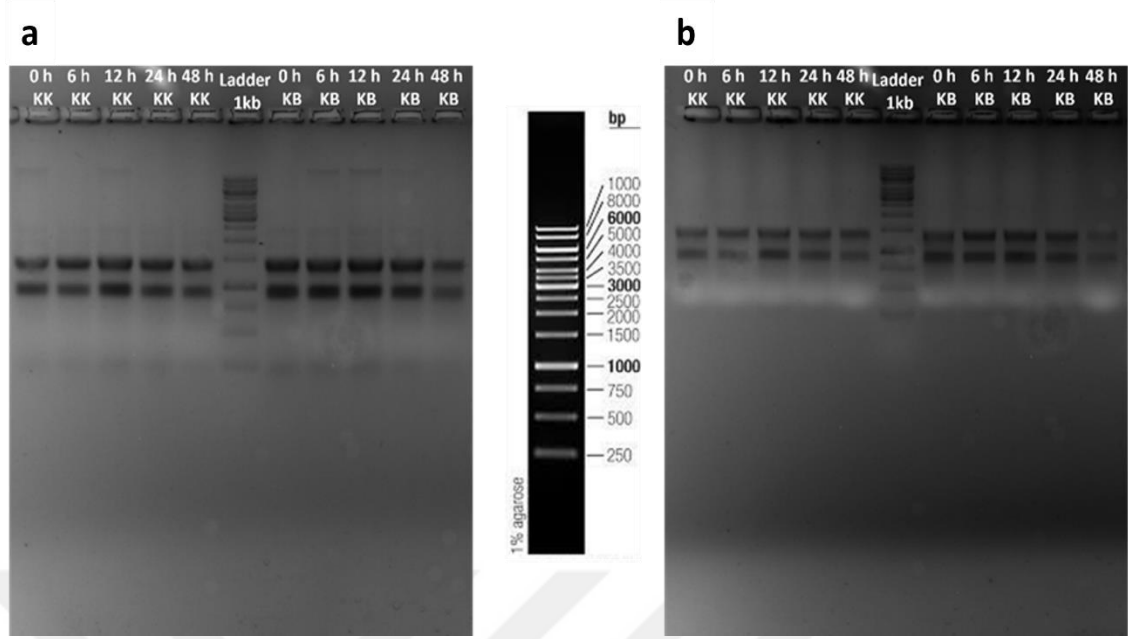
4.14. *Gypsophila perfoliata*'da GpBOR4 Geninin Toksik Bor Koşullarında İfadeleme Profili (qPCR)

G. perfoliata, stres uygulama süreleri 0, 6, 12, 24, 48 saat olacak şekilde kontrol ve 500 mg/L borik asit içeren hidroponiklerden kök ve sürgün olmak üzere örnekler hasat edilmiştir (Şekil 4.56).



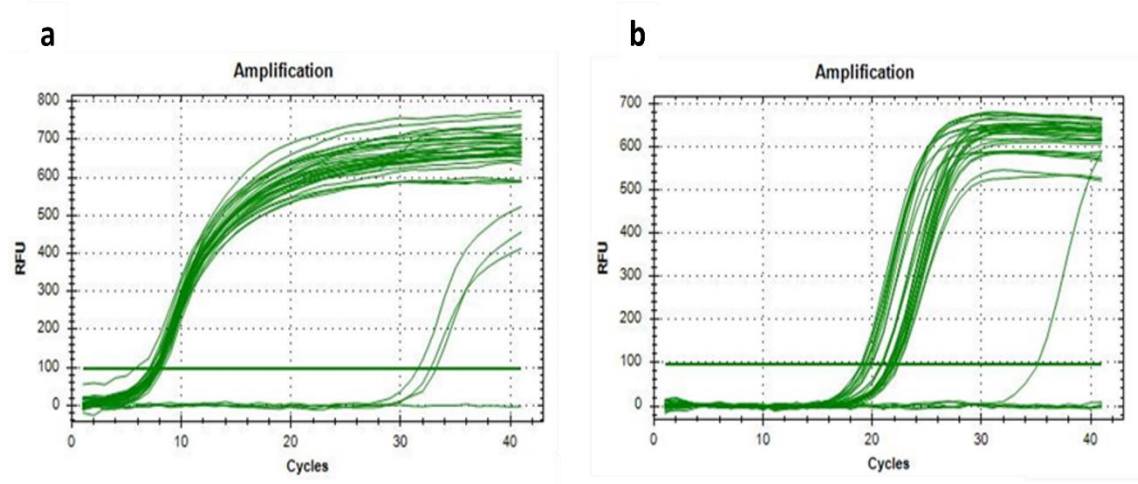
Şekil 4.56. *Gypsophila perfoliata*'nın 0, 6, 12, 24, 48 saatlerinde kontrol ve bor uygulamasına ait hasat edilen örnekleri

Kök örneklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra DNA kontaminasyonlarını uzaklaştırmak için DNase uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforezinde RNA'ların kalitesi kontrol edilmiştir. Tüm RNA'larda çift bant gözlemlenmiştir ve DNA kontaminasyonu elimine edilmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. *G. perfoliata*’ ya ait; **a)** RNA örneklerinin; **b)** DNase uygulanmış RNA örneklerinin jel elektroforezi görüntüsü, KK: Kök Kontrol, KB: Kök Bor

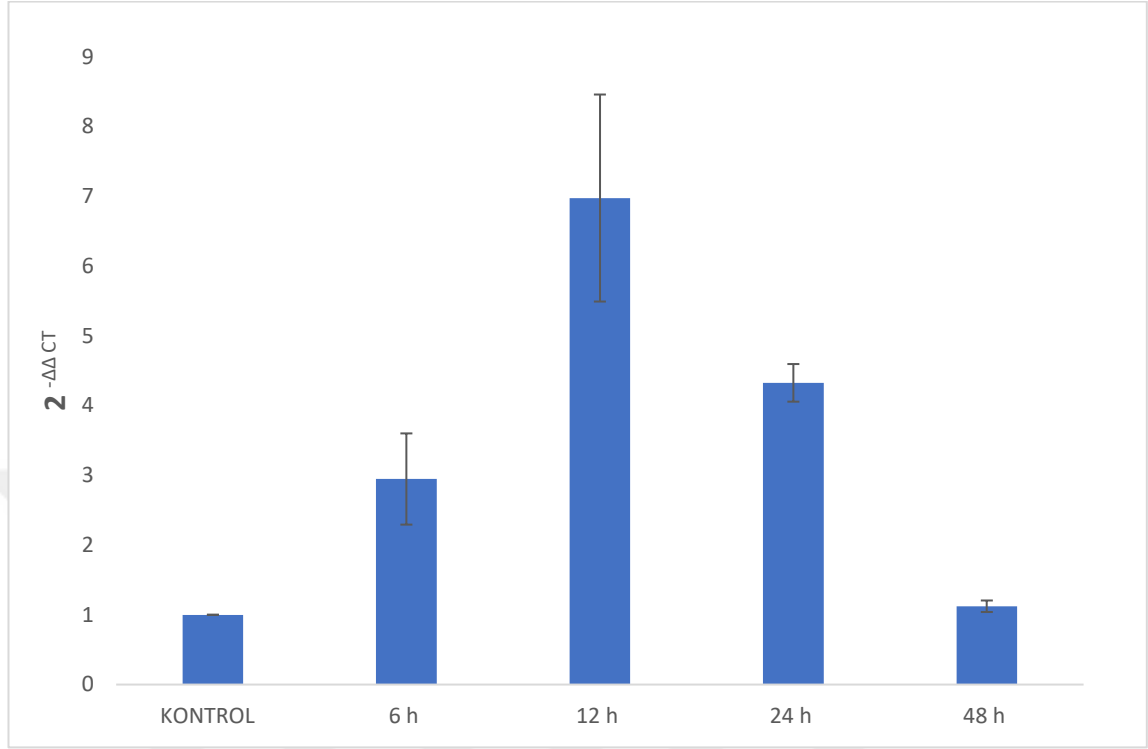
Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile RNA’ların konsantrasyonu ölçülmüş ve her bir örnek 5 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O ile seyreltilmiştir. QPCR reaksiyonu her bir örnek için 3 teknik tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır. QPCR sonucu housekeeping gen ve *GpBOR4* genine ait amplifikasyon pikleri Şekil 4.58’de verilmiştir.



Şekil 4.58. *Gypsophila perfoliata*’ ya ait RNA’lar ile kurulan qPCR sonucu **a)** housekeeping geninin (internal kontrol); **b)** *GpBOR4* geninin amplifikasyon pikleri

QPCR’den elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile kontrol örneğine göre artan saatlerde *GpBOR4* genin relatif ekspresyonu hesaplanmıştır. Buna göre kontrol grubuna kıyasla 6 saatte gen ifadesi 2,94, 12 saatte 6,97, 24 saatte 4,32 ve 48

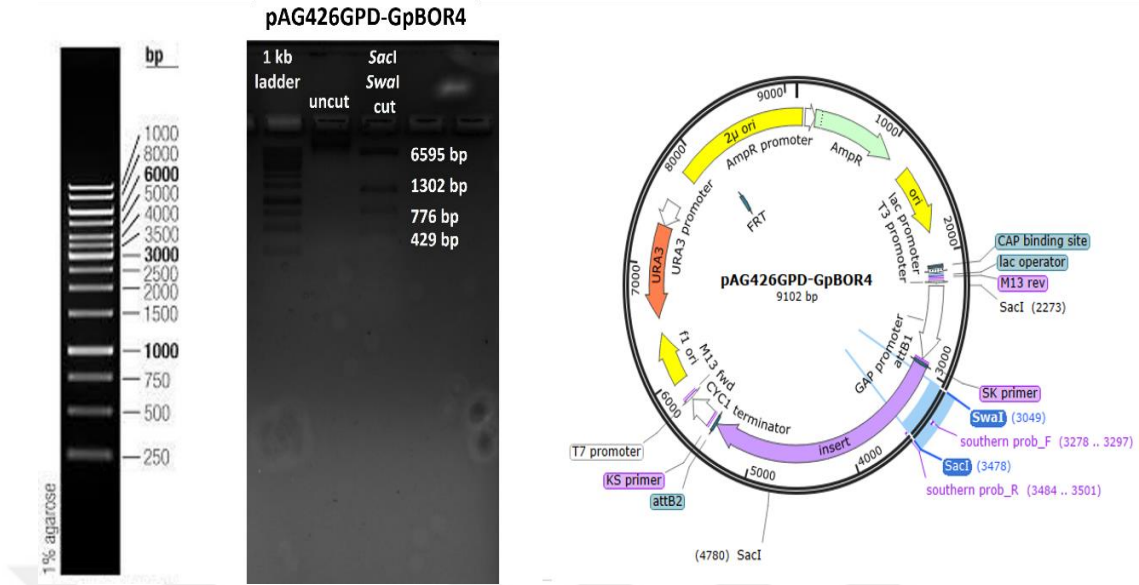
saatte 1,12 kat artış göstermiştir. En yüksek ekspresyon 12. saatte gözlemlenirken, 48 saatte genin ekspresyonu neredeyse kontrolle aynı seviyeye düşmüştür (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. *G. perfoliata*'da 500 mg/L bor stresi uygulamasından sonra 6, 12, 24 ve 48. saatlerde göre *GpBOR4* geninin $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanan relatif ekspresyon seviyeleri

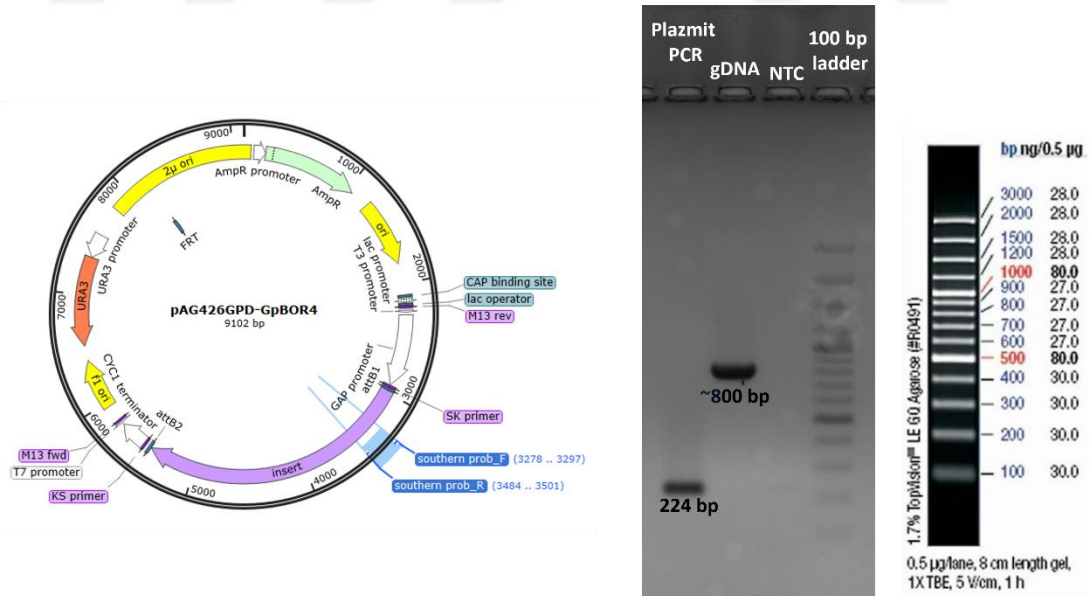
4.15. *GpBOR4*'ün Genomdaki Kopya Sayılarının Southern Blot ile Belirlenmesi

Southern blot ile gen kopya sayısını belirlemek amacıyla iki strateji uygulanmıştır. Bunlardan biri *G. perfoliata* genomik DNA' sının izole edilerek uygun restriksiyon enzimleriyle rastgele kesilerek etiketlenmesidir. Diğer yöntem ise, tek kopya geni içeren plazmit ile genomik DNA'nın probun hemen dışından kesilerek bant yoğunluğuna göre kopya sayısının belirlenmesi yoluyla yapılmıştır. Buna göre plazmit *SacI* ve *SwaI* enzimleriyle kesildiğinde oluşan 429 bazlık sekansın içinden prob dizayn edilmiştir (Şekil 4.60).



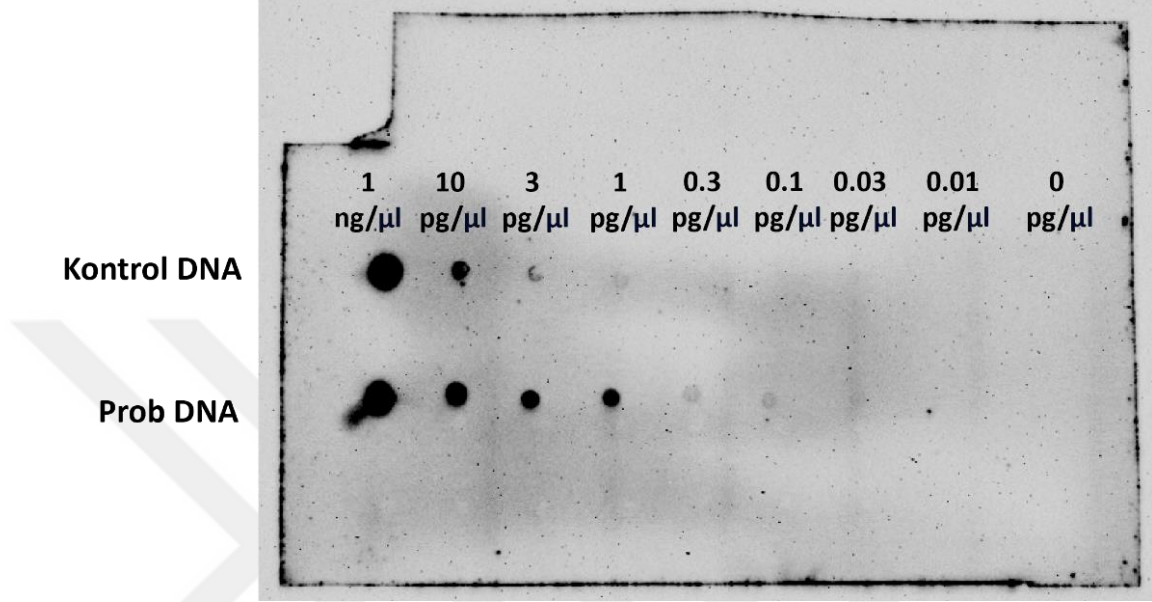
Şekil 4.60. *SacI* ve *SwaI* restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu pAG426GPD-*GpBOR4* vektörünün jel elektroforezi görüntüsü

GpBOR4 geninde ileri (southern prob_F: 5'- GATTGTCGGCATCGCAGAAC - 3') ve geri (southern prob_R: 5'- GAGCCGTGATCAACATGC - 3') primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. *GpBOR4* cDNA'sını içeren pAG426GPD plazmiti ve *G. perfoliata*'nın genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu sonrası cDNA 224 bp ve genomik DNA ise yaklaşık 800 bp'lik ürün vermiştir (Şekil 4.61).



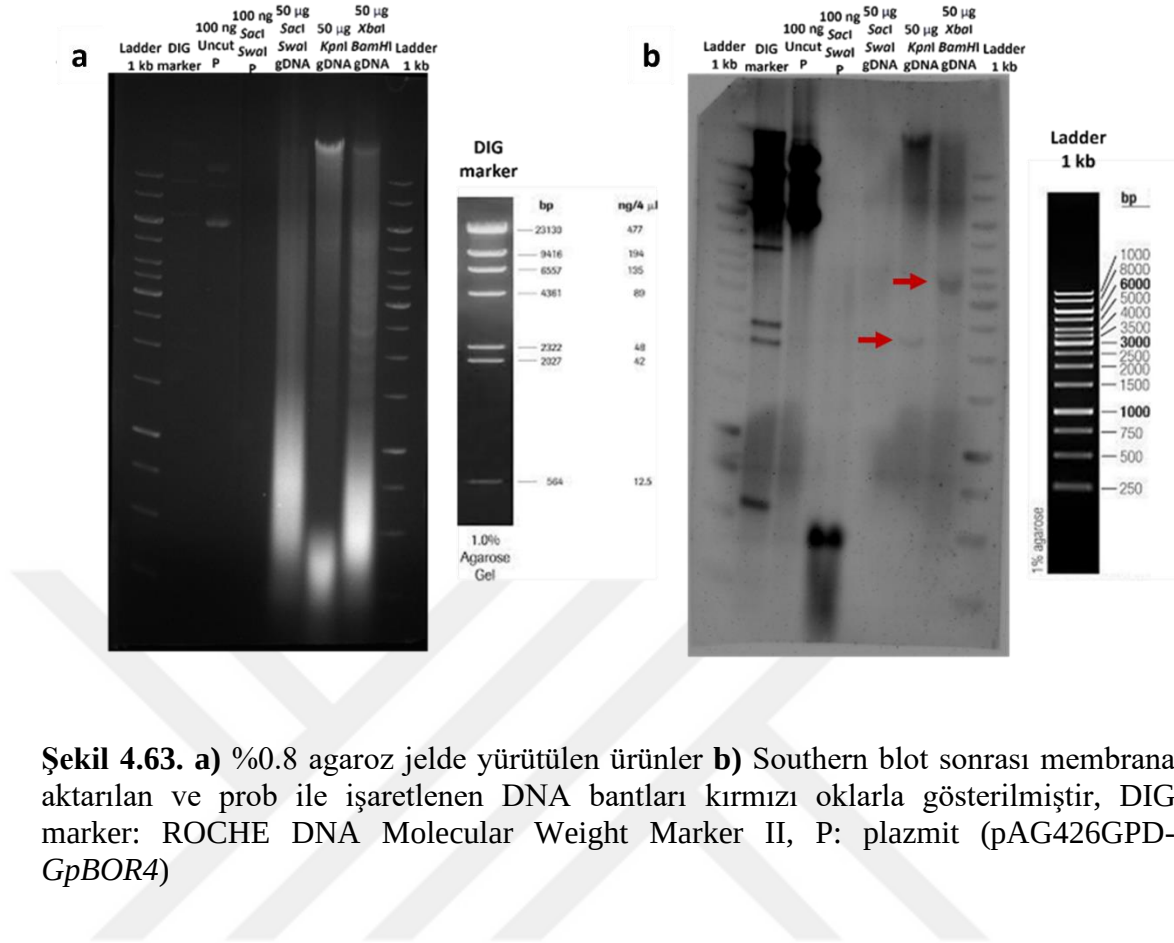
Şekil 4.61. İleri (southern prob_F) ve geri (southern prob_R) primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu jel elektroforezi görüntüsü, NTC: non-template kontrol, gDNA: *Gypsophila perfoliata* genomik DNA

G. perfoliata genomik DNA'sından Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) ile PCR kurulmuştur. PCR ürünleri jelden purifiye edilerek saflaştırılmıştır ve ROCHE DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II protokolüne göre prob hazırlanmış ve probun etkinliği membrana damlatma yöntemi ile test edilmiştir. Probun 0.1 pg DNA'sında silik de olsa hibridize olduğu için probun etkinliği yeterli bulunmuştur (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. *GpBOR4* genomik DNA'sındaki 800 bp'lik PCR ürününün DIG-High Prime ile işaretlenmesi sonucu oluşan probun etkinliğinin belirlenmesi

Plazmit ve gDNA restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra jel elektroforezinde yürütülmüş ve Southern blotlama yapılmıştır. Bunun sonucuna göre plazmit ile yapılan kesim ürünlerine probun hibridize olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın gDNA ile yapılan *SwaI* ve *SacI* kesim ürününe prob hibridizasyonu gözlemlenmemiştir. Diğer taraftan *KpnI* ile kesim sonucu yaklaşık 2200 bp bir ürün proba hibridize olmuştur. *XbaI* ve *BamHI* ikili kesiminde ise yaklaşık 3500 bp civarında bant vardır (Şekil 4.63).



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada bor madeni çevresinde hayatta kalabilen türlerden biri olan *G. perfoliata*'ya ait cDNA kütüphanesi maya hücrelerinde taranarak yüksek dozda bora toleranstan sorumlu olabilecek bir gen olan *GpBOR4* cDNA sekansı tanımlanmıştır. Bu cDNA'yı taşıyan *atr1Δ* mayanın 300 mM borik asitli ortamda iyi şekilde hayatta kaldığı belirlenmiştir.

Bitkilerde hücre içi bor dengesini sağlamak konusunda BOR genleri büyük rol oynamaktadır. Daha önce *A. thaliana*'da 7 adet BOR transporter proteini tanımlanmıştır. İlk tanımlanan AtBOR1 transporterı (Takano vd. 2002) borun kök hücrelerinden ksileme yüklenmesinde görev alır ve borun yetersiz olduğu durumlarda ifadesi artar. Buna karşın yüksek bor varlığında BOR1 endositoz yoluyla parçalanır (Takano vd. 2005).

Daha önce birçok çalışmada farklı türlerde yüksek seviyedeki bora dayanıklılık sağlayan genler bulunmuştur. Bunlardan ilk tanımlanan *A. thaliana*'ya ait *AtBOR4* (Miwa vd. 2007) genidir. Bu genin *scbor1Δ* maya hücrelerine pYES2 vektörü ile aktarılması sonucu oluşan hücreler seri dilüsyon yapılmış ve mayalar 80 mM borik aside dayanmıştır. Diğer taraftan arpada Sahara çeşidine ait *HvBot1* geninin ise YNL275w (*bor1Δ*) mutantı BY4741 mayaya 20 mM borik asitli ortamda dayanıklılık kazandırdığı ortaya konulmaktadır (Sutton vd. 2007). Nozawa vd. (2006) yaptıkları çalışmada aşırı ifadelenen *BOR1* genini taşıyan BY4741 mayanın 90 mM borik asitte yaşayabildiğini göstermiştir.

Kaya vd. (2009) *ATR1* geninin mayalarda bor toleransı sağladığını ortaya koymuşlardır. *atr1Δ* mutantları bora karşı çok hassasken, *ATR1*'in aşırı ifade edildiği hücrelerin 225 mM borik asit varlığında bile hayatta kalabildiğini göstermişlerdir. *atr1Δ* mutantlarında hücre içi bor miktarının yüksek olması ve *ATR1*'in aşırı ifade edildiği hücrelerde ise düşük olması, Atr1 proteininin boru tek yönlü olarak, hücre dışına doğru kontrol ettiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda bulunan *GpBOR4* geni ise 300 mM borik asite dayanım göstererek şimdiye kadar tanımlanmış BOR transporterlarından en yüksek dayanıklılık kazandıran gendir.

Miwa vd. (2007) yaptıkları çalışmada *AtBOR4* geninin Arabidopsis kök hücrelerinde plazma membranının distal kısmında lokalize olduğunu göstermişlerdir. Bu genin aşırı ekspresyonu borun köklerden dışarı atılarak bitkinin bor toksisitesi altında büyümesini iyileştirmiştir, ayrıca hücre içi bor miktarında azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan Takano vd. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Bor1p'nin plazma membranına lokalize olan bir protein olduğunu ve hücre içi borun azaltılmasında rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda *GpBOR4-EGFP* füzyon geninin aşırı ifadelendiği *atr1Δ* maya hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsüne göre transporter füzyon proteinin hücrenin plazma membranına lokalize olduğu görülmektedir. Bu sonuç daha önceki çalışmalar ile örtüşmektedir ve *GpBOR4*'ün fonksiyonunu ortaya koymak için önemli bir çıktı sağlamaktadır.

GpBOR4 genini içeren mayaların hücre içi bor konsantrasyonunun WT mayaya kıyasla azalması, genimizin boru aktif olarak effluks ile dışarı attığına güçlü bir kanıt sunmaktadır. Bu bulgu literatürde *S. cerevisiae*'de tanımlanan Bor1p proteininin

fonksiyonu ile uyumludur; Bor1p, plazma membranında lokalize olarak hücre içi bor seviyesini azaltan bir bor-efflux pompası olarak tanımlanmıştır. Özellikle, *bor1Δ* mutant mayalarda bor birikiminin artması ve bor1 aşırı ekspresyonunun hücre içi boru düşürerek tolerans sağlaması, Bor1p'nin bor toksisitesine karşı koruyucu rolünü göstermektedir (Takano vd. 2007). Diğer taraftan Sutton vd. (2007) *HvBot1* geninin mayada, wild type mayaya kıyasla hücre içi bor miktarını azalttığını ortaya koymaktadır. Takano vd. (2002) WT maya, *bor1* geni bakımından mutant maya ve *BOR1* geni aktarılmış mayanın hücre içi bor miktarlarını karşılaştırdıklarında en yüksek çözünebilir boru mutant mayada, en düşük boru ise WT mayada gözlemlenmiştir. Ayrıca, başka bir çalışmada (Kaya vd. 2009) *ATR1* geninin de mayada ana bor taşıyıcı (effluks) sistemlerinden biri olduğu gösterilmiştir. *ATR1*'in aşırı ekspresyonu, hücre içi bor miktarını azaltırken, *ATR1*'in yokluğu hücre içi bor birikimini artırmakta ve büyüme üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Sonuç olarak, bizim genimizin mayada bor birikimini azaltması, Bor1p veya *ATR1* benzeri bir bor taşıyıcı işlevi üstlenebileceğini güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır.

Miwa vd. (2007) *AtBOR4* geninin aşırı ifadelendiği transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin, yabani tip (WT) için toksik kabul edilen 10 mM borik asit içeren ortamda gelişimlerini sürdürebildiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızda pIPKb004 vektörü ile gateway klonlama prensibi kullanılarak *GpBOR4* geninin *Arabidopsis*'e aktarılması sonucu oluşan T3 hatlarının, 10 mM borik asit koşullarında WT bitkilere kıyasla belirgin bir fenotipik dayanıklılık sergilemediği gözlemlenmiştir. Bu farklılığın, Miwa vd. (2007) 'nin *Arabidopsis*'in endojen *BOR4* genini aşırı düzeyde ifade eden hatları kullanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak diğer taraftan tez çalışması kapsamında GFPUSPlus vektörüne geleneksel klonlama yapılarak *GpBOR4* geninin aktarılması sonucu T2 hatlarının 4 tanesinin 5 mM, bu 4 taneden 3'ünün ise 10 mM'da gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki binary vektör ile yapılan transformasyonlar farklı sonuçlara neden olmuştur. *Arabidopsis*'in toleransını etkileyen bu farkların bazı moleküler nedenlerinin olduğu düşünülmüştür. Bunlardan ilki gateway klonlamada kullanılan att dizilerinin veya klonlama sırasında oluşan scar bölgelerinin *BOR4* proteininin aminoasit dizisine eklemiş olabileceğidir. Bu durumda N ya da C terminalde meydana gelen değişikliklerden dolayı proteinin yapısı, işlevselliği bozulmuş ve plazma membranına lokalizasyonu gerçekleşmemiş olabilir. Diğer taraftan iki vektör arasındaki 5'UTR, promotör, terminatör sekanslarının farklılığı translasyonun etkinliğini ve proteinin stabilitesini etkilemiş olabilir.

Yapılan qPCR analizlerinde, pIPKb004 vektörü ile *GpBOR4* geninin aktarıldığı transgenik hatlarda gen ifadesinin yüksek düzeyde olduğu ortaya konulmuştur. Ancak buna rağmen söz konusu transgenik bitkilerde bor toleransında bir artış gözlenmemesi, genin ifadesine rağmen fonksiyonel bir proteine dönüşmediği düşüncesini güçlendirmektedir. Bu durum, *GpBOR4* proteininin *Arabidopsis* hücre ortamında uygun şekilde katlanamaması, post-translasyonel modifikasyonlarda aksaklık yaşanması ya da proteinin hızlı bir şekilde degradasyona uğraması gibi nedenlerle işlevini yerine getirememesinden kaynaklanıyor olabilir.

GpBOR4 geninin *G. perfoliata*'nın genomunda kaç kopya olduğunu saptamak amacıyla Southern blot analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre *KpnI* ve *XbaI*–*BamHI* ile

yapılan restriksiyon kesimlerinde 800 bp'lik prob ile her iki kesimde de yalnızca tek spesifik bant gözlenmiştir. Bu bulgu, prob bölgesinin sekansa özgül olduğu düşünüldüğünde endojen genin genomda tek kopya olarak bulunduğunu güçlü biçimde desteklemektedir. Ancak yapılacak ilave restriksiyon kesimleriyle sonucun doğrulanmaya ihtiyacı vardır. *G. perfoliata*'nın genom büyüklüğü bilinmemekle birlikte, aynı ailede yer alan *Gypsophila paniculata*'nın genom büyüklüğünün 749.58 Mb olduğu bildirilmiştir (Li vd. 2022). *G. perfoliata*'nın da benzer bir genom büyüklüğüne sahip olduğu varsayıldığında, restriksiyon kesim reaksiyonu için kullanılan 50 µg genomik DNA'nın yetersiz kalması, bantların jel üzerinde silik görünmesine neden olmuş olabilir.

Bizim çalışmamızda *G. perfoliata*'nın *GpBOR4* gen ifadesine 500 mg/L bor uygulaması sonucu artan saatlerde bakılmıştır. Diğer taraftan Miwa vd. (2014) Arabidopsis endojen *BOR4* geninin ekspresyonuna 3 mM borik asit (yaklaşık 32,4 mg/L bora eşit) konsantrasyonunda baktıkları çalışmada gen ifadesinin 3 günlük uygulama sonucunda 2 kat arttığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise 12. saatte gen ifadesinin kontrole göre neredeyse 7 kat artması, *GpBOR4*'ün bor stresine karşı çok daha hızlı ve güçlü bir transkripsiyonel yanıt verdiğini göstermektedir. Bu belirgin fark, *G. perfoliata*'nın doğal olarak yüksek borlu topraklarda evrimleşmiş bir tür olması nedeniyle bor algılama ve yanıt mekanizmalarının daha duyarlı ve etkin şekilde düzenlendiğine işaret etmekte olup, *GpBOR4*'ün bu türde bor toleransının temel düzenleyicilerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgular ışığında gelecek çalışmalarda yapılabilecek deneyler ve araştırmalar hala bulunmaktadır. Öncelikle Arabidopsis'te iki farklı vektör ile elde edilen sonuçlar arasındaki belirgin farklılık, *GpBOR4*'ün heterolog sistemlerdeki işlevselliğinin vektör yapısı, translasyonel verim, protein stabilitesi ve hücresel lokalizasyon gibi moleküler parametrelere duyarlı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda, *GpBOR4* proteininin Arabidopsis'teki katlanma dinamiklerinin, membrana taşınma mekanizmasının ve proteolitik yıkım süreçlerinin detaylı olarak incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

GFPGUSPlus vektörü kullanılarak *GpBOR4* geninin transforme edildiği hatlardan bazıları T2 jenerasyonunda 10 mM borik asite dayanmıştır. Ancak bu hatların homozigotlaştırılarak T3 hatlarında toleransın devam ettiği gösterilmelidir.

T3 jenerasyonunda dayanıklı bulunacak bitkilerin WT Arabidopsis'e kıyasla kök, sürgün boy ölçümleri yapılabilir, hücredeki bor atım miktarını belirlemek amacıyla ICP analizi gerçekleştirilebilir.

Tez çalışmasında *GpBOR4* geni GFPGUSPlus vektöründeki GFP geniyle füzyon yapılmıştır. Arabidopsis hücrelerinde genin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla konfokal mikroskop çalışmaları yapılarak *GpBOR4* proteininin lokalizasyonu belirlenebilir.

Son olarak, *GpBOR4*'ün homologlarının genom çapında tanımlanması, bor toleransındaki etkileşim ağlarının ortaya konulması ve tarımsal öneme sahip türlerde genin kontrollü ifadesiyle yüksek bor toleransına sahip yeni bitki hatlarının

geliştirilmesi, bu çalışmanın gelecekteki en önemli araştırma hedefleri arasında yer almaktadır.



6. SONUÇLAR

Bor toksisitesi dünya genelinde tarımsal üretimi olumsuz etkileyen bir abiyotik stres faktörüdür. Özellikle düşük yağış alan kurak ve yarı kurak bölgelerde bor topraktan iyi şekilde süzülemediği için birikerek toksik seviyelere ulaşır. Bor toksisitesi bitkilerin yapraklarında sararmalara, kloroz ve nekroza sebep olurken, kök gelişimini de olumsuz olarak etkiler. Toprakta borun yıkanarak uzaklaştırılması zahmetli bir yöntemdir. Bunun yerine boru bünyesinde biriktirebilen bor akümülatör bitkilerin kullanımı toprağın bor içeriğini azaltacak yöntemlerden biridir. Bazı bitkiler yüksek borlu topraklarda hayatta kalma yeteneğine sahiptir. Bu bitkiler boru bünyelerinde yüksek oranda biriktirmelerine karşın toksisite belirtisi göstermezler. Bu bitkilerden biri de *Gypsophila perfoliata* L.'dir. Bor madeni çevresinde yetişebilen birkaç türden biri olan *G. perfoliata*, $8900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ bor içeren toprakta hayatta kalabilmektedir ve yapraklarında $1490 \pm 172 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, köklerinde ise $57 \pm 16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ bor biriktirebilmektedir. Bu tez kapsamında bor hiperakümülatörü olan bu türün bor tolerans mekanizması araştırılmıştır. Bunun için kök cDNA kütüphanesi maya fonksiyonel tarama testi ile taranmış ve borun atımından sorumlu bir gen tespit edilmiştir. Bu gen *A. thaliana*'da iyi şekilde karakterize edilmiş '*HCO3- transporter family (BOR4)*' geniyle %72.9 oranında homoloji göstermektedir. Bulunan *Gypsophila perfoliata BOR4 (GpBOR4)* genini taşıyan BY4743 Δ atr1 maya, WT mayaya (BY4743 Δ atr1/EV) göre belirgin düzeyde bor toleransı göstermiştir. Normal şartlarda borik asit için tolere edilebilen en yüksek konsantrasyon olan 55 mM'ın neredeyse altı katı olan 300 mM borik asit içeren ortamda *GpBOR4* genini taşıyan PKB26 olarak isimlendirilen maya kolonisi hayatta kalabilmiştir. Bu sonuç, *GpBOR4* geninin bor homeostazında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

GpBOR4 cDNA dizisinin *EGFP* geni ile füzyon edilmesiyle oluşturulan maya ekspresyon vektörü, *S. cerevisiae* BY4743 Δ atr1 suşuna aktarılmış ve elde edilen rekombinant maya hücrelerinde konfokal mikroskop analizleri yapılmıştır. Yapılan lokalizasyon analizleri sonucunda, füzyon proteininin plazma membranına lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, *GpBOR4* proteininin hücre zarında görev yapan ve borun dışı atımından sorumlu bir taşıyıcı protein olabileceğini ortaya koymaktadır.

Mayada bor stresi altında hücre içi bor miktarının ölçüldüğü deneyde *GpBOR4* genini içeren mayaların wild type mayaya kıyasla boru hücre içinde daha az biriktirdiği belirlenmiştir. Bu da *GpBOR4* geninin hücre içi borun dışarı atılmasında görev alan bir taşıyıcı proteini kodladığını kanıtlamaktadır.

Bununla birlikte, *GpBOR4* geni mayada bor toleransını belirgin şekilde artırmasına rağmen, aynı genin *A. thaliana*'ya aktarılması sonucunda, transgenik bitkilerin yabani tip (WT) bitkilere kıyasla bor stresine karşı belirgin bir fenotipik dayanıklılık göstermediği gözlemlenmiştir. qPCR sonuçları bazı transgenik hatlarda yüksek düzeyde gen ifadesine işaret etmesine rağmen, bu bitkilerin morfolojik olarak stres koşullarında farklılık göstermemesi, aktarılan genin ya fonksiyonel bir protein üretmediğini ya da üretilen proteinin hızlı bir şekilde hücre içinde degrade olduğunu düşündürmüştür. Buna karşın başka bir bitki ekspresyon vektörü olan GFP_{GUS}Plus vektörüne geleneksel klonlama ile aktarılan *GpBOR4* geninin bitkiye dayanıklılık

sağlayıp sağlamadığı araştırıldığında T2 bitkilerinin 10 mM borik asit içeren ortamda hayatta kalabildiği gösterilmiştir.

G. perfoliata'nın endojen geni olan *GpBOR4*'ün ifadenme durumu artan saat aralıklarında qPCR yapılarak belirlenmiştir. Buna göre 6. saatten itibaren gen ifadesi artmış, 48. saate gelindiğinde kontrolle aynı seviyeye gerilemiştir. En yüksek ifadenme 12. saatte görülmüştür.

GpBOR4 geninin *G. perfoliata* genomunda kaç kopya olduğu tespit etmek amacıyla yapılan southern blot analizinde, gen kopya sayısı tek olarak düşünülmektedir ve genin genomdaki varlığı gösterilmiştir.

Bu araştırmada bor hiperakümülatörü *G. perfoliata*'nın bor tolerans mekanizmasına ışık tutacak şekilde *GpBOR4* geni detaylı olarak karakterize edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ortaya konulan tüm bulgular *GpBOR4*'ün bor taşınımı ve toksisiteye karşı tolerans mekanizmasının temel bileşenlerinden biri olabileceğini göstermekte olup, bor stresine dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesine yönelik gelecekteki moleküler ve genetik çalışmalar için önemli bir temel sunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Abreu, C. A. d., van Raij, B., Abreu, M. F. d., & González, A. P. 2005. Routine soil testing to monitor heavy metals and boron. *Scientia Agricola*, 62, 564-571.
- Aftab, T., Khan, M. M. A., Idrees, M., Naeem, M., Moinuddin, & Hashmi, N. 2011. Methyl jasmonate counteracts boron toxicity by preventing oxidative stress and regulating antioxidant enzyme activities and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Protoplasma*, 248, 601-612.
- Aftab, T., Khan, M. M. A., Naeem, M., Idrees, M., da Silva, J. A. T., & Ram, M. 2012. Exogenous nitric oxide donor protects *Artemisia annua* from oxidative stress generated by boron and aluminium toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 60-68.
- Aibara, I., Hirai, T., Kasai, K., Takano, J., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T., & Miwa, K. 2018. Boron-dependent translational suppression of the borate exporter BOR1 contributes to the avoidance of boron toxicity. *Plant physiology*, 177(2), 759-774.
- Akbudak, M., Cirik, N., Erdeger, S., Filiz, E., Dogu, S., & Bor, M. 2024. GpEF1A: a novel lysine methyltransferase gene from *Gypsophila perfoliata* L. involved in boron homeostasis. *Plant Biology*, 26(5), 727-734.
- Aquea, F., Federici, F., Moscoso, C., Vega, A., Jullian, P., Haseloff, J., & ARCE-JOHNSON, P. 2012. A molecular framework for the inhibition of *Arabidopsis* root growth in response to boron toxicity. *Plant, cell & environment*, 35(4), 719-734.
- Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., & Dural, H. 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels. *Turkish Journal of Botany*, 28(3), 273-278.
- Baker, A. J. 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1-4), 643-654.
- Brdar-Jokanović, M. 2020. Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1424.
- Buser, C. 2010. Toward sub-second correlative light and electron microscopy of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in cell biology* (Vol. 96, pp. 217-234). Elsevier.
- Canon, P., Aquea, F., Rodríguez-Hoces de la Guardia, A., & Arce-Johnson, P. 2013. Functional characterization of *Citrus macrophylla* BOR1 as a boron transporter. *Physiologia Plantarum*, 149(3), 329-339.
- Chatterjee, M., Tabi, Z., Galli, M., Malcomber, S., Buck, A., Muszynski, M., & Gallavotti, A. 2014. The boron efflux transporter ROTTEN EAR is required for maize inflorescence development and fertility. *The Plant Cell*, 26(7), 2962-2977.
- Chesworth, W. 1991. Geochemistry of micronutrients. *Micronutrients in agriculture*, 4, 1-30.

- Choi, E. Y., Kolesik, P., McNeill, A., Collins, H., Zhang, Q., Huynh, B. L., Graham, R., & Stangoulis, J. 2007. The mechanism of boron tolerance for maintenance of root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, cell & environment*, 30(8), 984-993.
- Colak, S. N. E., & Akbudak, M. A. 2025. Arabidopsis BOR transporters and their regulation under boron toxicity. *Rhizosphere*, 101140.
- Coskun, Y., Olgunsoy, P., Karatas, N., Bulut, F., & Yazar, F. 2014. Mannitol application alleviates boron toxicity in wheat seedlings. *Communications in soil science and plant analysis*, 45(7), 944-952.
- Domingues, D. S., Leite, S. M. M., Farro, A. P. C., Coscrato, V. E., Mori, E. S., Furtado, E. L., Wilcken, C. F., Velini, E. D., Guerrini, I. A., & Maia, I. G. 2005. Boron transport in Eucalyptus. 2. Identification in silico of a putative boron transporter for xylem loading in eucalypt. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 625-629.
- Dordas, C., & Brown, P. H. 2001. Evidence for channel mediated transport of boric acid in squash (*Cucurbita pepo*). *Plant and soil*, 235, 95-103.
- Doyle, J. 1991. DNA Protocols for Plants. In G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, & J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy* (pp. 283-293). Springer Berlin Heidelberg.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia horticulturae*, 113(2), 120-128.
- Esim, N., Tiryaki, D., Karadagoglu, O., & Atici, O. 2013. Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. *Toxicology and industrial health*, 29(9), 800-805.
- Funakawa, H., & Miwa, K. 2015. Synthesis of borate cross-linked rhamnogalacturonan II. *Frontiers in Plant Science*, 6, 223.
- Goldbach, H. 1997. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 15(1), 51-91.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research*, 10(11), 1788-1795.
- Hua, T., Zhang, R., Sun, H., & Liu, C. 2021. Alleviation of boron toxicity in plants: Mechanisms and approaches. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(24), 2975-3015.
- Huber-Morath, A. 1967. *Gypsophila* L. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 2, 149-171.
- Kajikawa, M., Fujibe, T., Uruguchi, S., Miwa, K., & Fujiwara, T. 2011. Expression of the Arabidopsis borate efflux transporter gene, AtBOR4, in rice affects the xylem loading of boron and tolerance to excess boron. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(12), 2421-2423.

- Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Toyoda, A., & Fujiwara, T. 2011. High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6175-6183.
- Kaya, A., Karakaya, H. C., Fomenko, D. E., Gladyshev, V. N., & Koc, A. 2009. Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), 3665-3674.
- Kaya, C., Sarioğlu, A., Akram, N. A., & Ashraf, M. 2019. Thiourea-mediated nitric oxide production enhances tolerance to boron toxicity by reducing oxidative stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1094-1109.
- Kurt, F., & Aydın, A. 2020. An in-silico study: interaction of BOR1-type boron (B) transporters with a small group of functionally unidentified proteins under various stresses in potato (*Solanum tuberosum*). *Commagene Journal of Biology*, 4(2), 134-139.
- Landi, M., Degl'Innocenti, E., Pardossi, A., & Guidi, L. 2012. Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review. *Am. J. Agric. Biol. Sci*, 7(3), 255-270.
- Landi, M., Remorini, D., Pardossi, A., & Guidi, L. 2013. Purple versus green-leafed *Ocimum basilicum*: Which differences occur with regard to photosynthesis under boron toxicity? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 942-951.
- Landi, M., Guidi, L., Pardossi, A., Tattini, M., & Gould, K. S. 2014. Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Planta*, 240(5), 941-953.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I. E., & Araniti, F. 2019. Boron toxicity in higher plants: an update. *Planta*, 250, 1011-1032.
- Leaungthitikanhachana, S., Fujibe, T., Tanaka, M., Wang, S., Sotta, N., Takano, J., & Fujiwara, T. 2013. Differential expression of three BOR1 genes corresponding to different genomes in response to boron conditions in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and cell physiology*, 54(7), 1056-1063.
- Lewis, D. H. 2019. Boron: the essential element for vascular plants that never was. *New Phytologist*, 221(4), 1685-1690.
- Li, F., Gao, Y., Jin, C., Wen, X., Geng, H., Cheng, Y., Qu, H., Liu, X., Feng, S., & Zhang, F. 2022. The chromosome-level genome of *Gypsophila paniculata* reveals the molecular mechanism of floral development and ethylene insensitivity. *Horticulture Research*, 9, uhac176.
- Loomis, W. D., & Durst, R. 1992. Chemistry and biology of boron. *BioFactors (Oxford, England)*, 3(4), 229-239.
- Luo, J., Liang, Z., Wu, M., & Mei, L. 2019. Genome-wide identification of BOR genes in poplar and their roles in response to various environmental stimuli. *Environmental and Experimental Botany*, 164, 101-113.
- Macho-Rivero, M. A., Herrera-Rodríguez, M. B., Brejcha, R., Schäffner, A. R., Tanaka, N., Fujiwara, T., González-Fontes, A., & Camacho-Cristóbal, J. J. 2018. Boron

- toxicity reduces water transport from root to shoot in *Arabidopsis* plants. Evidence for a reduced transpiration rate and expression of major PIP aquaporin genes. *Plant and cell physiology*, 59(4), 841-849.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., & Verdoucq, L. 2015. Aquaporins in plants. *Physiological reviews*, 95(4), 1321-1358.
- Mertens, J., Van Laer, L., Salaets, P., & Smolders, E. 2011. Phytotoxic doses of boron in contrasting soils depend on soil water content. *Plant and soil*, 342, 73-82.
- Miwa, K., Takano, J., & Fujiwara, T. 2006. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 46(6), 1084-1091.
- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K., & Fujiwara, T. 2007. Plants tolerant of high boron levels. *Science*, 318(5855), 1417-1417.
- Miwa, K., Takano, J., Seki, M., Shinozaki, K., & Fujiwara, T. 2006. Roles of BOR3-5 in boron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*,
- Miwa, K., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T., & Fujiwara, T. 2013. Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 163(4), 1699-1709.
- Miwa, K., Aibara, I., & Fujiwara, T. 2014. *Arabidopsis thaliana* BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(3), 349-355.
- Nable, R., & Paull, J. (1990). Effect of excess grain boron concentrations on early seedling development and growth of several wheat (*Triticum aestivum*) genotypes with different susceptibilities to boron toxicity. *Plant Nutrition—Physiology and Applications: Proceedings of the Eleventh International Plant Nutrition Colloquium*, 30 July–4 August 1989, Wageningen, The Netherlands,
- Nable, R. O., Bañuelos, G. S., & Paull, J. G. 1997. Boron toxicity. *Plant and soil*, 193, 181-198.
- Nakagawa, Y., Hanaoka, H., Kobayashi, M., Miyoshi, K., Miwa, K., & Fujiwara, T. 2007. Cell-type specificity of the expression of Os BOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. *The Plant Cell*, 19(8), 2624-2635.
- Noguchi, K., Yasumori, M., Imai, T., Naito, S., Matsunaga, T., Oda, H., Hayashi, H., Chino, M., & Fujiwara, T. 1997. bor1-1, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant physiology*, 115(3), 901-906.
- Nozawa, A., Takano, J., Kobayashi, M., Von Wirén, N., & Fujiwara, T. 2006. Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 262(2), 216-222.
- Onuh, A. F., & Miwa, K. 2021. Regulation, diversity and evolution of boron transporters in plants. *Plant and cell physiology*, 62(4), 590-599.

- Papadakis, I. E., Tsiantas, P. I., Tsaniklidis, G., Landi, M., Psychoyou, M., & Fasseas, C. 2018. Changes in sugar metabolism associated to stem bark thickening partially assist young tissues of *Eriobotrya japonica* seedlings under boron stress. *Journal of plant physiology*, 231, 337-345.
- Parker, M. D., & Boron, W. F. 2013. The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters. *Physiological reviews*, 93(2), 803-959.
- Pereira, G. L., Siqueira, J. A., Batista-Silva, W., Cardoso, F. B., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. 2021. Boron: more than an essential element for land plants? *Frontiers in Plant Science*, 11, 610307.
- Pérez-Castro, R., Kasai, K., Gainza-Cortés, F., Ruiz-Lara, S., Casaretto, J. A., Peña-Cortés, H., Tapia, J., Fujiwara, T., & González, E. 2012. VvBOR1, the grapevine ortholog of AtBOR1, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L. *Plant and cell physiology*, 53(2), 485-494.
- Power, P. P., & Woods, W. G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and soil*, 193, 1-13.
- Princi, M. P., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F., & Abenavoli, M. R. 2016. Boron toxicity and tolerance in plants: Recent advances and future perspectives. *Plant metal interaction*, 115-147.
- Reid, R. J., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. R., & Graham, R. D. 2004. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, cell & environment*, 27(11), 1405-1414.
- Reid, R. 2007. Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and cell physiology*, 48(12), 1673-1678.
- Reid, R. 2014. Understanding the boron transport network in plants. *Plant and soil*, 385, 1-13.
- Routray, P., Li, T., Yamasaki, A., Yoshinari, A., Takano, J., Choi, W. G., Sams, C. E., & Roberts, D. M. 2018. Nodulin intrinsic protein 7; 1 is a tapetal boric acid channel involved in pollen cell wall formation. *Plant physiology*, 178(3), 1269-1283.
- Shorrocks, V. M. 1983. Boron deficiency--its prevention and cure. *Boron deficiency--its prevention and cure*.
- Shorrocks, V. M. 1997. The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and soil*, 193(1), 121-148.
- Stewart, G. 2014. SACCHAROMYCES| *Saccharomyces cerevisiae*.
- Sun, A., Gou, D., Dong, Y., Xu, Q., & Cao, G. 2019. Extraction and analysis of available boron isotopes in soil using multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(25), 7183-7189.
- Sun, J., Shi, L., Zhang, C., & Xu, F. 2012. Cloning and characterization of boron transporters in *Brassica napus*. *Molecular Biology Reports*, 39, 1963-1973.

- Sutton, T., Baumann, U., Hayes, J., Collins, N. C., Shi, B.-J., Schnurbusch, T., Hay, A., Mayo, G., Pallotta, M., & Tester, M. 2007. Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science*, 318(5855), 1446-1449.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., & Fujiwara, T. 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420(6913), 337-340.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wirén, N., & Fujiwara, T. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of Arabidopsis thaliana, regulated by boron availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12276-12281.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wirén, N., & Fujiwara, T. 2006. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5; 1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell*, 18(6), 1498-1509.
- Takano, J., Kobayashi, M., Noda, Y., & Fujiwara, T. 2007. Saccharomyces cerevisiae Bor1p is a boron exporter and a key determinant of boron tolerance. *FEMS microbiology letters*, 267(2), 230-235.
- Takano, J., Miwa, K., & Fujiwara, T. 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science*, 13(8), 451-457.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., & Fujiwara, T. 2010. Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 5220-5225.
- Tanaka, M., & Fujiwara, T. 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456, 671-677.
- Tanaka, M., Sotta, N., Yamazumi, Y., Yamashita, Y., Miwa, K., Murota, K., Chiba, Y., Hirai, M. Y., Akiyama, T., & Onouchi, H. 2016. The minimum open reading frame, AUG-stop, induces boron-dependent ribosome stalling and mRNA degradation. *The Plant Cell*, 28(11), 2830-2849.
- Tanaka, M., Takano, J., Chiba, Y., Lombardo, F., Ogasawara, Y., Onouchi, H., Naito, S., & Fujiwara, T. 2011. Boron-dependent degradation of NIP5; 1 mRNA for acclimation to excess boron conditions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3547-3559.
- Tanaka, M., Wallace, I. S., Takano, J., Roberts, D. M., & Fujiwara, T. 2008. NIP6; 1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(10), 2860-2875.
- Tanaka, N., Uruguchi, S., Saito, A., Kajikawa, M., Kasai, K., Sato, Y., Nagamura, Y., & Fujiwara, T. 2013. Roles of pollen-specific boron efflux transporter, OsBOR4, in the rice fertilization process. *Plant and cell physiology*, 54(12), 2011-2019.
- Uruguchi, S., Kato, Y., Hanaoka, H., Miwa, K., & Fujiwara, T. 2014. Generation of boron-deficiency-tolerant tomato by overexpressing an Arabidopsis thaliana borate transporter AtBOR1. *Frontiers in Plant Science*, 5, 125.

- Wakuta, S., Fujikawa, T., Naito, S., & Takano, J. 2016. Tolerance to excess-boron conditions acquired by stabilization of a BOR1 variant with weak polarity in Arabidopsis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 4.
- Wakuta, S., Mineta, K., Amano, T., Toyoda, A., Fujiwara, T., Naito, S., & Takano, J. 2015. Evolutionary divergence of plant borate exporters and critical amino acid residues for the polar localization and boron-dependent vacuolar sorting of AtBOR1. *Plant and cell physiology*, 56(5), 852-862.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, 2(8), e718.
- Yoshinari, A., & Takano, J. 2017. Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1951.
- Yoshinari, A., Fujimoto, M., Ueda, T., Inada, N., Naito, S., & Takano, J. 2016. DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron-induced degradation of the borate transporter BOR1 in Arabidopsis thaliana. *Plant and cell physiology*, 57(9), 1985-2000.
- Zhao, R., & Reithmeier, R. A. 2001. Expression and characterization of the anion transporter homologue YNL275w in Saccharomyces cerevisiae. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(1), C33-C45.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology*, 136(1), 2621-2632.

ÖZGEÇMİŞ

Şeyma Nur ERDEĞER ÇOLAK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2019-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2017-2019	Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Konya
Lisans 2013-2017	Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Konya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Colak, S. N. E., & Akbudak, M. A. (2025). Arabidopsis BOR transporters and their regulation under boron toxicity. *Rhizosphere*, 101140.
- 2- Akbudak, M. A., Cirik, N., Erdeger, S. N., Filiz, E., Dogu, S., & Bor, M. (2024). GpEF1A: a novel lysine methyltransferase gene from *Gypsophila perfoliata* L. involved in boron homeostasis. *Plant Biology*, 26(5), 727-734.
- 3- Çetin, A. N., Uncu, A. T., Şen, F., Erdeğer, Ş. N., & Türkmen, Ö. (2021). Determination of Resistance Levels to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and ZYMV and Homogeneity in Some Melon Genotypes.
- 4- Sen, F., Uncu, A. O., Uncu, A. T., & Erdeger, S. N. (2020). The trnL (UAA)-trnF (GAA) intergenic spacer is a robust marker of green pea (*Pisum sativum* L.) adulteration in economically valuable pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 3056-3061.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Erdeger Colak Ş.N. and Akbudak M.A. (2021). Determination of NaCl and Sorbitol Concentration Restricting The Development of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. 7th INTERNATIONAL ARTUKLU SCIENTIFIC RESEARCHES CONFERENCE BOOK 2021.

