

TÜBİTAK

2007-593
✓

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

95817

**ARPADA (*Hordeum vulgare* L.) BOR
TOKSİSİTESİNE TOLERANS GÖSTEREN
GENLERİN mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY
VE RT-PCR YÖNTEMLERİ İLE
BELİRLENMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

PROJE NO : 103T174

**Yrd. Doç. Dr. H. ÇAĞLAR KARAKAYA
ERSİN AKINCI**

**AĞUSTOS 2007
İZMİR**

Önsöz

Borun, son yıllarda Türkiye’de oldukça yüksek miktarlarda bulunduğu saptanması ve ekonomik olarak katkısının artacağı öğrenilmesinden sonra canlılar üzerindeki etkileride güncellik kazanmış bulunmaktadır. Canlıların yapısında var olan bütün elementlerin fonksiyonlarının bilinmesine rağmen bor hakkındaki bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada da borun bitkiler üzerindeki etkilerini öğrenmek amacıyla bor toksisitesine tolerans gösteren arpa bitkisindeki genetik mekanizma anlaşılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, Farklılığın Gösterimi (Differential Display), RT-PCR, 2D-PAGE moleküler teknikleri kullanılarak, bor toksisitesine dayanıklı ve dayanıksız arpa çeşitleri arasında kıyaslama yaparak dayanıklılıkta rol oynayan genlerin bulunmasına çalışılmıştır. Bulunan sonuçlar, bitkinin girdiği stress sonucu fotosentez ve strese bağlı olarak artan genlerin ve proteinlerin seviyelerinin değiştiğini göstermiş olmakla beraber dayanıklılığın mekanizmasının tam olarak açıklanmasını sağlamamaktadır. Bu nedenle borun hücre dışına atılmasını sağlayan proteinleri bulmak için bor stresine dayanıklı olan çeşitlerden cDNA kütüphanesi hazırlanmaya çalışılmakta olup bu kütüphane maya içinde ekspres edilerek komplementation çalışmalarında kullanılacaktır. Proje bu aşamaya kadar TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup proje diğer kaynaklardan elde edilen destekle devam edecektir.

İçindekiler:

Özet	3
Abstract	4
1.0. Giriş	5
2.0. Genel Bilgiler	5
3.0. Gereç ve Yöntem	6
4.0. Bulgular	10
5.0. Tartışma ve Sonuç	19
Yararlanılan kaynak	21
Proje özet bilgi formu	22

Özet:

Bor, bitkilerin gelişmesinde rol oynayan bir mikroelementtir. Ancak fazla miktardaki bor bitkiler için toksiktir. Türkiye, dünyada en fazla bor rezervine sahip ikinci ülkedir ve bu yüzden bor tarımında Türkiye için ciddi bir problemdir. Arpa (*Hordeum vulgare*), Türkiye’de buğdaydan sonra en çok üretilen tahıldır. Türkiye’de 10 farklı arpa çeşidi vardır ve bunlar bor toksisitesine karşı farklı genetik varyasyonlar gösterir. Bu çalışmada Hamidiye (bora karşı dirençsiz) ve Anadolu (bora karşı dirençli) çeşitleri arasındaki bor toleransından sorumlu genetik mekanizmayı ortaya çıkarmak için mRNA Farklılık Gösterim (Differential Display), RT-PZR, 2D-PAGE teknikleri kullanılmıştır. mRNA Farklılık Gösterim tekniği ile farklı eksprese olan 8 gen tespit edilmiştir. RT-PZR ile 43 antiporter geninden 6’sının Anadolu ve Hamidiye çeşitleri arasında farklı düzeylerde eksprese oldukları gösterilmiştir. 2D-PAGE tekniği ile de 9 farklı protein bor uygulanmış Anadolu çeşidinde tespit edilmiştir. Elde edilen bu genlerin strese bağlı olarak ortaya çıkan ve fotosentezle ilgili olduğu gözlemlenmiş olup bora dayanıklılıkla direkt olarak ilgili olmadıkları görülmektedir.

Anahtar Sözcükler

Arpa, bor, differential display (farklılığın gösterimi), RT-PCR, 2D-PAGE

Abstract:

Boron, is a microelement that plays a role in plant development. However, excess amount of boron is toxic for plants. Turkey is the second country that has the most boron reserve in the world, thus boron is a serious problem in agriculture in Turkey. Barley (*Hordeum vulgare*) is the second widely produced cereal after wheat. Because barley is used in human diet, animal feeding and beer industry it is an economically valuable crop. There are ten different barley varieties in Turkey and these varieties show different genetic variations against boron toxicity. In this study, Hamidiye (boron sensitive) and Anadolu (boron tolerant) varieties were used to identify genes responsible for boron tolerance using RT-PCR and mRNA Differential Display, RT-PCR and 2D-PAGE techniques. Eight differentially expressed genes identified by using Differential Display technique and expression level of six of forty three antiporter genes showed differences between Anadolu and Hamidiye cultivars in RT-PCR. Nine higher expressed proteins were detected in Anadolu cultivar using 2D-PAGE. Differentially expressed genes, obtained from this study, have function in photosynthesis and stress regulation but not directly related with boron tolerance.

Keywords

Barley, boron, differential display, RT-PCR, 2D-PAGE

1.0. Giriş

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

Esasi bir mikrobesein olmasına rağmen borun hücre içerisine nasıl transfer edildiği, hücreye girdikten sonra hangi proteinler ile etkileştiği ve bütün bu biyokimyasal basamakların nasıl düzenlendiği henüz tesbit edilememiştir.

Türkiye’de bor toksisitesi bitkilerin yetişmesinde önemli bir sorun olup bor stresine dayanıklı bitki çeşitlerindeki genetik mekanizmayı anlamak amacıyla arpa bitkisi bu çalışmada kullanılmıştır. Bu amaçla farklılığın gösterimi, RT-PCR, 2D-PAGE gibi moleküler teknikler kullanılarak gen ve protein düzeyindeki farklılıklar tesbit edilmeye çalışılmıştır.

2.0. Genel Bilgiler

Bor bitkilerin büyüme ve gelişmesinde gerekli olan iz elementlerdendir. Hücre duvarının oluşumunda, çiçek, meyve ve tohum gelişiminde rolü olan B, eksikliği veya fazlalığında bitkilerde anormal gelişmelere sebep olmaktadır (Dell ve Huang 1997). Borun topraklardaki eksikliği ya da fazlalığı dünyanın bir çok bölgesinde yetişen tarım ürünlerinin verim kaybında büyük rol oynamaktadır (Gupta, 1993; Nable ve Paull 1991). Dünyadaki bir çok bölge gibi yurdumuzda da yüksek ve düşük konsantrasyonlarda B içeren topraklar rapor edilmiştir (Gezgin, 2002).

Borun bitkilerdeki mekanizması ve nasıl taşındığı tam olarak aydınlatılmış değildir. Uzun yıllarca B’nin borik asit şeklinde pasif olarak taşındığı teorisi ileri sürüldü isede son fizyolojik çalışmalar borun aktif olarak taşındığı göstermiştir (Dannel ve ark. 2002, Brown 2002, Stangoulis 2001). Takano ve arkadaşları (2002) tarafından yayınlanan son çalışmada bir B (transporter) taşıyıcısı olan BOR1 geninin *Arabidopsis thaliana*’dan klonlandığı bildirilmiştir. BOR1 mutasyonuna sahip *A.thaliana* bitkilerinin köklerinde yeterli seviyede B olduğu halde yapraklarda daha az B saptanmış, bununda borun ksilem sayesinde yukarı bölgedeki organlara taşınmadığını ve B taşınma mekanizmasındaki mutasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir. Yapılan positional klonlama sonucu, BOR1 geninin bir hücre zarı proteini kodladığı ve hayvanlardaki bikarbonat taşıyıcısı olan genlerle homoloji gösterdiği açıklanmıştır.

Bazı buğday ve arpa çeşitlerinin B toksitesine karşı tolerans gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Nable,1998; Yau, 2002; Jefferies, 2000). Avustralya’da buğdayda yapılan gen haritalaması çalışmalarında B toksitesine tolerant gösteren türlerde 2 RFLP markır bulunmuş ve kromozom 7B ve 7D lokuslarının B toleransında rol oynadığı bildirilmiştir (Jefferies, 2000).

B toksisite toleransına karşı arpanın genetik varyasyonlar gösterdiği belirlenmiş ve B toleransından sorumlu genlerin arpa genomu içindeki RFLP haritalaması yapılmıştır (Jefferies ve ark. 1999). Bu çalışmanın sonuçlarına göre 4 kromosomal bölge B toleransından sorumlu olarak tesbit edilmiştir. Bu bölgelerden; 2H kromosomu bölgesi B toksisitesinden kaynaklanan yaprak nekrozundan, 3H kromosom bölgesi B toksisitesine dayanıklılıktan kaynaklanan superior kök büyümesinden, 6H kromosom bölgesi B alımının azaltılmasından ve 4H bölgesi B alımının kontrolünden sorumludur. Türkiye’de Anadolu ve Hamidiye arpa çeşitlerinde yapılan çalışmada Anadolu çeşidininin B toleransı gösterdiği Avcı ve ark.(1998) tarafından kayıtlara geçilmiştir. Aynı zamanda bu iki arpa çeşidinde B toksitesininin antioksidant etkileri incelenmiş ve Anadolu çeşidinde antioksidant enzimlerin B tolerans mekanizmasında rolü olmadığı Karabal ve ark (2003) tarafından bildirilmiştir.

Bor toleransı ile ilgili genleri bulmak için bitkilerden cDNA kütüphanesi oluşturularak maya içinde ekspres edilmesi yöntemi ile Nozawa ve ark. (2006) Arabidopsis cDNA kütüphanesini mayada ekspres etmiş ve beş cDNA bulmuşlardır. Bu cDNA lar RNA taşınması, parçalanması, transkripsiyonda rol oynayan genler olup direk borun hücre dışına taşınması ile ilgili görülmemektedir. Ancak borun RNA ile bazı kimyasal bağlanmalar yaparak hücre içindeki toksik etkisinin azalması yüzünden bu bitki cDNA larının maya hücrelerini toksik bor etkisinden koruduğu düşünülmektedir Nozawa ve ark. (2006).

3.0. Gereç ve Yöntem

Anadolu ve Hamidiye türlerinden 40’ar adet tohum seçilip bu tohumlar 20’şerli gruplar halinde 0.8 g/Litre Hoagland içeren besiyerlerinde yetiştirildi. Çimlenmeyi takip eden on günlük süre sonunda, 2 grup kontrol grubu olarak bırakılırken(20 adet hamidiye ve 20 adet anadolu) 2 gruba 10mM borik asit uygulandı(20 adet hamidiye ve 20 adet anadolu). Borik asit uygulamasını takiben 2, 4, 6, 24 ve 48 saat sonra herbir gruptan kök ve gövde örnekleri alındı. Alınan örnekler hemen sıvı nitrojen dolu 15ml lik falkon tüplere konulup - 80°C’ de saklandı. Herbir grubun 2 saatlik yaprak örneklerinden, Promega’nın SV Total RNA Isolation System kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen RNA miktarı spektrofotometre kullanılarak ölçüldü:

(HKY) Hamidiye kontrol yaprak 2 saat: 214µg/ml

(HBY) Hamidiye bor yaprak 2 saat: 224µg/ml₂

(AKY) Anadolu kontrol yaprak 2 saat: 298µg/ml

(ABY) Anadolu bor yaprak 2 saat: 350µg/ml

İzole edilen RNA’lardan reverse transcriptase enzimi kullanılarak cDNA sentezi yapıldı ve -80°C’ de saklandı. Daha sonra bu cDNA’ler arasındaki ekspresyon farkları Delta Differential Display kiti kullanılarak gösterildi. Bu methoda göre cDNA’ler farklı ve rasgele primer kombinasyonları ile

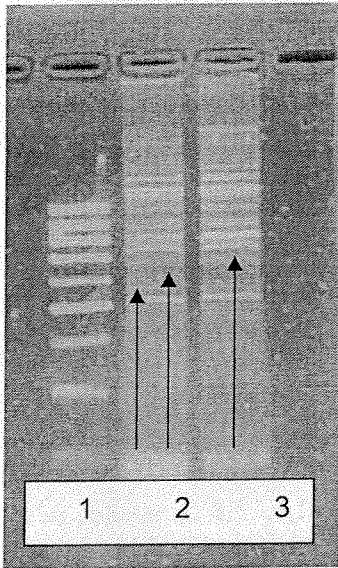
aşağıda belirtilen oranlarda polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) amplifiye edildi:

Taq polymerase: 1 µl, 10X buffer: 2 µl, dNTP: 0.3 µl, P primer: 1 µl, T primer: 1 µl, cDNA: 1 µl, H₂O: 13.7 µl

PCR koşulları:

94°C 2dk	94°C 30sn	94°C 20sn	68°C 7dk
40°C 5dk	40°C 30sn	60°C 30sn	
68°C 5dk	68°C 5dk	68°C 2dk	
1 döngü	2 döngü	23 döngü	1 döngü

PCR ürünleri, 1.5%'luk agarose jelde yürütüldü ve farklı ekspres olmuş olan bantlar jelden kesilip alındı. Bu bantlardan daha sonra QIAquick Gel Extraction kiti yardımıyla DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar aynı primerler kullanılarak PCR'da reamplifiye edildi. Reamplifikasyon ürünleri, Promega'nın pGEM-T Easy Vector Systems kiti kullanılarak JM109 E. Coli hücrelerine transforme edildi.



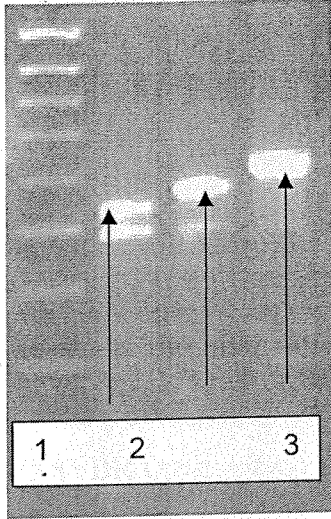
Şekil 1: Delta differential display kiti kullanılarak cDNA'lar arasındaki ekspresyon farklılıklarının agaroz(1.5%) jelde gösterilmesi

Sırasıyla: Markır (100 nt)-HBY-ABY

1 2 3

Primer kombinasyonu: P3T3

Şekilde okla gösterilen bandlar farklı düzeylerde ekspres olan cDNA ları göstermektedir. Bu bandlar jelden kesilip çıkartılmış ve izole edildikten sonra PCR'da tekrar reamplifiye edilmişlerdir.



Şekil 2: Reamplifiye edilen HBY 550 nt, 570 nt ve ABY 680 nt bandlarının agaroz jelde gösterilmesi.

Sırasıyla: Markır (1000nt)-HBY550-HBY570-ABY680

1 2 3 4

Elde edilen reamplifikasyon ürününün bir miktarı (10µl) agaroz jelde yürütülmüş ve reamplifikasyon teyid edilmiştir. Daha sonra reamplifikasyon ürününün geri kalanı klonlama için kullanılmıştır.

Şekil 2 de transformasyonun başarılı olduğu koloniler okla gösterilmiştir. Transformasyonun gerçekleştiği kolonilerden alınan hücre örnekleri LB medium içinde tekrar yetiştirildikten sonra Promega'nın Wizard SV Minipreps DNA Purification System kiti kullanılarak plasmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen bu plasmidler daha sonra EcoRI enzimi ile kesilerek insertlerimizin doğru ebatta olduğu kanıtlanmıştır.

RT-PCR yöntemi ile Bor1 genin amplifikasyonu:

Gen bankasından, *Arabidopsis*'teki Bor1 geninin arpa EST veritabanındaki homolojisine bakılarak belirtilen primerler (Bor1F1: GGTCTGCTGCAAGATGTAATCTGGGT, Bor1R1: TATTATGGAAGCACGCGCCTAGCAC) dizayn edildi. Yaprak örneklerinden alınan RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar bu primerler ile aşağıdaki parametrelere uyularak PZR'da amplifiye edildi.

Taq polimeraz: 0,5 µl, 10X per buffer: 5 µl, dNTP(10mM): 1µl, BOR1R1: 2 µl, BOR1F1: 2 µl, cDNA(ABY): 2 µl, H₂O: 37.5 µl

PCR koşulları:

94°C	3dk	94°C	1dk	72°C	5dk
		61°C	1dk		
		72°C	1dk		
1 döngü		30 döngü		1 döngü	

RealTime PCR

Bor uygulanmış ve uygulanmamış Hamidiye ve Anadolu çeşiti arpa örneklerinden 0, 6, 24, 48 ve 144 saat sonra hem kök hem de yaprak dokuları toplandı. Dokular sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80°C'de saklandı. Bu örneklerden Promega firmasının "RNA

isolation” kiti yardımıyla RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA’ların miktarları spektrofotometre ölçüldü. cDNA izolasyonu için RNA’lar Fermentas firmasının “First strand cDNA synthesis” kiti kullanarak cDNA’ya çevrildi.

Bitkilerdeki antiporter proteinlerini kodlayan sekanslardan arpada bulunanları amplifiye edebilecek olan pirimer çifti sipariş edildi. Bu pirimer çiftlerinin arpada bizim deney koşullarımızda çalışıp çalışmadığını anlamak için herbir pirimer çifti PZR reaksiyonunda denendi.

Örneklerin amplifikasyonu için gerekli olan karışım aşağıdaki şekilde hazırlandı:

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

Real-Time PCR’in koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

Döngü 1	Döngü 2 40x	Döngü 3	Döngü 4	Döngü 5 81x
95 ⁰ C 1:30 dk	94 ⁰ C 0:50 dk 58 ⁰ C 0:45 dk 72 ⁰ C 0:45 dk	95 ⁰ C 1:00 dk	55 ⁰ C 1:00 dk	55 ⁰ C 0:30 dk

İstatistik hesaplamalar IQ5 real time (BIO-RAD) cihazındaki program 3 örnek kullanılarak ve normalizasyon işlemi yaptırılarak hesaplanmıştır.

2D-PAGE Analizi

Anadolu Kontrol (AC), Anadolu Bor (AB), Hamidiye Kontrol (HC), Hamidiye Bor (HB) arpa çeşitlerinden yaprak örnekleri alınıp TriZOL çözültisi kullanılarak toplam proteinler izole edildi. Toplam proteinlerin konsantrasyonu Bradford metodu kullanılarak hesaplandı. Bio-rad firmasından alınan PROTEAN II xi Cell ve PROTEAN II xi 2-D Cell iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak toplam proteinler birbirlerinden ayrışmaları sağlandı.

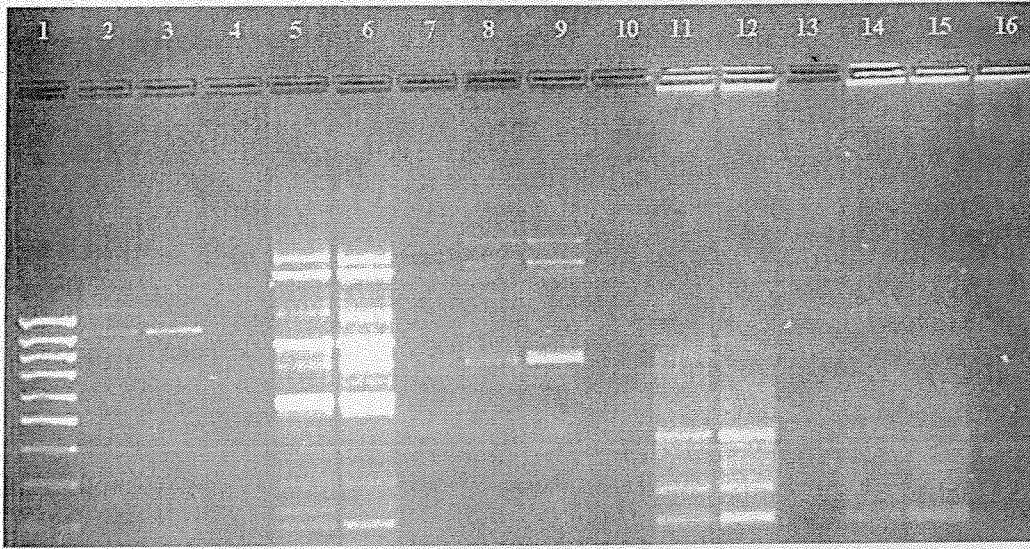
Proteinleri isoelektrik noktalarına göre ayırmak için IPG pH 3-10 (17 cm) veya IPG pH 4-7 (17 cm) striplerin üzerine protein örneği ile rehydration bufer eklendikten sonra proteinlerin uçmasını engellemek için mineral yağ ile stripin üzeri kapatıldı. 12 saat aktif rehydration yapıldıktan sonra istenilen voltaj basamakları uygulanarak proteinlerin üzerindeki yükün sıfır olduğu noktaya kadar ilerlemeleri sağlandı.

IPG strip üzerine proteinler yüklendikten sonra 10' ar dakika dengeleme çözeltisi I ve II ye tabii tutuldu. Dengeleme çözeltisi üre, SDS, gliserol, Tris pH 8.8 ve DTT içermektedir. İkinci basamak ise proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılmasıdır. SDS jel için 12% akrilamid jel kullanılarak proteinler ayrılması sağlandı. Kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir: (Acrylamide and N,N-methylenebisacrylamide, Sodium doğecyl sulfate (SDS), Tris buffers, TEMED, Ammonium persulfate, Tris-glycine electrophoresis buffer).

Son olarak jeller Coomassie Colloidal Blue (CBB G-250) kullanılarak 12 saat boyunca boyanmaya bırakılmıştır. Daha sonra jelin üzerindeki fazla boya %5 lik asetik asit çözeltisinde bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Farklı ekspres olan spotlar kesilerek MALDI-TOF analizi için yurt dışına gönderildi.

4.0. Bulgular

Farklılık Gösterim tekniğinde 2 saat bor uygulanmış yaprak örneklerinde kullanılan pirimer çiftleri aşağıdaki gibidir: P1T1, P1T9, P2T2, P2T6, P3T2, P3T3, P3T7, P4T3, P4T4, P5T1, P5T5, P5T6, P6T3, P6T5, P6T6, P7T6, P7T7, P8T2, P8T4, P8T7, P8T8, P9T5, P9T9, P10T1, P10T9. 24 saat bor uygulanmış yaprak örneklerinde kullanılan pirimer çiftleri de aşağıdaki gibidir: P1T3, P1T5, P1T7, P2T1, P2T9, P3T4, P3T5, P3T8, P4T2, P4T6, P4T9, P5T3, P6T7, P7T1, P7T2, P7T5, P7T8, P9T5, P10T4, P10T9. Bu pirimer çiftlerinden, 2 saat bor uygulanmış yaprak örneklerinde kullanılan P4T4, P3T3, P2T2, P6T6, P8T8, P3T7, P6T5, P8T7, P4T3 ve 24 saat bor, uygulanmış yaprak örneklerinde kullanılan P2T9, P3T8, P7T2, P7T5 pirimer çiftleri farklı eksprese olan bantlar gösterdi. Şekil 3 de örnek bir jel resmi ve 2 ile 3 sırada ise farklı ekspres olan bir bant gösterilmektedir. Sonuç olarak 24 saat bor uygulanmış yaprak örneklerinde ekspresyonu artan 4, ekspresyonu azalan 2, 2 saat bor uygulanmış yaprak örneklerinde ekspresyonu artan 2, ekspresyonu azalan 3 cDNA elde edilmiştir.



Şekil 3. Farklılık Gösterim PZR'ın Agaroz Jel Fotoğrafi ; 1: Markır 1000bp, 2: ABL2 P2T2, 3: HBL2 P2T2, 4: RNA P2T2, 5: ABL2 P6T6, 6: HBL2 P6T6, 7: RNA P6T6, 8: ABL2 P7T7, 9: HBL2 P7T7, 10: RNA P7T7, 11: ABL2 P8T8, 12: HBL2 P8T8, 13: RNA P8T8, 14: ABL2 P8T4, 15: HBL2 P8T4, 16: RNA P8T4

Gen bankası Analizi

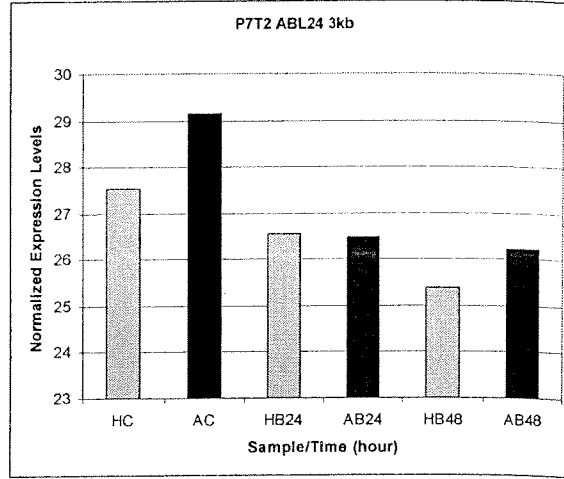
Sekansların gen bankasındaki analizlerine göre P7T5 HBL24 730 bp cDNA ve P7T2 HBL24 724 bp cDNA *Arabidopsis thaliana*'daki bir translasyon başlangıç faktörü olan TIF3B1'e homoloji göstermektedir. P7T5 HBL24 574 bp cDNA *Triticum aestivum*'daki bir klorofil a/b bağlayıcı proteini WCAB öncüsüne homoloji göstermektedir. P7T2 ABL24 3 kb cDNA *Oryza sativa*'daki bir uzama faktörüne homoloji göstermektedir. P2T9 ABL24 747 bp cDNA *Arabidopsis thaliana*'daki bir kısıncir dehidrogenaz/redüktaz (SDR) ailesi proteinine homoloji göstermektedir. P3T8 HBL24 440 bp cDNA *Triticum aestivum*'daki tioredoksin H izoformuna homoloji göstermektedir. P3T3 HBL2 408 bp cDNA *Triticum aestivum*'daki bir shaggy benzeri kinaz proteinine homoloji göstermektedir. P3T3 HBL2 466 bp cDNA, P4T4 HBL2 385 bp cDNA ve P4T4 ABL2 649 bp cDNA *Hordeum vulgare*'deki kloroplast genomuna homoloji göstermektedir. P3T3 ABL2 524 bp cDNA *Arabidopsis thaliana*'daki bir hypothetical proteine homoloji göstermektedir.

Farklı Eksprese Olan Genlerin Real Time PZR'ı

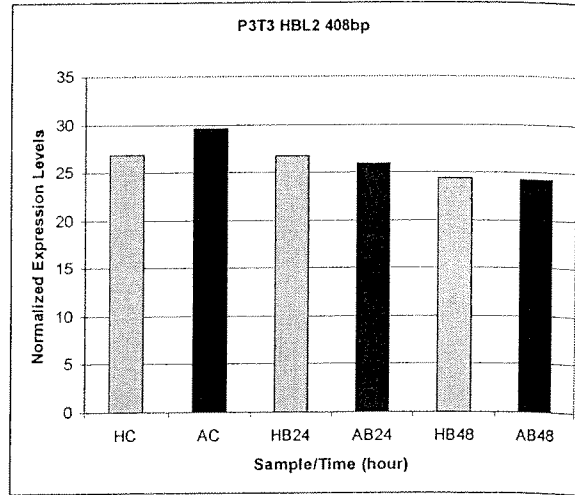
Farklı eksprese olan genlerin Real Time PZR'ının kantitatif sonuçları ve ekspresyon seviyesi grafikleri aşağıda verilmiştir. Sonuçlar, internal bir control olan GAPDH ile normalize edilmiş olup 3 farklı örnek kullanılmıştır.

P7T2 ABL24 3kb'nin RT-PZR sonuçları farklılık gösterim tekniğinin sonuçları ile benzerlik gösterir (Şekil 4). Farklılık gösterim PZR'ında bu gen Anadolu çeşidinde Hamidiye çeşidinde olduğundan daha fazla ekspresyon gösterir. Kontrol grubunda, kinaz benzeri protein kodlayan P3T3

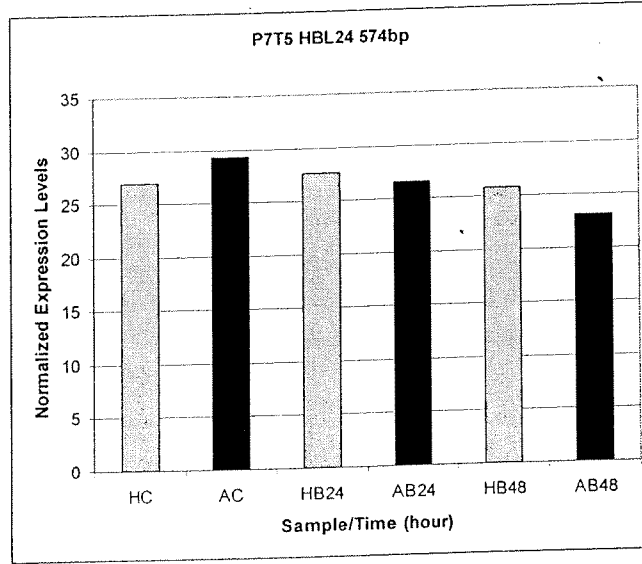
HBL2 408bp sekansının ekspresyonu Anadolu çeşidinde daha yüksektir. Ancak bor uygulamasından sonra ekspresyon seviyesi her iki arpa çeşidinde de birbirine yakın seviyededir (Şekil 5). Klorofil a/b bağlayıcı protein kodlayan P7T5 HBL24 574bp (Şekil6) geni P3T3 HBL2 408bp geni ile benzer bir ekspresyon gösterir. Bu genin ekspresyonu Anadolu control grubunda Hamidiye control grubunda olduğundan daha yüksektir. Ancak bor uygulamasından sonra Hamidiye çeşidindeki ekspresyon seviyesi Anadolu çeşidindekinden daha yüksek olmuştur.



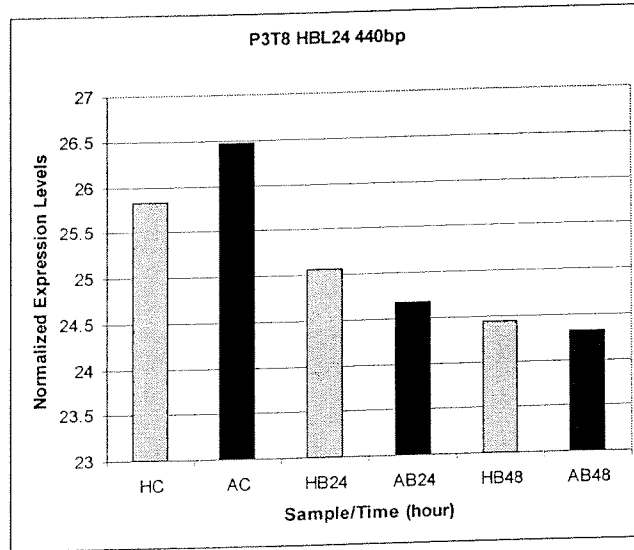
Şekil 4. P7T2 ABL24 3kb (uzama faktörü) Geninin Arpa Çeşitlerindeki Ekspresyon Seviyesi



Şekil 5. P3T3 HBL2 408bp (kinaz benzeri protein) Geninin Arpa Çeşitlerindeki



Şekil 6. P7T5 HBL24 574bp (klorofil a/b bağlayıcı protein) Geninin Arpa Çeşitlerindeki Ekspresyon Seviyesi



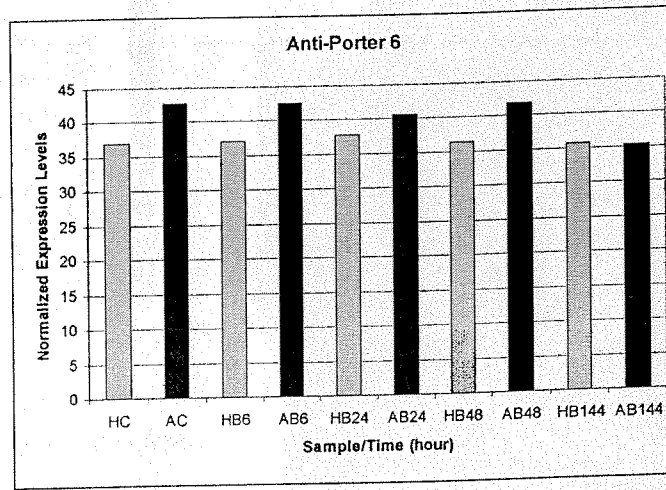
Şekil 7. P3T8 HBL24 440bp (tioredoksin H izoform) geninin Arpa Çeşitlerindeki Ekspresyon Seviyesi

Anti-Porter Genlerin RT-PZR'ı

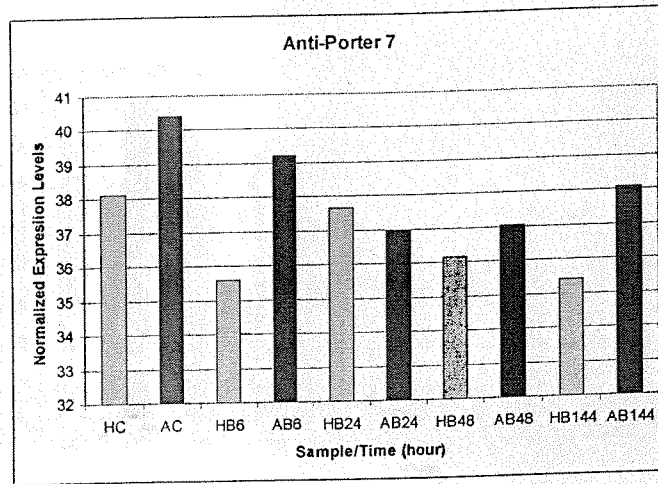
Bor toleransı fazla miktardaki borun hücreden dışarı atılması yada vakuollere pompalanması ile ilgili olabilir. Dışarı pompalayan (efflux) proteinler ve dışarı taşıyan (anti-porter) proteinler boru transfer etme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle bu çalışmada arpa genomundaki sekansı gen bankasında bulunan bu proteinler test edilmiştir.

Anti-porter genlerin RT-PZR'ının kantitatif sonuçları ve ekspresyon seviyelerinin grafikleri aşağıda verilmiştir. Sonuçlar, internal bir control olan GAPDH ile normalize edilmiş olup 3 farklı örnek kullanılmıştır.

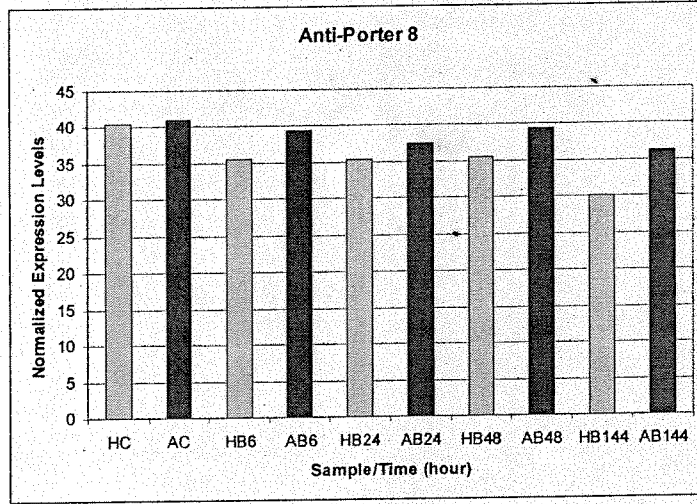
PDR-benzeri ABC transporter anti-porter geninin bor uygulanmış ve uygulanmamış Anadolu çeşitlerindeki ekspresyon seviyesi, 144. saatteki örnek hariç Hamidiye çeşitlerindeki seviyesinden yüksektir (Şekil 8). MRP-benzeri ABC transporter anti-porter geninin bor uygulanmış ve uygulanmamış Anadolu çeşitlerindeki ekspresyon seviyesi, 24. saatteki örnek hariç Hamidiye çeşitlerindeki seviyesinden yüksektir (Şekil 9). ABC transporter ailesi proteini anti-porter geninin ekspresyon seviyesi tüm Anadolu çeşitlerinde daha yüksektir (Şekil 10). Multi antimicrobial extrusion protein MatE ailesi proteini anti-porter geninin bor uygulanmış ve uygulanmamış Anadolu çeşitlerindeki ekspresyon seviyesi, 48. saatteki örnek hariç Hamidiye çeşitlerindeki seviyesinden yüksektir (Şekil 11). MATE efflux ailesi proteini olan iki anti-porter geninin de bor uygulanmış ve uygulanmamış Anadolu çeşitlerindeki ekspresyon seviyesi tüm Hamidiye çeşidi örneklerinden daha yüksektir (Şekil 12 ve Şekil 13). Anti-porter genlerinin ekspresyon seviyelerinin Anadolu çeşidinde yüksek olması direk olarak bor ile ilişkili değildir çünkü bu genlerin ekspresyon seviyeleri Anadolu kontrol grubunda da Hamidiye kontrol grubuna kıyasla daha yüksektir.



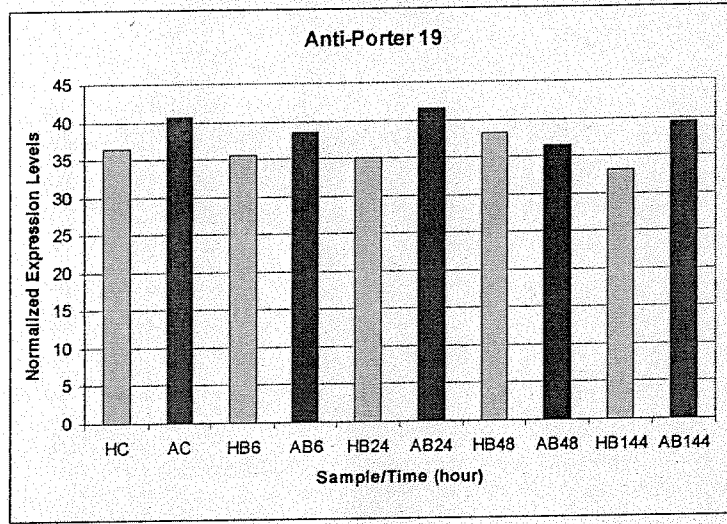
Şekil 8. PDR-benzeri ABC transporter anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi



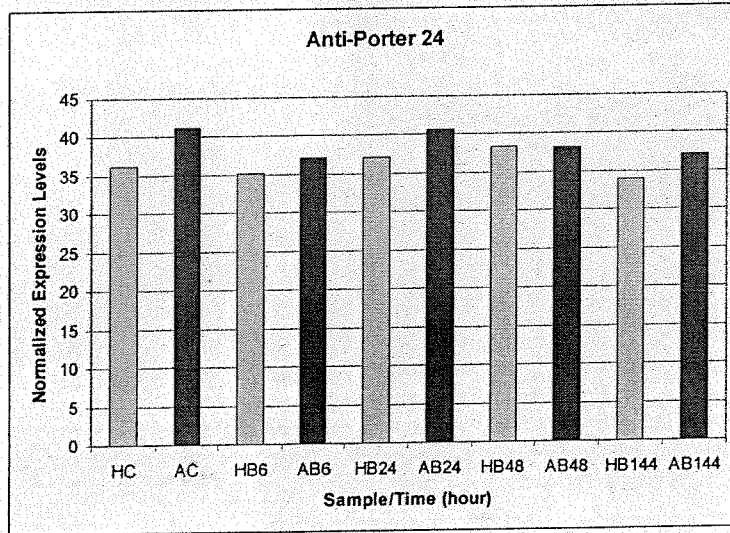
Şekil 9. MRP-benzeri ABC transporter anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi



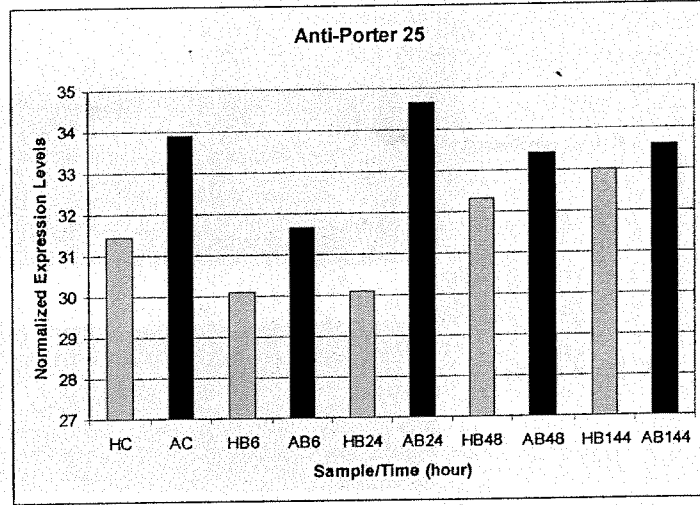
Şekil 10. ABC transporter ailesi proteini anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi



Şekil 11. Multi antimicrobial extrusion protein MatE aile proteini anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi



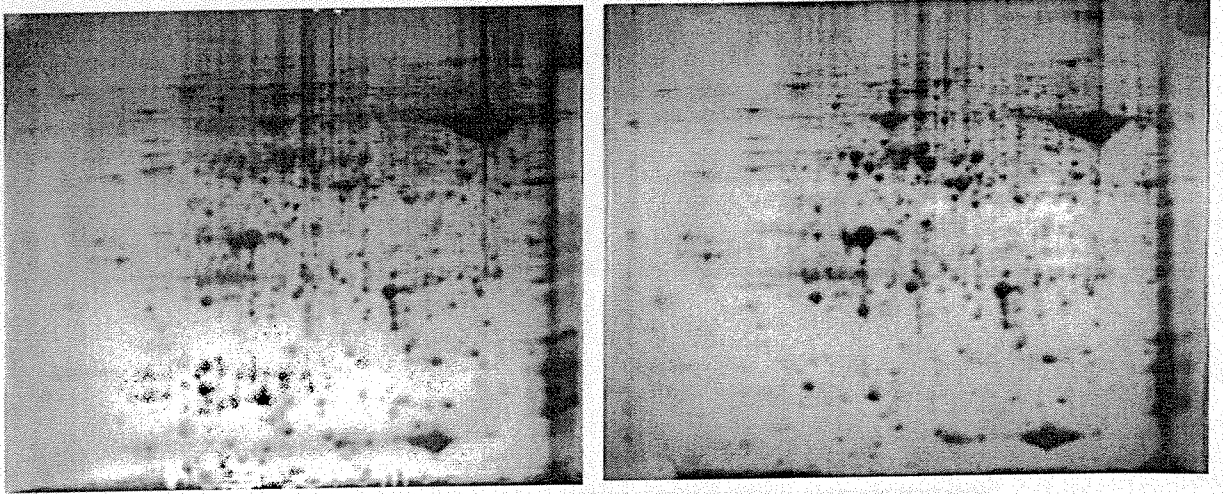
Şekil 12. MATE efflux family proteini anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi



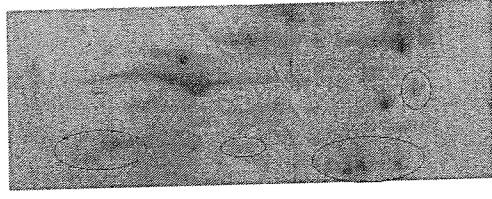
Şekil 13. MATE efflux family proteini anti-porter Geninin Arpa Türlerindeki Ekspresyon Seviyesi

2D PAGE Analizleri

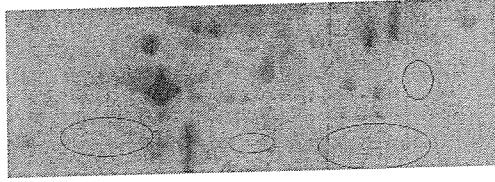
Genetik analizlerin yanında protein seviyesindeki farklılıkları görmek için Anadolu ve Hamidiye çeşitleri arasında 2DPAGE analizleri yapıp farklı seviyede ekspres olan spotlar jelden kesilerek MALDI-TOF ile sekansları çıkarılmıştır (Şekil 14,15,16).



Şekil 14. 2D PAGE jel analiz resimleri: Bor uygulanmış Anadolu (sol resim) ve kontrol Anadolu (sağ resim).

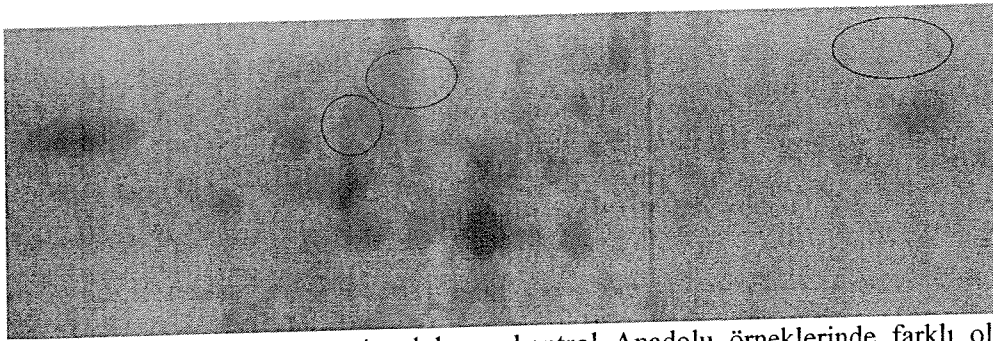
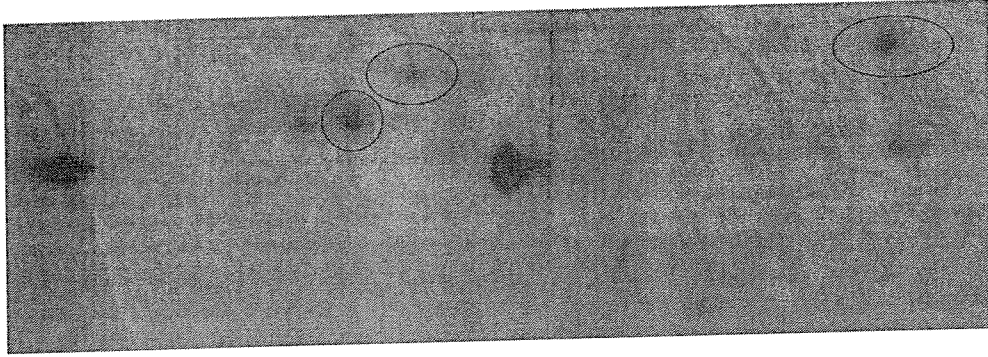


Anadolu Bor 3



Anadolu Kont. 3

Şekil 15. Bor uygulanmış Anadolu ve kontrol Anadolu örneklerinde farklı olarak ekspres olan proteinler.



Şekil 16. Bor uygulanmış Anadolu ve kontrol Anadolu örneklerinde farklı olarak ekspres olan proteinler

2D PAGE analizi sonucu 9 proteinin Anadolu çeşidinde bor uygulandıktan sonra daha yüksek seviyede ekspres olduğu görülmüştür. Bu proteinler aşağıda listelenmiştir.

1-Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain [Triticum aestivum]
1 MSPQTETKAG VGFKAGVKDY KLTYYTPEYE TKDTDILAAF RVSPQPGVPP
51 EEAGAAVAEE SSTGTWTTVW TDGLTSLDRY KGRCYHIEPV AGEDSOWICY
101 VAYPLDLFEE GSVTNMFTSI VGNVFGFKAL RALRLEDLRI PPTYSKTFQG
151 PPHGIQVERD KLNKYGRPLL GCTIKPKLGL SAKNYGRACY ECLRGGDLFT
201 KDDENVNSQP FMRWRDRFVF CAEAIYKSA ETGEIKGHYL NATAGTCEEM

2 - Thaumatin-like protein TLP5

1 MAFSGVVHLI ALVIAVAAAA TDATTITVVN RCSYTIWPGA LPGGGARLDP
51 GQSWQLNMPA GTAGARVWPR TGCTFDRSGR GRCITGDCAG ALVCRVSGEQ
101 PATLAEYTLG QGGNRDFFDL SVIDGFNVP SFQPVGGAPC RAATCAVDIT
151 HECLPELQVP GGCASACGKF GGDTYCCRGQ FEHNCPTYY

3 -basic pathogenesis-related protein PR5 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]

1 MASSRVVYLL AGLLLAALAA TTDAATITVV NRCSYTVWPG ALPGGGVRLD
51 PGQSWALNMP AGTAGARVWP RTGCTFDGSG RRCITGDCN GVLACRVSGQ
101 QPTTLAEYTL GQGANCKDFD LSVIDGFNVP MSFEPVGGCR AARCATDITK
151 DCLKELQVPG GCATCGKFGG DTYCCRGQFE HNCPTNYSM FFKGKCPDAY
201 SYAKDDQTST FTCPAGTNYQ IVLPLDQYQS ITWVNKE

4-S-like RNase [Triticum aestivum]

1 MAQRTISLCL ILGLLAAAAP ANATSFDFY LVLMPGAYC VDSEYGCCVP
51 KYGYPAEDFF VQSFTTFDLS LNKAIVRCNS DKPFDINKLE PIENNLNHYW
101 SNIHCPRTDG TSTWKSEWRS YGVCSGLKEV DYFRAGLNLR KNADVLGALA
151 EQGINPDYRL YSTEHIKWAV NQKLGVMGPV QCRDGPFGKK QLYQIYLCVD
201 KNGETIIDCP KLPKLHCPEE VLFHPFHTWM LNATSPAKIM LPTEA

5-RNase S-like protein [Hordeum vulgare]

1 MAMRAISLCL ILGLLAAAAP ASATSFDFY LILMPGAYC ADSYGCCVP
51 KYGYPAEDFF VEGFMTFDLS LNKAIVRCNS DKPFDVNKLE PIENNLNHYW
101 SNIHCPRNDG TGTWKSEWRS YGVCSGLKLV DYFRAALNLR KKADVLGALA
151 EQGINPDYRL YNTEHIKWAV NQKLGVMGPV QCRDGPFGKK QLYQIYLCVD
201 KDGQIFIDCP KLPKLHCPEE VLFHPFHTWM LNATSPAKIT LPTEA

6 -GTP-binding nuclear protein Ran1

1 MALPNQQTVD YPSFKLVIVG DGGTGKTFV KRHLTGEFEK KYEPTIGVEV
51 HPLDFFTNGC KIRFYCWDTA GQKFGGLRD GYYIHGQCAI IMFVDTARLT
101 YKNVPTWHRD LCRVCENIPI VLCGNKVDVK NRQVKAKQVT FHRKKNLQYY
151 EISAKSNYNF EKPFLYLARK LAGDGNLHFV ESPALAPPEV HIDLAAQALH
201 EEELQQAANQ PLPDDDDEAF E

7- Vacuolar ATP synthase subunit E (V-ATPase subunit E) (Vacuolar proton pump subunit E)

1 MNDTDVSRQI QQMVRFIRQE AEEKAGEISV SAEDEFNIEK LQLVEAEKKK
51 IRQEYERKEK QVDVRKKIEY SMQLNASRIK VLQAQDDLNVN KMKEDAMKEL
101 LNISSNHHEY RNLLKELVVQ GLLRLKEPAV LLRCRKEDHH NVESVLHSAK
151 NEYASKADVH EPEILVDHSV YLPPSPSHDD KHGQICHGGV VLASRDGKIV
201 FENTVDARLE VVFRKKLPEI RKLLVAA

8-PSI type III chlorophyll a/b-binding protein

1 MAAQALVSSS LTSSVQATARQ IFGSKPVASA SQKKSSFVVK AAAAPPVKQG
51 ANRPLWVASS QLSYLDGSL PGDYGFDP LG LSDPEGTGGF IEPRWLAYGE
101 IINGRFAMLG AAGAIPEIL GKAGLIPAET ALPWFQTGVI PPAGTYTYWA
151 DNYTLFVLEM ALMGFAEHRR LQDWYNPGSM GKQYFLGLEK GLAGSGNPAY
201 PGGPFFNPLG FGKDEKSLKE LKLKEVKNR LAMLAILGYF IQGLVTGVGP
251 YQNLLDHLAD PVNNNVLTSL KFH

9-light-harvesting complex I; LHC I [Hordeum vulgare]

1 PGRSGLPFCA YATTSGRVTM SAEWFPGQPR PAHLAGSSPR GLRVRPLGLA
51 TVPENFERFK ESEIYHCRWA MLCVPGVLP EALGLGNWVK AQEWAALPDG
101 QATYLGPNVP WGNLPTILAI EFLAIAFAEQ QRTMEKDPEK KKYPGGAFDP
151 LGFSKDKPAKF EELKLKEIKN GRLAMLAFVG FCVQQSAYPG TGPLENLATH
201 LADPWHNNIG DIVIPRNIYG P

5.0. Tartışma ve Sonuç

Farklılığın gösterim tekniği sonuçlarına bakıldığında, bor toksisitesinin fotosentezi etkileyerek kloroplast genomundaki genlerin aktivasyonuna neden olduğu görülmektedir. Anadolu çeşidindeki olası bor tolerans mekanizmalarından biri kloroplast genomunun gen ekspresyon düzeyinin değiştirilmesi olabilir.

HBL24 örneklerinde, ökaryotik translasyon başlatıcı faktörü TIF3B1 benzeri cDNA'nın farklı ekspresyonu, Hamidiye çeşidinin mRNA'ların translasyonunu gerçekleştirmeye çalıştığını gösterir çünkü TIF3B1 mRNA'ların ribozom-yönetimli translasyonlarında fonksiyonaldır. Boron toksisitesinin RNA metabolizması üzerindeki etkileri de bu görüşü destekler. ABL24 örneklerindeki kısa-zincir dehidrogenaz/reduktaz (SDR) ailesi proteini ve oksidoreduktaz protein benzeri cDNA'ların yüksek orandaki ekspresyonu bitkilerdeki membran aktivitesi ve bor arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır. Dehidrogenaz/reduktaz (SDR) ailesi proteinleri, oksidasyon-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen proteinlerdir. Hamidiye'deki olası bor hassasiyeti nedenlerinden biri de bazı redoks reaksiyonlarının inhibisyonu olabilir. HBL24 örneklerindeki tioredoksin H izoform benzeri cDNA'ların farklı ekspresyonu, bordan kaynaklanan oksidatif strese karşı tioredoksin H izoformunun hücre koruma rolünü göstermektedir. HBL2'deki shaggy-like kinaz protein benzeri cDNA'ların ekspresyonu, Hamidiye çeşidinin bor yüzünden sekteye uğrayan hücre uzamasını onarmaya çalıştığını göstermektedir. Shaggy-like kinaz proteininin özellikle çiçek gelişiminde hücre uzamasında, tuz ve yaralanma stresinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir Jonak ve ark (2002).

Genel olarak Farklılığın Gösterim tekniği sonuçlarına bakıldığında, bu teknikle fotosentezi ve stres proteinlerini etkileyen genleri ortaya çıkardığı görülmektedir. Ancak bulunan bu genlerin direk olarak Anadolu çeşidindeki bora dayanıklılığı açıklayan mekanizma olduğunu söyleyemeyiz. Jefferies SP ve ark. (2000) haritalama ve fizyoloji sonuçlarına göre boru dışarıya atan bir antiporter geninin arpada bor toleransı sağladığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise borun hücre dışına pompalanmasına yardımcı olacak bir gene rastlanmamıştır.

Arabidopsis bitkisinde bulunan BOR1 geninin ekspresyonunda 2 çeşit arasında test edilmiş ancak herhangi bir gen ekspresyonu farklılığı görülmemiştir.

Gen bankasında arpa genomu içinde varolan, antiporter genlerinin ekspresyonlarına bakıldığında iki çeşit arasında bazı farklılıklar görülmüş olsa bile bu farklılık borun yeterince bu test edilen antiporter proteinler tarafından atıldığını kanıtlayacak seviyede değildir.

Yapılan son çalışmalarda, toksik seviyedeki minerallerin, metallerin hücre dışına atılmasındaki mekanizmalarda rol oynayan genlerin ekspresyonlarında değişme olmadığını protein seviyesindeki post translasyonel değişmelerle hücrenin kendini toksik maddelere karşı koruduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle bu çalışmada proteomik yaklaşımla 2D-PAGE analizinde yapılmıştır. Buradan çıkan sonuçlarda da farklılığın gösterimi tekniği ile benzer olarak fotosentezle ilgili olan proteinler ve RNA mekanizması ile ilgili proteinlerin seviyesinde artma bulunmuştur. RNA mekanizmasının bor ile ilişkisi diğer çalışmalarda da (Nozawa ve ark, 2006) saptanmış olup bizim çalışmada bunu destekler niteliktedir.

Çalışmada kullanılan teknikler ile istenen bor toleransına dayanıklılıkta direk olarak rol oynayan genlere rastlanılmamıştır. Çalışmada ekonomik sebeplerden dolayı çok fazla sayıda ve değişik zamanlarda örnekleme alınarak genlerin tarama işlemlerinin hepsi yapılamamıştır. Kullanılan teknikler ile genomun ancak yüzde 25 taranmıştır. Arpanın genom sekansı henüz bitirilmediği için bitkiye ait bir mikroarray çip sistemi henüz tam olarak geliştirilemediğinden dolayı dezavantajı fazla olan farklılığın gösterimi, RT-PCR gibi varolan teknikler kullanılmıştır ancak arzu edilen genler bulunamamıştır. Çalışma diğer kaynakların katkısı ile devam ettirecektir. Gelecek zaman içinde bora dayanıklı bitki çeşitlerinden cDNA kütüphanesi hazırlanmaktadır. Bu kütüphane maya içinde ekspres edilip bora dayanıklı koloniler seçilerek varolan cDNA seçilecektir. Mayada ekspres yöntemi laboratuvarımızda denenmiş olup maya genomu içinde bor toleransına dayanıklı 8 koloni halihazırda belirlenmiştir. Aynı yöntem bitkiler içinde uygulamaya devam edilecektir.

Yararlanılan Kaynaklar:

- AVCI M, T. Akar, N. Zencirci, H.Tosun, M.Klaycı. Breeding for boron tolerance and its impact on yield components of barley varieties. J. Field Crops Central Res. Inst. 7:1-15. 1998
- BROWN P.H. 2002. Boron in plant biology. Plant Biol. 4: 205-223.
- DANNEL F, Römheld H.2002. Update of boron on higher plants. Plant Biol. 4: 193204.
- DELL B, J Huang. 1997. Physiological response of plants to low boron. Plant soil 193:103-120.
- GUPTA UC. 1993. Boron and its role in Crop Production. CRC Press, Boca Raton FL.
- JEFFERIES SP, A. R. Barr , A. Karakousis, J. M. Kretschmer , S. Manning, K. J. Chalmers J. C. Nelson , A. K. M. R. Islam, P. Langridge. Mapping of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Apply Genet. 98: 1293-1303.1999.
- JEFFERIES SP, M.A. Pallotta, J.G. Paull A. Karakousis, J.M. Kretschmer, S. Manning A.K.M.R Islam, P. Langridge, K.J. Chalmers. Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). Theor Apply Genet. 101: 767-777.2000.
- JONAK C, Hirt H. Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions. Trends Plant Sci. Oct;7(10):457-61.2002
- KARABAL E, Yücel M, AV Öktem. 2003. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. Plant Sci. 164:925-933.
- NABLE R. O., 1998. Effects of Boron Toxicity Amongst Several Barley Wheat Cultivars: A Preliminary Examination of the Resistance Mechanism”, Plant and Soil. Vol.112, pp.45-52.
- NABLE RO, Paull JG. 1991. Mechanism and genetics of tolerance to boron toxicity in plants. InDD randall, DG Blevins, CD Miles, eds, Current topics in Plant Biochemistry and Physiology, Vol 10.University of Missouri Press, Columbia, pp 257-273.
- NOZAWA, A., Miwa, K., Kobayashi, M., Fujiwara, T. “Isolation of *Arabidopsis thaliana* cDNAs That Confer Yeast Boric Acid Tolerance”, Bioscience Biotechnology Biochemistry. Vol.70, No.7, pp.1724-1730 (2006).
- TAKANA, J., Miwa, K., Yuan, L., Wiren, N., Fujiwara, T., 2005. “Endocytosis and Degradation of BOR1, a Boron Transporter of *Arabidopsis thaliana*, Regulated by Boron Availability”, PNAS. Vol.102, No.34, pp.12276-12281.
- YAU SK. 2002. Interactions of boron toxicity, drought and genotypes on barley root growth, yield and otther agronomic characters. Aus. J. Agric.Res. 53:347-354.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: TBAG-2354 (103T174)
Proje Başlığı: ARPADA (<i>Hordeum vulgare</i> L.) BOR TOKSİSİTESİNE TOLERANS GÖSTEREN GENLERİN mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY ve RT-PCR YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ VE KARAKTERİZASYONU
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: H.Çağlar KARAKAYA Ersin AKINCI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gülbahçe kampüsü, Urla, İZMİR
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Nisan 2004- Nisan 2007
Öz (en çok 70 kelime) Bor, bitkilerin gelişmesinde rol oynayan bir mikroelementtir. Ancak fazla miktardaki bor bitkiler için toksiktir. Bu çalışmada da borun bitkiler üzerindeki etkilerini öğrenmek amacıyla bor toksisitesine tolerans gösteren arpa bitkisindeki genetik mekanizma anlaşılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, Farklılığın Gösterimi, RT-PCR, 2D-PAGE moleküler teknikleri kullanılarak, bor toksisitesine dayanıklı ve dayanıksız arpa çeşitleri arasında kıyaslama yaparak dayanıklılıkta rol oynayan genlerin bulunmasına çalışılmıştır.
Anahtar Kelimeler: Arpa, bor, differential display (farklılığın gösterimi), RT-PCR, 2D-PAGE
Projeden Yapılan Yayınlar: 1-Poster: ARPADA (<i>Hordeum vulgare</i> L.) BOR TOKSİSİTESİNE TOLERANS GÖSTEREN PROTEİNLERİN 2D-JEL VE KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNLERİ <i>Ahmet Emin ATİK, Pınar Baydara, Ece Yapaşan, Çağlar KARAKAYA, Bekir SALİH, Talat YALÇIN.</i> XX.Ulusal Kimya Kongresinde (4-8 Eylül 2006 Kayseri) poster