

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AtNHX1* VE *SOS-1* GENLERİNİN EŞ ZAMANLI İFADESİ İLE *ARABIDOPSIS
THALIANA*'DA TUZ STRESİ TOLERANSININ ARTTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Yüksek Biyolog Necla PEHLİVAN

**AĞUSTOS 2015
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AtNHX1 VE SOS-1 GENLERİNİN EŞ ZAMANLI İFADESİ İLE ARABIDOPSIS
THALIANA'DA TUZ STRESİ TOLERANSININ ARTTIRILMASI***

Necla PEHLİVAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
DOKTOR (BİYOLOJİ)

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03 / 08 / 2015

Tezin Savunma Tarihi : 28 / 08 / 2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Trabzon 2015

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Necla PEHLİVAN Tarafından Hazırlanan**

**ATNHX1 VE SOS-1 GENLERİNİN EŞ ZAMANLI İFADESİ İLE ARABIDOPSIS
THALIANA'DA TUZ STRESİ TOLERANSININ ARTTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 11 /08/2015 gün ve 1615 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

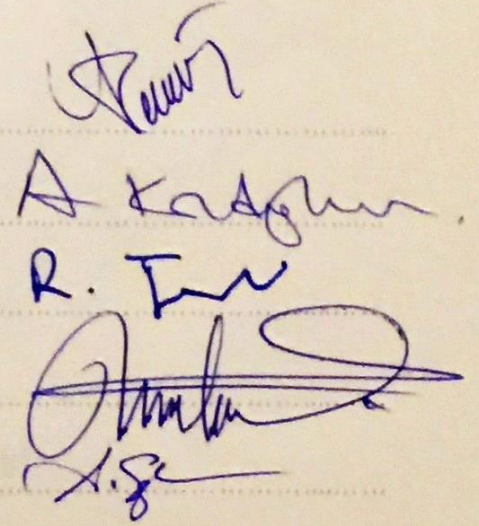
Başkan : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

Üye : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Üye : Doç. Dr. Rabiye TERZİ

Üye : Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Üye : Doç. Dr. Aykut SAĞLAM



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin eş zamanlı ifadesi ile *Arabidopsis thaliana*’da tuz stresi toleransının arttırılması” amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü eğitimim süresince çokça emeği geçen danışman Hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU başta olmak üzere K.T.Ü bitki fizyolojisi grubuna teşekkür ederim. Doç Dr. Neslihan Saruhan GÜLER, Doç Dr. Bahadır Özgür GÜLER ve Yrd. Doç Dr. Tuba ACET’e ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Texas Tech Üniversitesi Bitki Biyolojisi grubu üyeleri Li SUN, Philip JARRETT, Neelam MISHRA, Dr.Saranya GANAPATHY, Xunlu ZHU, Maheshika HERATH, Dr. Rongbin HU, Dr.Yinfeng ZHU, Weijia JIANG ve Dr. Xiaojie YANG’a iki yıl boyunca oluşturdukları aile havası ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim. Li SUN’a deneysel tasarımlar ve problem çözümündeki yol göstericiliğinden ötürü ayrıca teşekkür ederim. İyon (Na^+ ve K^+) ölçümlerinde yardımcı olan Dr. Guoxin SHEN’e teşekkür ederim.

Haftalık sunumlar esnasında tezin geliştirilmesine katkı sağlayan eleştirileri, pozitif bakış açısı ve maddi manevi desteği ile her zaman örnek alacağım Prof. Hong ZHANG’a teşekkürlerimi sunarım. Kendisine, bir yıl boyunca yardımcı araştırmacı olarak laboratuvarında çalışmamı sağlaması dolayısıyla ayrıca teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince 2211 kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK’a ve yurt dışı araştırma olanağı sunduğu için Yüksek Öğretim Kurumu’na teşekkürü bir borç bilirim.

Necla PEHLİVAN
Ağustos 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*AtNHX1* ve *SOS-1* Genlerinin Eş Zamanlı İfadesi ile *Arabidopsis thaliana*’da Tuz Stresi Toleransının Arttırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Asım Kadioğlu’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarıda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 28/08/2015

Necla PEHLİVAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Tuz Stresi ve İyon Toksisitesi	2
1.3. Tuz Stresinin Bitkilerin Fizyolojisi Üzerine Etkileri.....	3
1.3.1. Organ Düzeyinde Etkileri	4
1.3.2. Organel Düzeyinde Etkileri	4
1.3.3. Hüresel Düzeyde Etkileri	4
1.3.3.1. Hücre Zarı, Hücre Çeperi ve Lipidler Üzerine Etkisi.....	4
1.3.3.2. İyon İçeriği ve Su İlişkileri Üzerine Etkisi	5
1.3.3.3. Fotosentez, Fotosentetik Pigmentler ve Proteinler Üzerine Etkisi	6
1.3.3.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Sentezi ve Antioksidanlar Üzerine Etkisi.....	6
1.4. Bitkilerde Tuz Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar	6
1.4.1. Büyümenin Kontrolü	6
1.4.2. İyon Dengesinin Sağlanması	7
1.4.2.1. Vakuolar Na ⁺ Kompartmantalizasyonu	7
1.4.2.2. Plazma Mebranı Boyunca Na ⁺ Taşınımı ve K ⁺ Dengesi	7
1.4.3. Efektör Moleküllerin ve Bitkisel Hormonların Uyarılması.....	8
1.4.4. Osmolitlerin Sentezi	9
1.4.5. Tuza Tolerans Sağlayan Aday Genler	9
1.5. Bitki Stres Toleransında Islah Stratejileri.....	10
1.6. Termotolerans ve Tuz Stresi İlişkisi	11
1.7. Na ⁺ /H ⁺ Taşıyıcılarının Karakteristikleri	12
1.8. <i>NHX1</i> Geninin Bitkilerdeki Biyolojik Rollerini	12
1.9. <i>SOS-1</i> Geninin Bitkilerdeki Biyolojik Rollerini	13
1.10. Stres Çalışmalarında <i>Arabidopsis thaliana</i> 'nın Önemi	14

1.11.	Çalışmanın Amacı	15
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1.	Materyaller.....	18
2.1.1.	Kullanılan Bitki Tohum Besiyeri ve Büyüme Ortamları.....	18
2.1.2.	Bakteriyel Suşlar ve Plazmidler.....	18
2.1.3.	Bakteriyel Büyüme İçin Hazırlanan Standart Koşullar	18
2.1.4.	Kimyasallar Antibiyotikler Enzimler ve Diğer Malzemeler	19
2.2.	Metodlar.....	19
2.2.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>NHX1</i> (<i>AtNHX1</i>) Geninin Klonlanması	19
2.2.1.1.	Bitkilerin Büyütülmesi	19
2.2.1.2.	Toplam RNA İzolasyonu	20
2.2.1.3.	cDNA Sentezi	21
2.2.1.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	22
2.2.1.5.	Agaroz Jel Elektroforezi	22
2.2.1.6.	DNA Fragmentlerinin Saflaştırılması.....	23
2.2.1.7.	Hedef DNA'nın Modifikasyonu	23
2.2.1.8.	Klonlama Vektörünün Hazırlanması	24
2.2.1.9.	Ligasyon Reaksiyonu.....	27
2.2.1.10.	Kimyasal <i>E.coli</i> Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı ve Transformasyon	28
2.2.1.10.1.	Koloni PCR.....	28
2.2.1.10.2.	Mini Ölçekli Plazmid DNA İzolasyonu	28
2.2.2.	<i>SOS-1</i> Geninin Klonlanması.....	29
2.2.2.1.	Vektör Modifikasyonu.....	29
2.2.2.2.	<i>SOS-1</i> Geninin Modifikasyonu.....	33
2.2.3.	<i>AtNHX1</i> + <i>SOS-1</i> Gen Kasetinin Aynı Vektöre Yerleştirilmesi	37
2.2.4.	Transformasyon Çalışmaları.....	40
2.2.4.1.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Kompetent Hücre Hazırlanışı.....	40
2.2.4.2.	Vektör DNA'nın <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e Transformasyonu	40
2.2.4.3.	Transformasyonda Kullanılan <i>Arabidopsis</i> Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	41
2.2.4.4.	<i>Arabidopsis</i> Transformasyonu.....	41
2.2.5.	Segregasyon Analizi	42
2.2.6.	<i>AtNHX1</i> ve <i>SOS-1</i> Genlerinin Ekspresyon Analizleri	43
2.2.6.1.	Olası Transgeniklerden RNA İzolasyonu	43
2.2.6.2.	Northern Blot Analizi	43

2.2.6.2.1.	Örneklerin Normalizasyonu ve Denatürasyonu.....	43
2.2.6.2.2.	Formaldehid Jelin Membrana Transferi	44
2.2.6.2.3.	Prob Hazırlama, Hibridizasyon ve Gen İfadesinin Belirlenmesi.....	45
2.2.6.3.	Southern Blot Analizi	50
2.2.7.	Transgenik <i>Arabidopsis</i> Bitkilerinde Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler... 51	
2.2.7.1.	Yeşil Yaprak Sayısının Belirlenmesi	51
2.2.7.2.	Kök Büyüme Testi	51
2.2.7.3.	Osmotik Stres Testi.....	51
2.2.8.	Tuz Stresi Uygulaması ve Cevapları	52
2.2.8.1.	Yaş Ağırlık ve Gövde Uzunluklarının Tespiti.....	52
2.2.8.2.	Meyve Sayısı ve Tohum Miktarının Tespiti	52
2.2.8.3.	Klorofil Miktarının Belirlenmesi	53
2.2.8.4.	Antosiyanın Miktarının Belirlenmesi	53
2.2.8.5.	Malondialdehit (MDA) Miktarının Belirlenmesi	53
2.2.8.6.	Çimlenme Testi.....	53
2.2.8.7.	Na ⁺ ve K ⁺ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	54
2.2.8.8.	Tuz Stresi Şoku.....	54
2.2.8.9.	Eş Zamanlı Tuz ve Sıcaklık Stresi Uygulaması	54
2.2.9.	İstatistiksel Analizler	55
3.	BULGULAR.....	56
3.1.	<i>AtNHX1</i> Geninin Klonlanması	56
3.1.1.	Vektör Modifikasyonu.....	56
3.1.2.	Koloni PCR Analizi ve Plazmid İzolasyonu	57
3.2.	<i>SOS-1</i> Geninin Klonlanması.....	58
3.2.1.	Vektör Modifikasyonu.....	58
3.2.2.	Koloni PCR Analizi.....	59
3.2.3.	<i>GUS</i> (β-Glukuronidaz) Geninin Modifiye Vektörden Uzaklaştırılması	60
3.2.4.	<i>SOS-1</i> Geninin Ligasyona Hazırlanması	61
3.2.5.	Koloni PCR ile Vektör Modifikasyonunun Doğrulanması	62
3.3.	<i>SOS-1</i> ve <i>AtNHX1</i> Genlerinin Aynı Vektör Üzerine Yerleştirilmesi	63
3.4.	Transgenik <i>Arabidopsis</i> Bitkilerinin Moleküler Karakterizasyonu.....	66
3.4.1.	Transgenik Bitkilerin Oluşturulması ve Mendel Kalıtım Analizleri	66
3.4.2.	<i>AtNHX1</i> ve <i>SOS-1</i> Genlerinin İfade Analizleri	67
3.4.2.1.	Olası Transgenik <i>Arabidopsis</i> Bitkilerinden Toplam RNA İzolasyonu	67

3.4.2.2.	<i>Arabidopsis</i> Transgeniklerinde Aşırı İfadenin Northern Hibridizasyonu ile Analizi.....	67
3.4.2.3.	Southern Blot Hibridizasyon Analizi.....	69
3.5.	Transgenik <i>Arabidopsis</i> Bitkilerinin Bazı Fizyolojik Parametreler Yönünden İncelenmesi	70
3.5.1.	Tuz Stresinin Kök Büyümesi Üzerine Etkileri	70
3.5.2.	Tuz Stresinin Yeşil Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi	72
3.5.3.	Tuz Stresinin Fenotip ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi.....	73
3.5.4.	<i>AtNHX1+SOS-1</i> Transgeniklerinde Fenotipin NaCl Kaynaklı Olduğunun Doğrulanması.....	76
3.5.5.	<i>AtNHX1+SOS-1</i> Transgeniklerinin Eş Zamanlı Sıcaklık ve Tuz Stresine Cevabı.....	78
3.5.5.1.	Sıcaklık ve Tuz Stresinin Kök Büyümesi Üzerine Etkisi.....	78
3.5.5.2.	Sıcaklık ve Tuz Stresinin Fenotip ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi.....	79
3.5.6.	Tuz Stresinin Çimlenme Potansiyeline Etkisi	82
3.5.7.	Tuz Stresinin MDA Miktarı ile İlişkisi.....	84
3.5.8.	Tuz Stresinin Klorofil Miktarı ile İlişkisi	85
3.5.9.	Tuz Stresinin Antosiyanin İçeriği ile İlişkisi	85
3.5.10.	Tuz Stresinin Na ⁺ ve K ⁺ Konsantrasyonları ile İlişkisi	87
4.	TARTIŞMA.....	89
5.	SONUÇLAR.....	101
6.	ÖNERİLER.....	102
7.	KAYNAKLAR	104
8.	EKLER	111

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

AtNHX1 VE *SOS-1* GENLERİNİN EŞ ZAMANLI İFADESİ İLE *ARABIDOPSIS THALIANA*'DA TUZ STRESİ TOLERANSININ ARTTIRILMASI

Necla Pehlivan

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2015, 110 Sayfa, 10 Sayfa Ek

Topraktaki tuz yoğunluğu dünya genelinde tarımsal üretimi kısıtlayan temel faktörlerden biridir. İklimsel değişimler ve insan popülasyonundaki aşırı artış tuz stresi problemini daha önemli hale getirmektedir. Bitkilerde tuza tolerans sağlayacak yaklaşımlardan biri aşırı Na iyonlarını hücrenin vakuollerinde biriktirmek, bir diğeri ise; bu iyonları sitoplazmadan alıp plazma zarı üzerinden apoplastik alana göndermektir. *AtNHX1* ve *SOS-1* genleri ayrı ayrı ifade ettirildiğinde bu yaklaşımların 200 mM NaCl'ye kadar tolerans sağlayarak başarıya ulaştığı birçok bitkide gösterilmiştir. Mevcut çalışmada, her iki gen, tek bir vektör üzerinde organize edilip *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon ile *Arabidopsis thaliana*'ya aktarılarak, ilk kez eş zamanlı ifade ettirildi. Oluşan transgenik bitkiler, 250 mM NaCl varlığında 3 hafta büyütüldüklerinde, biyokütle, meyve (silikva), tohum verimi ve çimlenme oranında artış saptandı. Söz konusu bitkilerde NaCl stresi 300 mM'a çıkarıldığında ise; kontrol bitkilerine oranla klorofil yıkımının daha az oranda gerçekleştiği gözlemlendi. Ayrıca; 150 mM tuz stresinin, 28°C orta derecedeki sıcaklık stresi ile kombine edildiği durumda, bitkiler kök ve gövde uzunluğu bakımından kontrol gruplarına göre daha iyi bir gelişim performansı sergiledi. Bu çalışmada, tuz stresi koşullarında *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini ifade eden transgeniklerin, yabani tip bitkilere ve tek gen transgeniklerine nazaran iyileşmiş özellikler sergilemesi yüksek ihtimalle bu bitkilerde köklerden su ve K⁺ alınımının, fotosentetik performansın ve azot asimilasyon oranının artmış olması sebebiyledir.

Anahtar Kelimeler : *Arabidopsis*, Genetik mühendislik, Kombine stresler, Na⁺/H⁺ taşıyıcısı, Tuz stresi, Sıcaklık stresi

PhD. Thesis

SUMMARY

INCREASING SALT STRESS TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* BY
AtNHX1 AND *SOS-1* CO-OVEREXPRESSION

Necla Pehlivan

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Asım KADIOĞLU
2015, 110 Pages, 10 Pages Appendix

Soil salinity is one of the major factors that limits agricultural production worldwide which is becoming more important with climate changes and population explosion. One approach that provides salt tolerance to plants is, to accumulate excess Na⁺ into the vacuoles of plant cell, and another one is efflux Na⁺ from cytoplasm to the apoplastic area through plasma membrane. The success of these two approaches were demonstrated in several plants, up to 200mM NaCl tolerance when *AtNHX1* and *SOS-1* genes were expressed separately. Herein, these two genes both were assembled in one binary vector, introduced into *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and co-overexpressed simultaneously for the first time. Transgenic plants produced more biomass, silique number, yield and germination rate when grown in the presence of 250 mM NaCl for 3 weeks. Chlorophyll degradation was less than control plants when salt stress increased up to 300 mM NaCl. Plants also were performing better than controls with longer roots and height when 28°C mild heat combined with 150 mM salt stress. In this study, the increased characteristics were likely due to better water extraction from roots, more K⁺ uptake, better photosynthetic performance and higher nitrogen assimilation rate observed in the *AtNHX1* and *SOS-1* expressing plants as compared to wild-type and single gene transgenics under saline conditions.

Keywords : *Arabidopsis*, genetic engineering, combined stresses, Na⁺/H⁺ antiporter, Salt stress, Heat Stress

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Tuz stresi altındaki Arabidopsis bitkilerinde SOS ve NHX sinyal yolu üzerinden iyon dengesini kontrol eden moleküler araçlar	17
Şekil 2.	Bitki hücrelerindeki Na iyon regülasyonunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 3.	pBI121 binary (ikili) vektörün şematik gösterimi.....	26
Şekil 4.	PJG4-5 vektörünün şematik gösterimi	30
Şekil 5.	<i>SOS-1</i> genini taşıyan pIG121-Hm vektörün şematik gösterimi.....	34
Şekil 6.	<i>Arabidopsis</i> transformasyonu	42
Şekil 7.	T1 nesline ait segregasyon analizi	43
Şekil 8.	<i>AtNHX1</i> genininin cDNA'dan amplifikasyonu.....	56
Şekil 9.	pBI121 vektör modifikasyon.	57
Şekil 10.	Koloni PCR için agaroz jel elektroforezi sonuçları	58
Şekil 11.	pBI121 vektörünün BamHI, SacI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile <i>AtNHX1</i> genini bulundurduğunun doğrulanması	58
Şekil 12.	<i>SOS-1</i> geninin klonlanmasında vektör modifikasyonu.....	59
Şekil 13.	<i>SOS-1</i> modifiye vektörün koloni PCR ile doğrulanması	60
Şekil 14.	Vektör DNA'da modifikasyon ligasyonunun doğrulanması	60
Şekil 15.	Modifikasyonu tamamlanan vektör DNA'nın <i>SOS-1</i> geni ile ligasyona hazırlanışı	61
Şekil 16.	pIG121-Hm vektörün XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile muamelesi.....	61
Şekil 17.	<i>SOS-1</i> genini taşıyan modifiye vektörün koloni PCR ile doğrulanması.....	62
Şekil 18.	<i>SOS-1</i> genini taşıyan modifiye vektörün EcoRI restriksiyon endonükleaz ile doğrulanması.....	63
Şekil 19.	Gen organizasyonu öncesi plazmid izolasyonu	63
Şekil 20.	<i>AtNHX1</i> genini bulunduran pBI121 vektörünün EcoRI enzimi ile muamelesi ..	64
Şekil 21.	<i>SOS-1</i> genini bulunduran pBI121+PJG4-5 vektörünün EcoRI enzimi ile muamelesi	65
Şekil 22.	<i>SOS-1</i> ve <i>AtNHX1</i> genini taşıyan (pBI121+ <i>AtNHX1</i> + <i>SOS-1</i>) vektörün koloni PCR ile doğrulanması	65
Şekil 23.	<i>AtNHX1</i> ve <i>SOS-1</i> genlerini taşıyan final vektörün restriksiyon endonükleazlar ile doğrulanması.....	66
Şekil 24.	Çalışmada kullanılan ifade vektörünün (pBI121: <i>AtNHX1</i> + <i>SOS-1</i>) T-DNA bölgesinin şematik gösterimi	66
Şekil 25.	Olası transgenik hatlardan toplam RNA izolasyonu.....	67
Şekil 26.	Northern Blot hibridizasyon analizi.....	68

Şekil 27. <i>Arabidopsis</i> transgeniklerinde tuz stresi ile uyarılan ifadenin Northern hibridizasyonu ile gösterilmesi	69
Şekil 28. Southern Blot analizi.....	70
Şekil 29. Farklı konsantrasyonlardaki tuz stresi altında <i>Arabidopsis</i> kök uzunlukları	71
Şekil 30. 175 ve 200 mM NaCl stresinin <i>Arabidopsis</i> kök uzunlukları üzerine etkisi.....	71
Şekil 31. 150 mM NaCl stresinin <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde fenotip üzerine etkisi	72
Şekil 32. 250 mM NaCl stresi altında <i>Arabidopsis</i> 'teki fenotipik değişimler	74
Şekil 33. Yabani tip ve transgenik <i>Arabidopsis</i> lerde kantitatif analizler	75
Şekil 34. <i>Arabidopsis</i> 'te tuz stresi şoku	76
Şekil 35. <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde osmotik stresin değerlendirilmesi.....	77
Şekil 36. Kombine stres altındaki <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde kök uzunlukları	79
Şekil 37. Tuz ve sıcaklık eş zamanlı streslerinin <i>Arabidopsis</i> 'lerde fenotipe etkisi	81
Şekil 38. Sıcaklık ve tuz stresinin <i>Arabidopsis</i> bitkilerinin kantitatif özellikleri üzerine kombine etkisi	82
Şekil 39. 250 mM NaCl stresinin <i>Arabidopsis</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi ...	83
Şekil 40. Tuz stresi altında <i>Arabidopsis</i> yapraklarında MDA birikimi.....	84
Şekil 41. Tuz stresi altında <i>Arabidopsis</i> yapraklarında klorofil içeriğindeki değişimler... 86	
Şekil 42. Tuz stresi altında <i>Arabidopsis</i> yapraklarında antosiyanin miktarındaki değişimler.....	87
Şekil 43. <i>Arabidopsis</i> yapraklarında tuz stresi altında Na ⁺ (A) ve K ⁺ (B) konsantrasyonları	88

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. cDNA sentezi için optimize edilmiş reaksiyon koşulları.....	21
Tablo 2. <i>AtNHX1</i> geninin amplifikasyonu için gerekli bileşenler.....	22
Tablo 3. <i>AtNHX1</i> geninin amplifikasyonu için optimize edilen PCR şartları.....	22
Tablo 4. BamHI restriksiyon endonükleaz için optimize edilmiş reaksiyon koşulları	24
Tablo 5. SacI restriksiyon endonükleaz için optimize edilen reaksiyon koşulları	25
Tablo 6. T4 DNA Polimeraz için optimize edilen reaksiyon koşulları	25
Tablo 7. Vektör DNA'nın saflaştırılması	26
Tablo 8. BamHI restriksiyon endonükleaz için optimize edilen reaksiyon koşulları	27
Tablo 9. Ligasyon reaksiyonu	28
Tablo 10. Koloni PCR.....	29
Tablo 11. Koloni PCR şartları.....	29
Tablo 12. pBI121 plazmid DNA'nın HindIII restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu	30
Tablo 13. PJG4-5 plazmid DNA'nın HindIII restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu	31
Tablo 14. pBI121 binary vektör ve PJG4-5 plazmid DNA'nın ligasyon reaksiyonu	31
Tablo 15. pBI121+ PJG4-5 339 bp vektörü için optimize edilmiş koloni PCR.....	32
Tablo 16. pBI121+ PJG4-5 339 bp vektörü için koloni PCR koşulları	32
Tablo 17. pBI121+PJG4-5 339bp vektörünün EcoRI restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu	33
Tablo 18. pBI121+ PJG4-5 339bp vektörünün XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile reaksiyonu	33
Tablo 19. pIG121-Hm vektörün XbaI ve SacI çifte restriksiyon endonükleaz kesimi	34
Tablo 20. pBI121+PJG4-5 339bp ve <i>SOS-1</i> DNA fragmenti için ligasyon reaksiyonu	35
Tablo 21. <i>SOS-1</i> geni için optimize edilmiş koloni PCR.....	35
Tablo 22. <i>SOS-1</i> geni için optimize edilmiş koloni PCR koşulları	36
Tablo 23. pBI121+PJG4-5 339bp+ <i>SOS-1</i> vektör DNA'nın EcoRI restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu	36
Tablo 24. pBI121+ <i>AtNHX1</i> plazmid DNA'nın EcoRI enzimiyle kesim reaksiyonu.....	37
Tablo 25. pBI121+PJG4-5 339bp+ <i>SOS-1</i> plazmid DNA'nın EcoRI enzimiyle kısmi kesim reaksiyonu.....	38
Tablo 26. <i>AtNHX1</i> ve <i>SOS-1</i> fragmetlerinin ligasyon reaksiyonu	38
Tablo 27. Final vektör (pBI121+ <i>AtNHX1</i> + <i>SOS-1</i>)'de koloni PCR koşulları	39
Tablo 28. Final vektörde (pBI121+ <i>AtNHX1</i> + <i>SOS-1</i>) koloni PCR şartları.....	39

Tablo 29. Örneklerin normalizasyonu için gerekli bileşenler	44
Tablo 30. <i>AtNHX1</i> , <i>SOS-1</i> ve <i>Aktin</i> gen problemlerinde kullanılacak DNA'nın amplifikasyon reaksiyonu	46
Tablo 31. <i>AtNHX1</i> , <i>SOS-1</i> ve <i>Aktin</i> gen problemlerinde kullanılacak DNA'nın amplifikasyon şartları.....	46
Tablo 32. Prob işaretleme reaksiyonu	47
Tablo 33. Pre-hibridizasyon solüsyonu	48
Tablo 34. Yıkama solüsyonu.....	49
Tablo 35. Arındırıcı tampon.....	49

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yüzey alanının yaklaşık %70'i okyanuslarla çevrili olan dünya, tuz stresi ile karşı karşıya olan bir gezegendir. Okyanusların Na^+ konsantrasyonu 500 mM iken, K^+ konsantrasyonu yalnızca 9 mM'dır (Flowers, 2004). Doğadaki evrimsel adaptasyon süresince, okyanus bitkileri bu koşullardaki yaşama kabiliyetlerini korumayı sürdürürken, karasal yaşama adapte olanlar, bu yeteneklerini kaybederek glikofitik hale gelmişlerdir. Ne yazık ki, dünya popülasyonunu besleyen tarımsal ürünler ağırlıklı olarak glikofitlerdir ve yüksek tuz konsantrasyonlarına hassastırlar (Zhang ve Shi, 2013). Yüksek tuz konsantrasyonları hem tohum verimini, hem de tarımsal ürünlerin yeni alanlara yayılım ve adaptasyonunu sekteye uğratar.

Yüksek sıcaklık da birçok önemli tarımsal bitkinin verimliliğini sınırlamaktadır (McDonald ve Paulsen, 1997). Toprak yüzey sıcaklıklarının 50°C 'yi aştığı kurak ve yarı kurak bölgelerde, bitki popülasyonları önemli düzeyde azalmaktadır (Setimela vd., 2005). Tuzluluk ise, doğrudan toksik etki göstererek bitkideki enerji statüsünü değiştirir. Tuzun bitkiler üzerindeki toksisitesi, hem osmotik stres kaynaklı su eksikliğinden, hem de aşırı sodyum iyonlarının kritik biyokimyasal süreçlere ortak etkisinden kaynaklanır (Apse vd., 1999). Tuz stresi ve ekstrem sıcaklıklar, büyüme, gelişme ve tohum verimi bakımından küresel düzeyde tehdit oluştururlar. Bu iki stresin ortak etkisi, hücresel seviyede dehidrasyona sebep olmalarıdır (Tester ve Bacic, 2005).

Günümüzde küresel ısınma kaynaklı iklimsel değişimler, artan sıcaklık değerleri, su stoklarının hızla azalması ve bu sebeplerle meydana gelen ürün ve tarımsal alan kayıpları, farklı stres çeşitlerinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini oldukça düşündürücü kılmakta ve yakın gelecekte birçok ülkede açlık sıkıntısının baş göstereceğine işaret etmektedir.

Tuz stresi pek çok farklı mekanizma ile etkili olması ve kendisiyle birlikte başka stres tiplerine de sebep oluşu bakımından değerlendirildiğinde, bitkilerde tuz stresine tolerans, hem hücresel hem de bitkisel düzeyde kompleks bir olay olarak değerlendirilir. Bu sebeple, tuz stresi altında büyüebilme ve tohum oluşturabilme kabiliyetine sahip yeni kültürler yetiştirmek, dolayısıyla tarımsal üretimin sürdürülebilmesinin, stres toleransı ile ilişkili tek bir özelliğin çalışılması/değiştirilmesi ile başarılamayacağı bir gerçektir, birden fazla özelliğin bitkilere kazandırılmasını gerektirir. Bu durum, yakın geçmişteki mevsimsel

anomalilerin etkisi, artan sıcaklık değerleri ile beraber kısıtlı su miktarı ve astronomik rakamlara ulaşan dünya popölasyonuna besin sağlanması endişesi ile daha elzem hale gelmiştir (Cuartero vd., 2009).

Abiyotik stres toleransının artırılması amacıyla yapılan gen mühendisliği tabanlı çalışmalar birçok yolla gerçekleştirilebilir: Bunlar; geleneksel polenleme (manual cross-pollination), iki adımlı transformasyon (sequential transformation), farklı genleri taşıyan farklı vektörlerle eş zamanlı transformasyon (co-transformation), veya bir ikili (binary) vektör üzerinde çok sayıda gen organize edilerek oluşturulan kasetler yardımıyla yapılan transformasyondur (Rukavtsova vd., 2013). Yukarıda sıralanan şekilde çeşitli yaklaşımlar olmasına karşın, stresle etkilenmiş çevrelerde yaşayabilen tolerant bitkiler yetiştirilmesi amacıyla yapılan genetik mühendislik çalışmaları, günümüzde problemi aşmadaki en etkili ve ekonomik yaklaşım olarak bilinmektedir. Çünkü bu yaklaşım, ilgili gen(ler)in bitkiye aktarımı ile, elit bir genotipin geri kalan karakteristiklerini hiç etkilemeden, spesifik niteliklerin kontrol edilebilmesine olanak sağlamaktadır (Ashraf, 2010).

1.2. Tuz Stresi ve İyon Toksisitesi

Dünyadaki tuzdan etkilenmiş toprakların büyük kısmını Na_2SO_4 ve NaCl 'nin sebep olduğu tuzlu topraklar oluşturmaktadır. Fakat NaCl en çok çözünen ve topraklarda en çok biriken tuzluluk faktörüdür (Mohammad ve Szabolcs, 2010).

Yüzde yirmilik oranla abiyotik stresler arasında ikinci sırada yer alan mineral stresin çoğunu tuz stresi oluşturur ve dünyada tuz stresine maruz kalmış 800 milyon hektardan fazla alan yer alır (Tuteja, 2007). Bunun 397 milyon hektarı tuz stresi kaynaklı, kalan 434 hektarı ise tuz stresi ile ilişkili soda etkisi yaratan koşullar kaynaklıdır (Khan vd., 2015). İyonlar tarafından oluşturulan osmotik potansiyel, yani toprakta çözünen tuzların yüksek konsantrasyonları (elektriksel iletkenlik $\text{EC}_e \geq 4 \text{ dS m}^{-1}$ olduğunda) ($\text{EC}_e \geq 4 \text{ dS m}^{-1}$, 40 mM NaCl 'ye eşittir.) -0,2 MPa'ya eşit olduğu takdirde toprakta tuz stresinden bahsedilir (Ahmad vd., 2013). Yüzde 98'ini terlemeyle hücrelerinden uzaklaştıramayan türler, tuzu vakuollerinde biriktirebilmeli ve bu şekilde sitoplazmayı Na iyon toksisitesinden koruyarak, tuz iyonlarının hücre çeperinde birikip dehidrasyona sebep olmasını engellemelidirler. Aksi halde özellikle yaşlı yapraklarda, iyon konsantrasyonu hücreleri öldürecek toksik seviyelere ulaşabilir (Flowers ve Yeo, 1986).

Tuzluluk, oluşma sebeplerine göre primer (doğal) ve sekonder tuzluluk olarak iki gruba ayrılabilir. Primer tuzluluğun oluşma nedenlerini; ana kayaların ayrışması ile,

çoğunlukla klorid formda olan sodyum, kalsiyum, magnezyum ve az da olsa sülfat ile karbonatların açığa çıkması, ya da zaman içinde tekrar eden deniz suyu (veya okyanus) baskınları şeklinde özetleyebiliriz (Munns ve Tester, 2008). Sekonder tuzluluğun oluşma sebepleri ise; tarımsal alanlarda yoğun ve yanlış sulama ile, çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı suyu seviyesinin toprak yüzeyine kadar yükselmesi, aşırı otlatma, bir bölgenin doğal vejetasyonunu yok ederek tarım arazilerinin açılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla kontaminasyonu olarak sıralanabilir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Buna ilave olarak, son yıllarda artan küresel ısınma ile tuz stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerinin daha dramatik hale geldiği söylenebilir.

1.3. Tuz Stresinin Bitkilerin Fizyolojisi Üzerine Etkileri

Tuz stresi bitkileri, osmotik stres ve iyon stresi adı altında iki farklı şekilde etkiler. Yüksek tuz konsantrasyonları köklerin su alımını sekteye uğratır, kök rizosferinde tuz miktarının artmasıyla birlikte ilk etapta osmotik stres oluşmaktadır (Munns, 2005). Oluşan bu dışsal osmotik stres, kullanılabilir su miktarının da azalmasına sebep olur ve bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak da adlandırılır. Bu durum sırasıyla hücre genişlemesinin ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olur. Osmotik stresin ardından, ortamda artan Na ve Cl iyonlarının K^+ , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde, besin eksikliği ortaya çıkar. Bu da iyon stresi olarak adlandırılır.

Tuzluluk, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini, osmotik stres ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, dolaylı etkisini (sekonder etki) bu stres faktörleri sonucunda bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile gösterir. NaCl'nin sebep olduğu başlıca sekonder etkiler; DNA, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren reaktif oksijen türlerinin sentezi; fotosentezin inhibisyonu; metabolik toksisite ve apoptozis olarak sayılabilir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Ayrıca yüksek orandaki Na iyonları, temel element potasyumun eksikliğini tetikleyerek, K^+ bağımlı süreçleri bloke eder ve özellikle protein konformasyonunu bozmak suretiyle geri dönüşümsüz toksik etkiler oluşturur (Zhang ve Shi, 2013). Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri; bitkinin çeşidine, uygulanan tuz çeşidi ile miktarına ve tuza maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir. Tuzlu ortamlarda bitkiler, genotipik farklılıklara bağlı olarak çok farklı cevaplar verirler. Tuzluluğa karşı verilen bu farklı büyüme cevapları sadece farklı iki bitki türü için değil, aynı türün farklı çeşitleri için de geçerlidir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

1.3.1. Organ Düzeyinde Etkileri

Tuz stresinin bitkilerdeki en hızlı etkisi, yaprak yüzey alanında kademeli olarak meydana getirdiği azalmadır. Ayrıca tuz stresi altında yaprak, kök, gövde kuru ve yaş ağırlıklarında da azalma meydana gelir (Munns ve Tester, 2008). Aşırı tuz konsantrasyonları bitkide mitotik aktivite ile hücre bölünmesi ve uzamasını etkileyerek gövde yaş ağırlığı, gövde uzunluğu, bitki başına düşen yaprak sayısı, kök uzunluğu ve kök yüzey alanı gibi özellikleri negatif yönde etkiler. Tuz stresi altında bitkide epidermal kalınlık, mezofil kalınlığı, palizat ve sünger parankimasında yer alan hücrelerin uzunluk ve çapı artar ve yapraklardaki hücresel alan daralır. Kök, gövde ve yaprak ağırlığı azalır ve kök sistemi tuzluluğa doğrudan maruz kalmasına karşın, yaprak büyümesi tuz stresine karşı kök büyümesinden daha duyarlı olduğundan kök/gövde oranı artar. Toplam kuru ağırlık %80 oranında azalır (Wang ve Nii, 2000). Tuz stresi bitkinin bütün gelişim evrelerini etkilemesine rağmen, en çok etkilenen evre tohum üretim safhası, dolayısıyla tohum verimidir. Ayrıca tuz stresi, çiçek sayısında azalmalara ve çiçeklenmenin daha erken başlamasına neden olur (Munns ve Tester, 2008).

1.3.2. Organel Düzeyinde Etkileri

Tuz stresi, endoplazmik retikulumun kısmi olarak şişmesine yol açar ve vakuol oluşumunu tetikler. Mitokondrinin şişmesiyle ilişkili olarak mitokondriyal kristallerin azalmasına sebep olur. Tonoplasttan hücre içi keselerin oluşumuna ve tonoplastın parçalara ayrılmasına yol açar. Yaprak hücrelerinde sitoplazmanın stabilizasyonunun bozulmasına neden olur. Hücrelerin yuvarlaklaşmasıyla hücreler arası boşluklar azalır ve yaprak alanıyla beraber stomatal yoğunluk da azalmış olur. Elektron mikroskop çalışmaları kloroplastların tilakoid zarlarının şiştiğini ve grana lamellerinin sayı ve yüksekliğinin azaldığını, ardından kloroplastların çökeldiğini ve zarlarının ise kıvrıldığını göstermiştir (Hernandez vd., 1999).

1.3.3. Hücresel Düzeyde Etkileri

1.3.3.1. Hücre Zarı, Hücre Çeperi ve Lipidler Üzerine Etkisi

Hücre çeperi, bitki hücrelerinde hücrenin en dışında bulunan, hücrenin salgıladığı polisakkaritler ve polimerlerden oluşan, hücrenin hacmini düzenlemek ve şeklini belirlemek gibi temel işlevlere sahip destek örtüsüdür. Tuz stresi koşullarında apoplastta yüksek

konsantrasyonda Na^+ birikir. Biriken Na^+ , hücre çeperi yapısında bulunan pektin gibi yapısal elemanların iyonik bağlarını bozarak veya apoplastik enzimleri olumsuz yönde etkileyerek hücre çeperinin temel işlevlerini yerine getirmesini engelleyebilir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Ayrıca hücre çeperinde biriken tuz hücreyi dehidrasyona uğratabilir (Munns, 2005).

Lipidler, siyanobakteriler dahil çeşitli organizmalarda hücredeki organeller için ve hücrel membranların çoğunda, fizyolojik stres faktörlerinin toleransı için bir izolasyon molekülü olarak iş görür. Hücrede kuyruk kuyruğa bağlanarak çift katlı bir zar oluşturan fosfolipidler, hücrenin kuraklık veya tuz stresi toleransından sorumludur. Tuz stresi, lipoksigenazların aktivitesini arttırarak fosfolipidlerin miktarını azaltır. Hücredeki lipid miktarının düşük NaCl konsantrasyonları (45 mM'a kadar) karşısında arttığı, yüksek NaCl konsantrasyonları karşısında ise azaldığı bilinmektedir (Singh vd., 2002). Çünkü tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif saldırıların ana hedefi hücre zarı lipidlerindeki çift bağlardır. Oksidatif stres ile zarda lipid oksidasyonu meydana gelir ve serbest kalan zar sterollerinin, fosfolipidlerin yağ asidi zincirleri ile etkileşime girmesi sonucu, hücre zarının akışkanlığı azalır, geçirgenlik ve zar proteinlerinin aktivitesi olumsuz etkilenir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

1.3.3.2. İyon İçeriği ve Su İlişkileri Üzerine Etkisi

Büyüme ve gelişme için gerekli temel elementlerden biri olan K^+ , osmotik dengenin korunmasında, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde, protein sentezinde ve stomaların hareketinde rol alır. Dış ortamda Na^+ miktarının artmasıyla hücreye sodyumun girişi artarken, sodyumun, potasyumun bağlanacağı alanlar için K^+ ile yarışması sonucu potasyum iyonlarının hücreye alınımı azalır, buna bağlı olarak da Na^+/K^+ dengesi bozulur (Parida vd., 2004). Hücre bölünmesi, hormon salınımı, protein oluşumu, gen ifadesi ve sinyal iletimi gibi konularda, kalsiyumun işlevsel önemi büyüktür. Na^+ , hücre zarındaki Ca^{+2} ile yer değiştirerek zarın apoplast kısmında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ iyon oranının artmasını sağlar. Bu durumda zarın fizyolojik ve fonksiyonel yapısı bozulur (Çulha ve Çakırlar, 2011). Hücredeki tuz konsantrasyonundaki artış, osmotik potansiyeli ve su potansiyelini daha negatif yaparken, turgor basıncını da arttırır. Kısa süreli NaCl stresi su içeriği ve alınımını, yaprak su potansiyelini, transpirasyon oranını ve etkin su kullanımını azaltır (Munns ve Tester, 2008).

1.3.3.3. Fotosentez, Fotosentetik Pigmentler ve Proteinler Üzerine Etkisi

Tuz stresi, osmotik potansiyeli düşürerek, kullanılabilir su içeriğini azaltır. Bu durumda bitkilerde transpirasyon ile su kaybını önlemek için meydana gelen ilk tepki, stomaların kapanmasıdır. Stomaların kapanması, transpirasyonu engeller ve stoma iletkenliğinin azalmasına yol açar. Stoma iletkenliğinin azalması ile birlikte, kloroplastlara giren CO₂ miktarı sınırlanmış olur ve bununla beraber net CO₂ asimilasyon oranı ile Rubisco aktivitesi azalır (Munns ve Tester, 2008). Tuz stresinin kloroplast tilakoidlerinde yer alan proteinlerin ve hücredeki fotosentetik enzimlerin yapısında meydana gelen değişimlerle elektron taşınımını etkilemesinden dolayı fotosistem II (PSII) aktivitesi inhibe olur ve fotosentez sekteye uğrar, fotoinhibisyon meydana gelir (Rita ve Frederick, 2005). Fotoinhibisyon sonucu, PSII boyunca elektron taşınımı engellenir ve PSII 'deki serbest oksijenlerden süperoksit radikali sentezlenebilir. Tuz stresi ile klorofilaz enziminin aktivasyonu sonucu klorofil, klorofilid ile fitole yıkılır. Ayrıca toplam karotenoid miktarları azalır (Çulha ve Çakırlar, 2011).

1.3.3.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Sentezi ve Antioksidanlar Üzerine Etkisi

Yüksek tuz konsantrasyonları süperoksit, hidroksi ve peroksi radikaller gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumundan dolayı, su eksiliği kaynaklı oksidatif stres ile sonuçlanır. Hiper osmotik ve iyonik streslerin yan ürünleri olan reaktif oksijen türleri, DNA, karbohidrat, lipid ve proteinler gibi makromoleküllerle etkileşime girerek membranların yapısal bozulmasına, zarda lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, enzim inhibisyonuna, klorofil parçalanmasına, DNA ile RNA'da hasarlara ve hücre ölümlerine neden olur. Reaktif oksijen türlerinin sentezi, mitokondride elektron taşıma sisteminde yer alan kompleksler tarafından veya peroksizomlardaki oksidasyon enzimleri tarafından, veyahut da apoplast ve kloroplastlarda gerçekleştirilir (Blokchina ve Fagerstedt, 2010).

1.4. Bitkilerde Tuz Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar

1.4.1. Büyümenin Kontrolü

Bitkinin stresle karşılaştığı ilk aşamadaki cevap tuz stresine değil de, daha çok su eksikliğine spesifiktir. Bitki su alamadığından dolayı köklerden, yaprak büyüme ve gelişimini azaltacak, daha az oranda da, kök büyümesini ve lateral kök oluşumunu olumsuz

yönde etkileyecek kimyasal sinyaller gelir. Bunların ilki absisik asittir ve bitki tuz stresine maruz kaldığında içsel ABA miktarı artar. Bu sinyaller ile yaprak alanı küçülür ve kalınlaşır, bu da hücre ebat ve şeklinin değiştiğinin göstergesidir. Ayrıca tuz ile muamele olmuş ortamlardaki bitkilerde yüksek ağırlık/alan oranına bağlı olarak transpirasyonun etkinliğinin arttığı görülmüştür. Bu da terleme ile kaybedilen su kadar karbon fiksasyonu yapıldığına işaret eder. Bu özellik kuraklık ve tuz stresine adapte olmuş bitkilerdeki ortak özelliktir (Munns, 2005).

1.4.2. İyon Dengesinin Sağlanması

1.4.2.1. Vakuolar Na⁺ Kompartmantalizasyonu

Bitkiler iki temel yol üzerinden tuz stresini tolere etmeye çalışır: Na iyonlarını plazma zarından dışarı atar veya bu iyonları kofullara ya da yaşlı yapraklara yönlendirirler. Her iki durumda da, düzenleyici osmolitlerin sentezi ve birikimi hücredeki doğru osmolariteyi ayarlar. Kofullar, olgun bir bitki hücresinde toplam hacmin %80'ini işgal eden en geniş organellerdir. Na⁺/H⁺ taşıyıcıları, yukarıda sayılan görevleri kofulda yer alan iki vakuolar proton pompasının (vakuolar Adenozin trifosfat (V⁺ ATPaz) ve hidrojen pirofosfat (H⁺ ATPaz)) oluşturduğu elektrokimyasal potansiyelin sağladığı H⁺ gradiyentinden gelen enerji ile gerçekleştirir (Apse vd., 1999).

Kökler rizosferde biriken Na ve Cl iyonlarının çoğunu elimine ederek sadece suyu alır, aksi durumda sürgünlerde biriken tuz toksik seviyelere ulaşabilir (Munns ve Tester, 2008). Tuz stresi ile birlikte hücreye Na⁺ girişi zar potansiyelini yok eder ve bozulan elektrokimyasal gradiyent, Cl iyonlarının hücreye pasif olarak alınmasını sağlar. Ayrıca kofuldaki yüksek Na⁺ konsantrasyonu hücrelere daha fazla su alınımını tetikleyerek hücre turgorununun devamlılığını ve korunmasını gerçekleştirir (Glenn vd., 1999).

1.4.2.2. Plazma Mebranı Boyunca Na⁺ Taşınımı ve K⁺ Dengesi

Na⁺/H⁺ taşıyıcıları ve plazma zarındaki diğer katyon/proton taşıyıcıları hücre içi iyon dengesini kurmak üzere Na iyonlarını hücreden apoplastik alana taşırlar. Na⁺ hücre zarına bağlı Na⁺/H⁺ taşıyıcıları (*SOS-1*'lar) ile ksileme yüklenir. Olgun yapraklarda konsantrasyon şeklinde biriken fazla Na⁺, *SOS-1*'lar ile ksileme geri yüklenerek veya floem döngüsüne katılarak köke geri gönderilebilir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Tuzun yüksek, düşük veya

spesifik olmayan katyon kanalları vasıtası ile floemden çıkışı ise, gövdede yeni gelişen dokulara yönelmesini engelleyerek tuz stresine toleransı sağlamış olur.

Etkili iyon akışının düzenlenmesi vasıtasıyla sitoplazmadaki iyonik toksisitenin düşük konsantrasyonlarda tutulması, K^+ gibi temel iyonların hücrede biriktirilmesi açısından önem arz eder. Ayrıca K^+ ve Na^+ dünya üzerinde yaşayan organizmaların tamamı için önemli rol oynayan sırasıyla 7. ve 6. en çok bulunan elementtir. K^+ hücrelerde elektrostatik dengenin devamlılığını sağlar. K ile Na iyonlarının dengesi, birçok sitozolik enzim aktivitesi ve zar potansiyelinin ayarlanması için elzemdir (Rodríguez-Rosales vd., 2009). Yüksek sitoplazmik Na^+ konsantrasyonları toksik olmasına rağmen, bitkiler K^+ eksiliğinde yüksek afinite ile Na^+ alınımı mekanizmalarını aktif eder. Na^+ konsantrasyonunun fazla olması durumunda da, kofullarda bir noktaya kadar Na iyonları fonksiyonel olarak K^+ ile yer değiştirir (Na^+ sitoplazmadan *SOS-1* yardımıyla dışarı çıkarken K^+ aktif taşınım ile içeri girer). Bu durum kofullarda osmotik potansiyelin düşmesine ve hücreye su girişinin tetiklenmesine katkı sağlar (Rodríguez-Rosales vd., 2009).

Bitki hücrelerinde, H^+ ATPaz aracılı primer aktif taşınım ile iyon kanalları ve yardımcı taşıyıcıların görev aldığı sekonder taşınım sözkonusudur. Tuz stresi altında Na^+ stresi kökteki hücreler tarafından K^+ alınımını sekteye uğratar. Bu süreç sitoplazmadaki K^+/Na^+ oranında bir azalmaya sebep olur. Na^+ sitozolde yüksek seviyelerde birikmeye başladığında ise enzimlere toksik olmaya başlar. Sitozoldeki aşırı Na^+ aktif taşınım ile plazma veya tonoplast zarı üzerinden apoplastik alana uzaklaştırılır (Shi vd., 2002).

1.4.3. Efektör Moleküllerin ve Bitkisel Hormonların Uyarılması

Hormonlar stres sinyallerinin algılanmasında önemli rol oynar. Tuz stresi ile topraktaki düşük su potansiyeli, öncelikle kök ucu tarafından algılanır ve kök ile yaşlı yapraklarda sentezlenen ABA, ksileme aktarılarak stoma hücrelerine, oradan da sürgünlere taşınır ve burada stomatal iletkenliği düzenleyerek transpirasyon yoluyla yaprakta su içeriğinin azalmasını engeller. ABA ayrıca tuz stresi ile uyarılan genlerin ifadesini indükler (Zhang vd., 2006).

Sitokininler de stres durumunda aktif olan moleküllerdir. ABA ile antagonist olarak çalışan sitokininler, tuz stresi kaynaklı su eksikliği koşullarında artış göstererek yaşamsal faaliyetleri, senesensi ve prolin sentezini düzenleyebilir (Alvarez ve ark., 2008). Bunun dışında tuz stresi hücre zarındaki reseptörler tarafından algılandığında, fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipaz C fosfolipidlere bağlanıp Ca^{+2} , diaçilgliserol ve inozitoltrifosfat gibi stres

toleransını düzenleyen ikincil habercilerin oluşumunu sağlar. NaCl stresinin sitozoldeki Ca^{+2} artışını tetiklediği bilinmektedir. Ca^{+2} artışı, hücre zarında stresin aktive ettiği Ca^{+2} kanallarıyla sitozole aktarılır. Bitkilerdeki en yaygın ikincil haberci olan Ca^{+2} *SOS* sinyal yolundaki *SOS-3* tarafından algılanarak ilgili proteinlerin fosforilasyon ya da defosforilasyonu ile stresten sorumlu genlerin ifadesini düzenler (Apse ve Blumwald, 2007).

1.4.4. Osmolitlerin Sentezi

Bitkiler stres koşullarına maruz kaldığında, hücrel metabolitlerin miktarında değişimler meydana gelir ve çeşitli metabolik dengesizlikler ortaya çıkar. Elektriksel olarak nötr olup, koruyucu role sahip bu moleküller 4 sınıftır: Prolin ve glisin betain gibi N- içerenler, sakkaroz ve rafinoz gibi şekerler, mannitol ve sorbitol gibi düz zincirli polihidrik alkoller ve myo-inositol gibi siklik polihidrik alkoller. Tuz stresi toleransında etkili olan metabolitler; çözünebilir şekerler, amino asitler, organik asitler, poliaminler ve lipidlerdir. Bunlar arasında küçük organik moleküller suda çözülebilen ve yüksek konsantrasyonlarda toksik olmayan, tam aksi metabolik aktivite ile uyumlu, radikalleri temizleyerek, membranları ve enzim komplekslerini reaktif oksijen türlerinden korumada, sitoplazmik ve vakuolar hacimleri koordine etmede (osmoregülasyon) ve turgorun devamlılığını sağlamada görevli moleküllerdir (Khan vd., 2015). LEA (late embryogenesis abundant) proteinleri de koruyucu roldeki proteinlerdir ve hücrelerde yüksek tuz konsantrasyonları veya su kaybı durumunda protein yapısını stabilize ederler. Bu moleküller hücrede yüksek konsantrasyonda ise, yenilerinin üretimi hücreye ekstra enerji tüketimine ve dolayısıyla da büyümede eksikliklere sebep olur. İlgili moleküller tuz stresi uygulandığında bitkinin hızlıca büyümesini sağlayamazlar da, bitkiyi solmaktan kurtararak, bitkinin stres altında bir süre daha hayatta kalmasını sağlar (Munns, 2005).

1.4.5. Tuza Tolerans Sağlayan Aday Genler

Tuz stresine toleransı arttırmada kullanışlı olabilecek birçok farklı aday gen bulunur. Bunlar gövdeden iyonların uzaklaştırılması, doku düzeyinde tolerans ve osmotik tolerans olmak üzere üç ana başlık altında fonksiyon gösterirler. Transgenik çalışmalarda kullanılan özel bir gen veya gen ailesi bu başlıkların birden fazlasına hizmet edebilir. Yüksek afinitedeki K^{+} taşıyıcıları ailesi *HKT* ve aşırı tuz konsantrasyonlarına hassas *SOS* ailesi üyesi genler (*SOS-1*, *SOS-2* ve *SOS-3*) Na iyonlarının gövdedeki birikimini kontrol etmesine

rağmen, bu iki aile kullanılarak yapılan transgenik çalışmalarda sadece ortalama bir iyileştirme yakalanabilmiştir (Mian vd., 2011). Doku toleransında, Na iyonlarının kofullarda birikmesini sağlayan Na^+/H^+ taşıyıcıları (*NHX*) ve H^+ pirofosfatazlar (*AVP1*), çözünebilir proteinlerin sentezini düzenleyen genler (trehaloz 6 fosfat fosfataz (*TPP*), trehaloz 6 fosfat sentaz (*TPS*), prolin 5 karboksilaz sentaz (*5PCS*), betain aldehit dehidrogenaz (*BADH*) gibi), reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde görevli genler (süperoksit dismutaz (*SOD*), glutatyon redüktaz (*GR*), askorbat peroksidaz (*APX*) gibi) görev alır. DREB (dehidrasyona cevap veren elemente bağlanan protein), *b-ZIP* (ökaryotik proteinlerde DNA'ya bağlanan temel lösin fermuar motifi) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler ve MAPK, kalsinörin tipi protein kinazlar (*CIPK*) da, tuz stresine toleransı kontrol eden sinyal yollarında aktif olan elemanlardır (Turan vd., 2012).

1.5. Bitki Stres Toleransında İslah Stratejileri

Düzenli sulama sistemleri, dinlendirme yöntemi (nadasa bırakma) gibi yöntemler topraktaki tuzluluğu hafifletmesine rağmen, toprak kalitesini ve verimi yüksek ürün almaya uygun hale getirmek ile arzu edilen çeşitleri seçip ekmek, çok fazla zaman alan ve maliyetli uygulamalardır. Dolayısıyla teknolojik ıslah stratejileri geliştirmek, stres koşulları altında daha üretken bitkiler yetiştirebilmek açısından önemlidir (Munns, 2002).

Üretici ve çiftçiler; meydana gelen genetik varyasyonlar nedeniyle, zaten kısıtlı olan bitkisel gen kaynaklarının kullanılamaması, genler arası hibridizasyon sebebiyle etkili mutasyon oluşturamamak ve hücre/doku kültürlerinde meydana gelen somaklonal varyasyonlar nedeniyle tuza tolerant türler oluşturmada başarısız olmuşlardır (Flowers ve Yeo, 1995). Etkili seleksiyon teknik ve teknolojilerinin olmayışı, tuza tolerans mekanizmalarının kompleksliği ve sınırlı genetik bilgi, tuza toleranslı ürünler elde etme noktasında uzun bir süre etkili geleneksel yaklaşımlar ortaya koymayı mümkün kılmamıştır. Fakat günümüzde strese cevabın biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik alınan yol ve genetik transformasyon teknolojisinin varlığı, tuza tolerant ürünler yetiştirmeyi olası hale getirmiştir (Flowers ve Muscolo, 2015).

Geleneksel ıslah metodlarının aksine, klonlama ve genetik mühendislik teknikleri tuz stresine tolerans oluşturmada daha etkili birer stratejidir. Günümüzde mühendisliği yapılan genler çoğunlukla, önemli biyokimyasal mekanizmaları düzenleyen ya da stres sinyal yollarında en son basamaktaki fonksiyonları gerçekleştiren genlerdir. Teknolojik yeniliklere rağmen tuza tolerant bir bitkinin mühendisliği birkaç yıl alır (Flowers ve Muscolo, 2015).

Tuz stresinde anahtar genleri bulmak ve bu genlerin ekonomik anlamda önemli ürünlere aktarılması günümüzde hala tam anlamıyla koordine olmamasına rağmen, ileride deniz suyu tuz konsantrasyonlarında yaşayabilme kapasitesine sahip bitkiler geliştirmek için hala bir umut vardır (Panta vd., 2014).

1.6. Termotolerans ve Tuz Stresi İlişkisi

Küresel ısınmanın yakın gelecekte biyolojik süreçler üzerine olumsuz etkilerini arttıracığı bilinen bir gerçektir. Değişmesi öngörülen mevsimlerin yanında, ortalama sıcaklıklarda, atmosferik CO₂ konsantrasyonlarında ve yağmur ile rüzgar rejimlerindeki değişiklikler aşırıdır (Bokszczanin ve Fragkostefanakis, 2013). Tuz ve sıcaklık stresi, doğal koşullar sözkonusu ise eş zamanlı gelişir. Bitkinin değişen bu çevreye ayak uydurabilmesi için oluşan fizyolojik, metabolik ve moleküler mekanizmalar da birbirleriyle tamamen bağlantılı birtakım spesifik cevaplardır (Rivero vd., 2014). Bu iki stresin kombinasyonu, bitki büyüme ve gelişimini her birinin tek başına etkilediğinden daha farklı etkiler (Li vd., 2011).

Yakın zamanda bazı streslere tolerans sağlayan faktörlerin, diğer streslerin etkilerini de azaltma kabiliyetinde olduğu tespit edilmiştir. Şöyle ki; kuraklığa maruz kalan mısır bitkileri don stresine daha tolerant hale gelmiştir. Bu durumun çok geniş yelpazedeki stres gruplarında, tek bir strese spesifik değil aksine, birçoğunda ortak olan bazı mekanizmalarla kontrol edildiği düşünülmektedir. Çünkü çevresel sinyaller tam anlamıyla olmasa da, benzer sinyal iletim yollarını aktive ederler (Sanchez-Diaz vd., 1993). Örneğin; tuz stresine cevapta önemli bir element olan Ca⁺² konsantrasyonunun, aynı zamanda ısı şoku proteinlerinin (HSP) aktivasyonunda da rol oynadığı bilinmektedir (Saidi vd., 2011). Rasmussen vd. (2013) birçok biyotik ve abiyotik stresi, hem kombinasyonlar halinde hem de tek başına çalışmış ve ortaya çıkan mikroarray profilinde, kombine streslerden elde edilen transkriptlerin %60'ının tek başına uygulanmış streslerde görülmediğini saptamıştır.

Yukarıda belirtilenlere ilave olarak; tuz stresi esnasında ortaya çıkan hafif oksidatif stresin, tuza veya sıcaklık stresine dair toleransın geliştirilmesine katkı sağladığı tespit edilmiştir (Uchida vd., 2002). Texas Tech Üniversitesi'nden Dr. Hong Zhang ve ekibi tarafından *Arabidopsis*'te *OsSIZ1* (*Oryza sativa* SUMO E3 ligaz) geninin aşırı ifade ettirildiği durumda bitkilerde hem tuz stresine, hem de 30°C'deki sıcaklık stresine kombine direncin geliştiği ortaya çıkarılmıştır (yayınlanmamış veri).

1.7. Na⁺/H⁺ Taşıyıcılarının Karakteristikleri

Na⁺/H⁺ taşıyıcıları, sodyum ve protonların membran boyunca değişimi ile, hücre içi iyon dengesi ve pH osmoregülasyonundan sorumlu zar proteinleridir. Mayalardan bitkilere kadar tüm canlı alemlerinde yer alırlar. Mevcut veritabanlarında 200 den fazla Na⁺/H⁺ taşıyıcısı bulunur (Brett vd., 2005). Bu aile, Na iyonlarının hücredeki hareketi ve tuza toleransın önemli bir belirleyicisidir (Zhang ve Shi, 2013). Hücre bölünmesi ve bölünmenin kontrolünde önemli rol üstlenmişlerdir. Ayrıca önemli biyokimyasal sinyal moleküllerin sentezlenip paketlenmeleri yerden (Golgi) spesifik lokasyonlara taşınması (vezikül trafiği) ve hücre ürünlerinin plazma membranı üzerinden hücrenin dışına salınması gibi görevler üstlenmiştir. Bunun yanında; K iyonlarının kofulların içerisindeki aktif birikimini tetikleyerek (K⁺ dengesi) turgorun devamlılığı ve hücre büyümesinin sürdürülebilirliğini düzenlerler. *Arabidopsis* genomunda 38'den fazla Na⁺/H⁺ taşıyıcısı bulunduğu tespit edilmiştir. Bunlar arasında en çok çalışılanlar vakuolar AtNHX1 ve membran SOS-1 proteinleridir (Waditee vd., 2006).

1.8. NHX1 Geninin Bitkilerdeki Biyolojik Roller

AtNHX1 (*Arabidopsis thaliana* Na⁺/H⁺ (sodyum/proton taşıyıcısı geni), 15 yıl evvel Gaxiola ve ekibi tarafından klonlanan ve günümüze kadar en çok çalışılan bitki vakuolar membranı üzerindeki bir sekonder iyon taşıyıcısıdır (Gaxiola vd., 1999). Aynı ekip tarafından maya vakuolar membran taşıyıcısı *Saccharomyces cerevisiae* *ScNHX1* 'in *Arabidopsis AtNHX1* ile eş fonksiyonda olduğu belirlenmiştir. *AtNHX1*; Na⁺, K⁺ ve Cl iyonlarını kofulda biriktirip, hücrelere suyun alınımını tetikleyen, böylece sitoplazmadaki Na iyonlarının toksik etkisini tersine çevirerek, osmotik dengeyi sağlayıp sitoplazmanın toksisitesini azaltan bir integral membran proteini kodlar (Glenn vd., 1999). Diğer yandan; hücre içindeki potasyum (K⁺) iyonlarını sitozolik K⁺ için bir havuz görevi gören kofula taşıyarak, bu iyonların kompartmantalizasyonunu katalizler. Böylece hücre içi potasyum konsantrasyonunu yüksek tutarak, besin alınımı ve tuza tolerans için hücrelere avantaj sağlar (Leidi vd., 2010). *AtNHX1* geninin yukarıda sıralanan yetenekleri, *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı ifade ettirildiğinde ortaya çıkmaktadır (Apse vd., 1999). *SOS-1*'in aksine kodladığı proteinin kısa bir C-terminal kuyruğa sahip olması ve *Arabidopsis* genomunda kendisi ile ilişkili farklı birçok homolog proteine sahip olması, diğer bitki türlerinde hangi Na⁺/H⁺ taşıyıcısının *Arabidopsis AtNHX1* geni ile fonksiyonel anlamda homolog olduğunu bulmada

zorluk yaratmıştır (Zhang ve Shi, 2013). *AtNHX1* ifadesinin ABA ve osmotik stres ile uyarılması, bu genin osmotik regülasyonda görevli olduğunu önerir. Na iyonlarını kofula taşıdığına, hücrenin turgor basıncını düzenleyerek su kaybını da aza indirger. Fakat kofullar Na iyonlarını biriktirmede bir limite sahip olduğundan, bu mekanizma sitoplazmadaki Na iyon konsantrasyonunu azaltmak için hücrelere Na⁺ girişini kısıtlayan veya Na iyonlarının membrandan dışarı atılımını arttıran mekanizmalarla (SOS sinyal yolundaki *SOS-1* geni) ortaklaşa çalışmak zorundadır.

Arabidopsis çalışılarak *AtNHX1* için elde edilen tüm bu bilgi birikimi, zaman içinde bu genin, pamuk (He vd., 2005), buğday (Chen vd., 2008), domates (Leidi vd., 2010), yer fıstığı (Asif vd., 2011) ve tütün (Zhou vd., 2011) gibi bitkilere aktarılmasıyla tarımsal üretim ve pazarlamaya yönelik hedeflere uyarlanmıştır.

1.9. *SOS-1* Geninin Bitkilerdeki Biyolojik Roller

SOS-1 (*Salt Overly Sensitive 1*), bitkilerde Na⁺ ve K⁺ dengesi için önemlidir. Na⁺ iyonlarının sitoplazmada birikimini engelleyen ve birbirleriyle işbirliği içinde çalışan üç mekanizma vardır: hücreye Na⁺ alınımının engellenmesi, Na⁺ iyonlarının hücreden çıkışının aktivasyonu ve Na⁺ iyonlarının kofullardaki birikimi (Niu vd., 1995). *SOS-1*; bu mekanizmalardan ikincisini kullanır ve plazma membranı üzerinden Na⁺/H⁺ değişimine yani Na⁺ iyonlarının hücreden çıkışına hizmet eder. Na⁺ iyonlarını plazma membranı üzerinden direkt hücre dışına taşıyarak sitoplazmanın toksisitesini azaltmaya yardımcı bir görev üstlenmiştir (Qiu vd., 2002). Na⁺ toleransının yanı sıra; pH dengesi, membran vezikül trafiği ve koful fonksiyonlarında rol sahibidir. Dahası, *sos1* mutantının reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açan bir herbisit olan paraquata daha dirençli olduğu ortaya konulmuş ve oksidatif stres toleransında yeri olduğuna işaret edilmiştir (Zhang ve Shi, 2013).

Arabidopsis'te *SOS-1* geninin tanımlanmasının ardından çeltik, domates ve *Thellugiella halophila*'dan *SOS-1* homologları karakterize edilmiştir. Domates (*Solanum lycopersicum*) *SlSOS1* geninin de *Arabidopsis SOS-1* ile fonksiyonel homolog olduğu ve uzun mesafeli Na⁺ taşınımında görevli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Oh vd., 2009).

sos-1 mutantı bitkiler yüksek Na⁺ ve düşük K⁺ etkisi altında büyüme ve gelişimleri bakımından inhibisyona uğrar. Dizi analizleri, *SOS-1* geninin N- terminal kısmında 12 transmembran domain kodlayan, yaklaşık 700 aminoasitlik C- terminal kısmında ise uzun hidrofilik bir sitoplazmik kuyruğa sahip 127-kDa'luk bir protein kodladığını göstermiştir (Shi vd., 2000). *SOS1* proteininin trans-membran kısmı hayvan, bakteri ve mantar plazma

membran Na^+/H^+ taşıyıcıları ile önemli ölçüde sekans benzerlikleri sergiler. NaCl stresine cevap olarak *SOS-1* geninin uyarıldığı (up-regule olduğu) bilinmektedir. Çift mutant analizleri *SOS-1* geninin *SOS2* ve *SOS3* ile aynı sinyal yolunda yer aldığını, bu yüzden NaCl stresi altında *SOS-1* geninin *SOS3/SOS2* sinyal yoluna bağlı olarak uyarıldığını göstermiştir (Zhu vd., 1998).

1.10. Stres Çalışmalarında *Arabidopsis thaliana*'nın Önemi

Brokoli, karnabahar, lahanası, turp ve kolza ile yakın akraba olan *Arabidopsis*, Cruciferae (*Brassicaceae*) familyasına ait dikotiledon bir bitkidir. Fakat bu bitkilerin aksine, tarımsal önemi olan bir ürün değildir. *Thellungiella salsuginea* (önceden *T. halophila*) yakın akrabası olmasına ve halofitik bir bitki olarak, halofitler tarafından sergilenen, doğal ve ekstrem tuz toleransının araştırılması yolunda daha aydınlatıcı olma ihtimaline karşın, stres toleransında anahtar genlerin tespiti, kendisi hiçbir şekilde herhangi bir strese tolerant olmadığı halde, neredeyse 20 yıldır, *Arabidopsis*'e dayandırılarak yapılmıştır (Bressan vd., 2013). Her bir *Arabidopsis* bitkisi 10.000 ila 50.000 tohum üretebilir. Bu, kalıtsal olarak aynı olan çok sayıda bitki üretebileceğimiz anlamına gelir. Bitkinin küçük genom ebatı ($n=5$, 119Mb (1Mb=1000000 nükleotid), tahmini gen sayısı (26207-<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) ve mütevazı büyüme gereksinimleri (tohumdan tohuma 8 haftada geçebilir), transformasyon ve mutasyonunun kolay olması ve kendine dölenebilirliği bu çalışmada olduğu gibi, birçok çalışmada model organizma olarak kullanılmasını sağlamış ve *Arabidopsis*'e olan bilimsel ilgiyi artırmıştır. Tuza tolerans bakımından düşük kapasitede olması *Arabidopsis*'in tuz stresi odaklı çalışmalarda iyi bir model olacağı noktasında tereddütlere yol açmasına rağmen, ardından yapılan çalışmalarla *Arabidopsis*'te birçok tuza tolerans belirleyicisinin ortaya çıkarılması, bu endişeleri yok etmiştir.

Arabidopsis bitkilerinde *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerine ek olarak tuz stresinde görevli *AtHKT1* (high-affinity potassium transporter/yüksek afiniteli K^+ taşıyıcısı)'in (*AtHKT1*, hem kök hem de gövdede sodyum iyonlarını ksilemden, ksilem parankiması hücrelerine doğru taşıyarak, kökten gövdeye sodyum taşınımını ve sodyumun ksilemden yaprak hücrelerine taşınımını azaltır) Na^+ iyon alınımı, taşınımı ve birikiminden sorumlu, ksilem parankiması hücrelerinin plazma membranında yer alan bir sodyum iyon taşıyıcısı olduğu keşfedilmiş ve bu üç membran taşıyıcısının (*AtNHX1*, *SOS-1* ve *AtHKT1*) işbirliği içinde çalışarak hücresel düzeyde veya bitki genelinde tuza tolerans sağladığı tespit edilmiştir (Zhang ve Shi, 2013).

Günümüzde moleküler teknoloji, stres sinyal yollarındaki genlerin izole edilmesi, bunların bitkilere aktarılması ve elde edilen transgenik bitkilerdeki ifadelerinin (ekspresyon) model sistemlerde veya gıda olarak tüketilen bitkilerde incelenmesine olanak sağlamaktadır (Reguera vd., 2012). Hatta bulunduğumuz yüzyılda, bu transgenik ürünlerin bazıları, bazı hükümetlerce, marketlerde tüketiciyle buluşturulmuştur (Peleg vd., 2011). Bu genlerin ifade şekillerinin ve düzeylerinin belirlenmesiyle, abiyotik streslere adaptasyondaki rollerinin anlaşılması, daha fazla stres toleransı geliştirmeye öncülük edecek ve elde edilen bilgi, direkt olarak kolayca tarımsal ekonomiyi canlı tutan diğer ürünlere uyarlanabilecektir.

1.11. Çalışmanın Amacı

Günümüzde küresel ısınma kaynaklı iklim değişikliği verileri göz önüne alındığında, arzu edilen kalite ve miktarda tarımsal üretimin neredeyse olasılıksız hale geldiği aşırıdır. Gün geçtikçe, dünya üzerinde daha fazla alan, tarımı tahrip eden sıra dışı hava şartlarını deneyimlemektedir. Abiyotik stresler, özellikle; tuz ve küresel ısınmanın tetiklediği sıcaklık stresi, sebep oldukları yıllık milyar dolarlık ürün kayıplarıyla, ülkelerin mali yükünü arttırarak, tarımsal ekonomilerini sekteye uğratan temel sorunlardandır.

Farklı abiyotik streslere maruz kalan ürünlerin verim bazında performansını arttırmada, uzunca bir süre markör tabanlı ıslah yöntemleri kullanılmış (Witcombe vd., 2008), fakat ilgili metotların multi-genik doğası, yöntemin cazibesini azaltmıştır. Bu anlamda bu çalışmada da olduğu gibi, trans gen tabanlı genetik mühendislik çalışmalarının daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Pardo, 2010). Buna rağmen, birçok transgenik çalışmada, sadece tek bir gen ele alınmıştır. Fakat artık bitkilerin, gerçek doğal ortamlarında karşılaştıkları stres faktörleri yalnızca tek bir genin mühendisliği yapılarak bertaraf edilememektedir (Fujita vd., 2006). Bu sebeple, tarımsal üretimin sürdürülebilmesi ve tuz stresi kaynaklı ürün kayıplarının azaltılabilmesi için, bahsedilen bu stresleri tolere edebilecek farklı birçok geni eş zamanlı ifade eden tolerant bitkiler geliştirmek zorunlu hale gelmiştir.

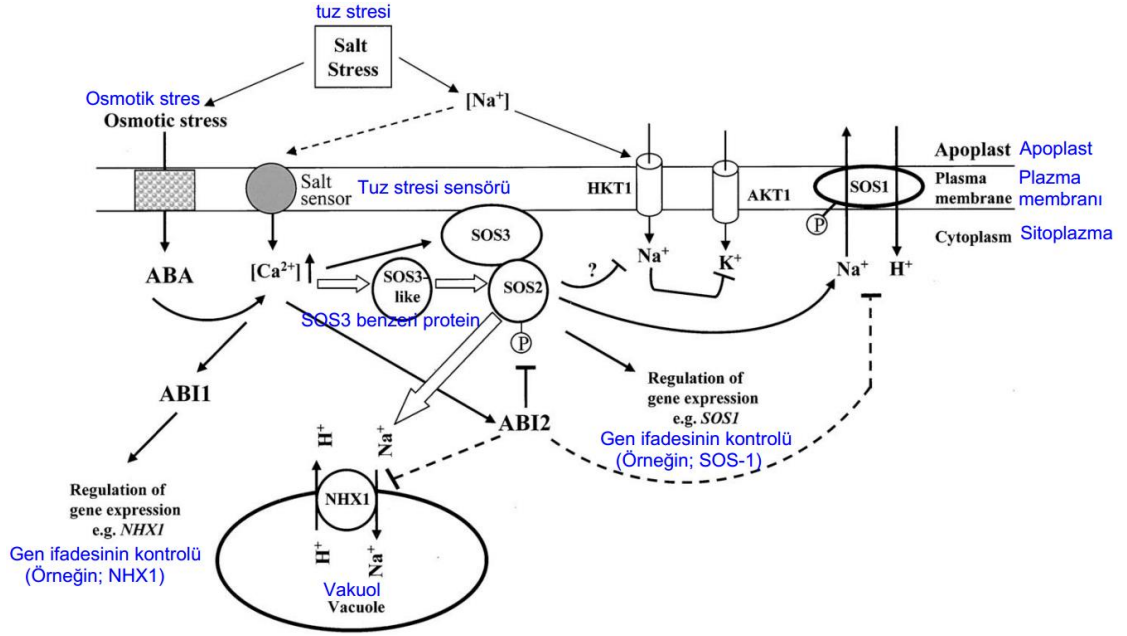
SOS-1 ve *AtNHX1* genlerini ayrı ayrı ele alıp incelemiş çalışmalar, ayrı ayrı ifade ettirildiklerinde maksimum 150-200 mM tuz stresini tolere edebilen bu genlerin kombine edildiklerinde tuz stresine ek tolerans oluşturma potansiyeline sahip aday genler oldukları düşüncesini doğurmuştur. Sadece tek bir trans gen taşıyan bitkilerin, ekstrem koşullar altında dahi, sağlam fizyolojide kalabildiklerini gösteren parametreler, yukarıda verilen bu iki gen arasında düşük bir ihtimal olsa da, fonksiyonel anlamda antagonistik bir etki oluşmayacağı

(farklı mekanizmalara fakat benzer fonksiyona sahip olmaları dolayısıyla), aksine bu iki genin aynı anda tek bir bitkiye aktarıldıklarında kümülatif bir etki oluşacağı (Şekil 1 ve 2) ve bu genler tarafından taşınan özelliklerin, artarak yeni gelişen transgenik bitkiler tarafından kazanılması ve glikofit doğada olan *Arabidopsis* bitkilerinin 250 mM'dan fazla tuz stresini tolere etmeleri amaçlanmıştır.

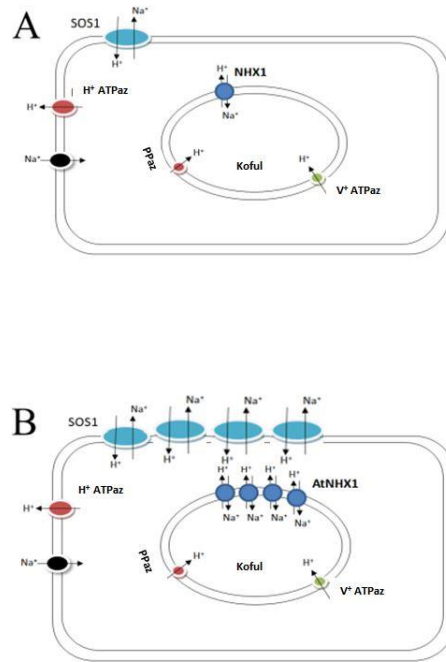
Yukarıda sıralanan sebepler ışığında, bu çalışmadaki hedefler;

1. CaMV (Karnabahar Mozaik Virüsü) 35S promotorunun kontrolü altında *Arabidopsis thaliana* *NHX1* ve *SOS-1* genlerini cis (anlamli) oryantasyonda taşıyan, tek bir bitki ekspresyon/ ifade vektörü üzerinde dizayn edilmesi,
2. *Arabidopsis* bitkilerinin bu yeni dizayn edilen vektör ile transformasyonu ve bu bitki orijinli iki farklı genin *Arabidopsis* bitkisinde eş zamanlı olarak aşırı ifade ettirilmesi (co-overexpression),
3. Genlerin bitki genomuna entegrasyonunun doğrulanması ve genomdaki ifade düzeylerinin belirlenmesi adına, oluşan transgenik bitkilerin moleküler analizi,
4. Tuz stresi altındaki transgeniklerde fizyolojik analizler ile tuz stresine direncin artırılıp artırılamadığının araştırılmasıdır.
5. Transgeniklerdeki fenotipik değişimlerin NaCl kaynaklı olduğunun doğrulanması,
6. Tuz stresine ek bir stres (sıcaklık stresi) uygulanarak gerçek doğanın taklit edildiği durumda oluşan transgeniklerin bu çevreye verdikleri fenotipik cevabın tespit edilmesidir.

Bu bakış açısı, genetik olarak eş *Arabidopsis* bireylerinin yer aldığı popülasyonlar oluşturularak fenotipe yansıtıldığında, kısa süre içinde pamuk, yer fıstığı, soya, mısır ve buğday gibi ekonomik önemi büyük tarımsal ürünlere de uyarlanabilir.



Şekil 1. Tuz stresi altındaki Arabidopsis bitkilerinde SOS ve NHX sinyal yolu üzerinden iyon dengesini kontrol eden moleküler araçlar (Chinussamy vd., 2005'ten uyarlanmıştır).



Şekil 2. Bitki hücrelerindeki Na iyon regülasyonunun şematik gösterimi. A. Normal bir hücrede Na⁺ seviyelerini düzenleyen regülatörler. B. Bitkide SOS-1 ve AtNHX1 genlerinin aşırı ifadesi durumunda öngörülen Na iyon regülasyonu (Banjara vd., 2012'den uyarlanmıştır).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan Bitki Tohum Besiyeri ve Büyüme Ortamları

Transformasyon çalışmalarında yabancı tip *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ekotipine ait tohumlar kullanıldı. *Arabidopsis* tohumlarının büyütülmesi için %1 sukroz, amaca göre, %0,6 agar veya %2 fitajel (P8169 500G,SIGMA) içeren ½ x Murashige and Skoog (MS) temel besiyeri olarak kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). Gerekli miktar saf suda çözüldükten sonra (sıvı besiyeri hazırlamak için, %0,6 agar eklenmez) pH NaOH ile 5,7-6,0 civarı ölçüldü ve besiyeri 121°C'de 20 dk. boyunca sterilize edildikten sonra ilgili antibiyotikler eklenerek petrilere yayıldı.

2.1.2. Bakteriye Suşlar ve Plazmidler

Çalışma süresince kompetent hücre olarak *E.coli* DH5α, bitki transformasyonu çalışmalarında ise; *Agrobacterium tumefaciens*'in GV3101 suşu kullanıldı. Klonlama aracı olarak, *Arabidopsis thaliana* NHX1 ve SOS-1 cDNA'larını cis oryantasyonda taşıyan pBI121 binary (ikili) vektörü (Şekil 2) ve vektör modifikasyonları için yardımcı, PJG4-5 maya vektörü (Şekil 3) kullanıldı. İlgili plazmid taşıyan her bakteriyel klon, uzun vadeli kullanım için, %20 gliserol içerisinde -80°C'de saklandı.

2.1.3. Bakteriye Büyüme İçin Hazırlanan Standart Koşullar

E.coli suşları için 30 mg/L kanamisin antibiyotiği içeren Luria-Bertani (LB) Broth (1L için 5 g yeast ekstraktı, 10 g tripton, 10g NaCl, 1 ml 1N NaOH ve 15 g agar. Besiyerinin pH'sı 7,4'e ayarlanarak 121 °C'de 20 dk. otoklavlanır.) ve 30 veya 50 mg/L kanamisin ile %0,8 bakteriyel agar içeren katı LB besiyerileri kullanıldı. Bakteriye kültürler, 37 °C'deki kuru sallayıcıda (New Brunswick Scientific C25 Incubator Shaker EDISON, NJ-USA) gece boyu 150 rpm'de çalkalanmak suretiyle büyütüldü. *Agrobacterium tumefaciens* suşları için, transformasyon esnasında 0,05 g/L rifampisin, 0,025mg/L gentamisin, 0,05 g/L kanamisin ve %0,8'lik agar içeren LB besiyerleri kullanıldı. Sıvı besiyerleri (LB) için ise, 0,05 g/L

rifampisin ile 0,025mg/L gentamisin ihtiva eden bakteriyel kültürler, 28-30 °C'de 2 gün süresince 220 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.

2.1.4. Kimyasallar Antibiyotikler Enzimler ve Diğer Malzemeler

Besiyerlerine eklenen antibiyotikler (kanamisin, rifampisin, gentamisin) 0,2 µm por açıklığına sahip filtreler yardımıyla sterilize edildikten sonra kullanıldı. Solüsyonları hazırlamada kullanılan tüm kimyasallar Sigma, AMBION, Fisher Scientific, Merck, Invitrogen, AMRESCO, Eppendorf ve Fluka firmalarından temin edildi.

Toprakta yapılan deneylerde suni gübre olarak, Miracler-Gro LJ612 garden feeder kullanıldı. Petri deneyleri, tuz stresi ve osmotik stres dışında başka herhangi bir stres uygulanmamış ise; 22°C'de 40 watt'lık beyaz ışık kaynağı altında (SYLVANIA Cool white plus F40/CWP 40W) (yaklaşık olarak 100 µmol m⁻²sn⁻¹ ışık şiddetinde) metinde belirtilen sürelerde horizontal (yatay) veya vertikal (dikey) şekilde gerçekleştirildi. Çalışmada uygulanan tüm santrifügasyon işlemleri, aksi belirtilmediği takdirde 10000-16000g (g=RCF-relative centrifugal force) arasında gerçekleştirildi.

2.2. Metodlar

2.2.1. *Arabidopsis thaliana* NHX1 (*AtNHX1*) Geninin Klonlanması

Primerler Tair veri tabanındaki 1617 bp uzunluğundaki *AtNHX1* gen sekansı (AT5G27150.1) baz alınarak ve klonlama amacına uygun olacak şekilde Primer Premier programı (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) üzerinden tasarlandı. Forward primer için *Bam*HI kesim bölgesini içeren *AtNHX1* F1 5'-AGTCGGATCCATGTTGGATTCTCTAGTGTCGAAACTG-3', Revers primer olarak ise; *AtNHX1* R1 5'-TCAAGCCTTACTAAGATCAGGAGGG-3' primerleri dizayn edildi.

2.2.1.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Bu çalışmada kullanılan tüm tohumlar 5 dk. boyunca %70 Etanol (EtOH) ve ardından %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk. süresince yüzeysel olarak steril edildi. Son adımda steril distile su kullanılarak 4-5 kez yıkanan tohumlara %0.07'lik steril agar eklendi ve tohumlar 4 gün boyunca +4°C'de stratifikasyona bırakıldı. Stratifikasyon sonrası tohumlar aseptik şartlar gözetilerek pastör pipet yardımıyla ½ x MS besiyeri içeren petrilere

yerleştirilerek, amaca uygunluğa göre yatay veya dikey şekilde (ışık kaynağının yönü önemlidir) büyütüldü. Toprak deneyleri için ise; bitkiler önce petrilere 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ ışık şiddetinde yukarıda bahsedildiği gibi büyütüldü, ardından toprağa aktarıldı. 16 saat aydınlık (150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ ışık şiddetinde) 8 saat karanlık modda (uzun gün koşulları) ve 22°C'de yaklaşık 14 gün süreyle bitki büyüme kabininde (CONVIRON ND, USA) büyütülen örnekler sıvı azot ile muamele edildikten hemen sonra toz haline getirilerek RNA izolasyonunda kullanıldı.

2.2.1.2. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA TRIzol® Reagent (AMBION) kullanılarak izole edildi (Chomczynski, 1993). İzolasyon esnasında kullanılan tüm gereç ve malzemeler (havan havaneli, pipet uçları, distile su) dietil pirokarbonat (DEPC) ile muamele edilip otoklavlandıktan sonra kullanıldı. Adımlar aşağıda numaralandırılmış olarak ayrıntılı biçimde verildiği gibidir:

- 1) 100 mg bitki dokusu sıvı azotta toz haline getirildikten sonra direkt ependorf tüplere alındı ve üzerlerine 1 ml TRIzol® Reagent eklendi. (Bu aşamadan sonra tüpler +4°C'de 1-2 saat kadar bekletilebilir).
- 2) 5 dk. boyunca oda sıcaklığında beklenildikten sonra, tüplere 200 μl kloroform eklendi. Tüpler 15 sn. boyunca hızla çalkalandı ve 2 dk. süresince oda sıcaklığında bekletildi.
- 3) Tüpler 12000xg ve +4°C'de 15 dk. boyunca santrifüj edildi (Eppendorf centrifuge 5415D). Santrifüj sonrası süpernatant (200-750 μl arasında değişen hacimlerde) yeni temiz bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 4) Bu yeni tüpteki süpernatanta eşit hacimde +4°C'de saklanan soğuk izopropanol eklenerek tüpler alt üst edildi ve 10 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildi (Bu aşamada 10 dk. oda sıcaklığında beklenildikten sonra olmak koşuluyla tüpler +4°C'de gece boyunca bekletilebilir).
- 5) Tüpler 12000xg ve +4°C'de 10 dk. boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra özel bir kağıt mendil yardımıyla (KIMTECH-kimwipes) kalan miktar tüplerden alındı.
- 6) Pellete 1 ml %75 etanol eklenerek etanolde yüzmeleri sağlandı ve tüpler 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi (Bu aşamada tüpler +4°C'de gece boyu bekletilebilir).
- 7) Tüpler 7500g ve +4°C'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi.

- 8) Santrifüjden sonra etanol boşaltıldı, bir kağıt mendil yardımıyla kalan miktar tüplerden alındı ve yaklaşık 10 dk. kurumaları için oda sıcaklığında beklendi.
- 9) Pelletin büyüklüğüne göre 30-40 µl arasında değişen hacimlerde DEPC H₂O eklenerek pellet çözülmeye çalışıldı (Bu adımda pellet çözünmediği takdirde, tüpler 65^oC'ye ayarlı ısıtıcı blokta 5 dk. beklenerek çözünmeleri sağlanabilir).
- 10) Son olarak, tüpler kısa bir santrifüjün ardından buza alınarak konsantrasyon tespiti yapıldı.

İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonu NanoDrop ND1000 Spektrofotometre cihazı ile 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk ölçülerek belirlendi. (Örneğin; 22412,3ng/µl konsantrasyonundaki RNA'nın OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri 2,0 ve OD₂₆₀/OD₂₃₀ değeri 2,02 olarak ölçüldü).

2.2.1.3. cDNA Sentezi

Tek iplikçik cDNA sentezi Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega) kullanılarak gerçekleştirildi. Sentez için ticari firmanın önerisi doğrultusunda, µg mRNA örneği başına 0,5 µg/µl Oligo(dT)₁₈ primer (InvitrogenTM Life Technologies) kullanıldı. Toplam RNA ve primer son hacim 15µl olacak şekilde hazırlandı. RNA'nın sekonder yapısının elimine edilebilmesi için; 70^oC'de 5 dk. inkübasyonun ardından bu yapının yeniden oluşmasını engellemek üzere, RNA vakit kaybedilmeden buza alındı. Kısa bir santrifüjün (Eppendorf 5415D Microcentrifuge) ardından reaksiyon tüpüne sırası ile Tablo 1'de belirtilen bileşenler eklendi.

Tablo 1. cDNA sentezi için optimize edilmiş reaksiyon koşulları

Bileşenler	Miktar
M-MLV (5X) Tampon	5µl
dNTP mix (10mM)	5µl
M-MLV RT (200 U/µl)	1µl
Toplam Reaksiyon	26 µl

Toplam 26 µl hacimde hazırlanan cDNA örneğine 24 µl DEPC H₂O eklenerek, dilüsyon yapılan örnekten 1 µl alınıp PCR için kalıp olarak kullanılmıştır.

2.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

AtNHX1 geni klonlama için ideal olan Q5® High-Fidelity DNA Polimeraz (New England Biolabs® Inc.) ve gen spesifik *AtNHX1* F1/ *AtNHX1* R1 primer kombinasyonu kullanılarak cDNA üzerinden amplifiye edilmek suretiyle gerçekleştirildi (Tablo 2 ve 3).

Tablo 2. *AtNHX1* geninin amplifikasyonu için gerekli bileşenler

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Q5 Tampon	10 µl	1X
10 mM dNTP mix	1 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
cDNA	1 µl	< 1,000 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polimeraz (2U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
Distile H ₂ O	32,5 µl	
Toplam Reaksiyon	50 µl	

Tablo 3. *AtNHX1* geninin amplifikasyonu için optimize edilen PCR şartları

Reaksiyon döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	30 sn. 98 °C
Denatürasyon	10 sn. 98 °C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 58 °C (30X)
Uzama	1 dk. 72 °C
Son uzama	2 dk. 72 °C

2.2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Reaksiyon sonucu %1'lik konsantrasyonda hazırlanan agaroz jel, elektrofrezin ardından, UV (Ultraviyole) altında incelendi ve fotoğraflandı. Bu işlem için, 1 g agaroz (D-1 LOW EEC, Eppendorf) 100 ml (1X) TAE yürütme tamponu (1L 50X TAE/Tris Asetat Tamponu için; 242 g Tris-baz, 57,1 ml Glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA/Etilen

Diamin Tetra Asetikasit (pH:8)) içerisinde, mikrodalgada ısıtılmak suretiyle çözüldü. Hazırlanan çözeltiye, oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra 6 µl EtBr (Etidyum Bromür) (5mg/ml) eklendi ve katılaşmaya bırakılarak ayırıcı matriks oluşturulmuş oldu. 20µl PCR ürünü BIO-RAD DC Power Pac Junior 100VDC/200VDC cihazında 100V(volt) altında, 45 dk. süresince yürütüldü. DNA moleküllerinin varlığı, BIO-RAD UV Transilluminator 2000 cihazı ile gözlemlendi ve fotoğraflandı.

2.2.1.6. DNA Fragmentlerinin Saflaştırılması

PCR ürünü Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH CA, USA) kullanılarak jelden temizlendi. Bu işlem için; ilgili DNA fragmenti bir bisturi yardımıyla %1'lik hazırlanan ve 90V altında 40 dk. süresince yürütülen jelden kesildi ve 1,5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Jelden kesilen agaroz parçası tartılarak ağırlığı belirlendi ve üzerine, 1:3 hacimde ADB (Agarose Dissolving Buffer) tampon eklendi (örneğin; 100 mg agaroz jel parçası için 300 µl ADB tampon). Jel parçası tamamen çözülmeye kadar 55 °C'de 8 dk. inkübe edildi. Tamamen erimiş agaroz çözeltisi 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içine alınmış olan pürifikasyon kolonuna (Zymo-Spin™ Column) transfer edildi. 60 sn. 12000g 'deki santrifüjün ardından (Eppendorf Centrifuge 5424) Zymo-Spin™ Column yeni temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 200 µl DNA yıkama tamponu eklenip 30 sn. santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandı ve Zymo-Spin™ Column tekrar yeni temiz bir eppendorfa alınarak kolon matriksine 10 µl DNA elüsyon tamponu eklendi. Kolon, oda sıcaklığında yaklaşık 2 dk. inkübe edildi ve 60 sn.'lik santrifüjün ardından temiz DNA fragmenti sonraki adımda kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

2.2.1.7. Hedef DNA'nın Modifikasyonu

Bir önceki adımda jelden temizlenen DNA molekülleri (*AtNHX1* fragmenti), BamHI restriksiyon endonükleaz ile muamele edildi. Böylece vektöre aktarılacak hedef fragmentin bir ucu küt (blunt), diğer ucu ise BamHI ile kesildiği için yapışkan (sticky) hale getirilmiş oldu. 37°C'de gece boyunca gerçekleştirilen reaksiyon şartları Tablo 4'te belirtildiği gibidir.

Enzim kesimi sonrası *AtNHX1* PCR fragmenti pBI121 vektörü ile ligasyon işlemi için restriksiyon endonükleaz ve diğer bileşenlerden arındırılmak amacıyla, DNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH CA, USA) kullanılarak aşağıda belirtilen şartlara tabi tutulup, direkt ligasyon işleminde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı. 40 µl (5X)

DNA bağlama tamponu ve 20 µl (1X) PCR ürünü bir ependorf tüpün içinde karıştırılarak Karışım Zymo-Spin™ Column'a aktarıldı. 30 sn. santrifüjün ardından tüpte kalan kısım boşaltıldı ve kolona 200 µl DNA yıkama tamponu eklendi. 30 sn. santrifüjün ardından yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandı. Kolonun membran matriksine 10 µl DNA elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1dk.'lık inkübasyon sonrası 1,5 ml yeni temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılan kolon, 30 sn. santrifüj edilerek klonlamada kullanılacak ultra saf PCR ürünü elde edildi.

Tablo 4. BamHI restriksiyon endonükleaz için optimize edilmiş reaksiyon koşulları

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X CUTSMART™ Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
BamHI (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1 µl	U/µl
<i>AtNHX1</i> PCR ürünü (49,78ng/µl)	10 µl	0,5µg/µl
Distile H ₂ O	6,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

2.2.1.8. Klonlama Vektörünün Hazırlanması

Klonlama aracı olarak pBI121 ikili (binary) vektörü (Şekil 2) kullanılmıştır. Vektör *AtNHX1* fragmentinde bulunan restriksiyon endonükleaz enzimi (BamHI) ile uyumlu hale getirilebilmek için önce SacI (New England Biolabs) enzimiyle Tablo 5'te belirtilen şartlarda 37°C'de gece boyunca kesildi.

Ardından ilk adımdan gelen ürün bir PCR tüpüne aktarıldı ve Arctic Thermal Cycler Block 5020 (Thermo SCIENTIFIC) cihazında sırası ile 12 °C'de 15 dk., 75 °C'de 25 dk., 4 °C'de 60 dk. şeklindeki koşullarda, üzerine dNTP mix ve T4 DNA polimeraz (New England Biolabs) eklenerek SacI uç blunt (küt) hale getirildi (Tablo 6).

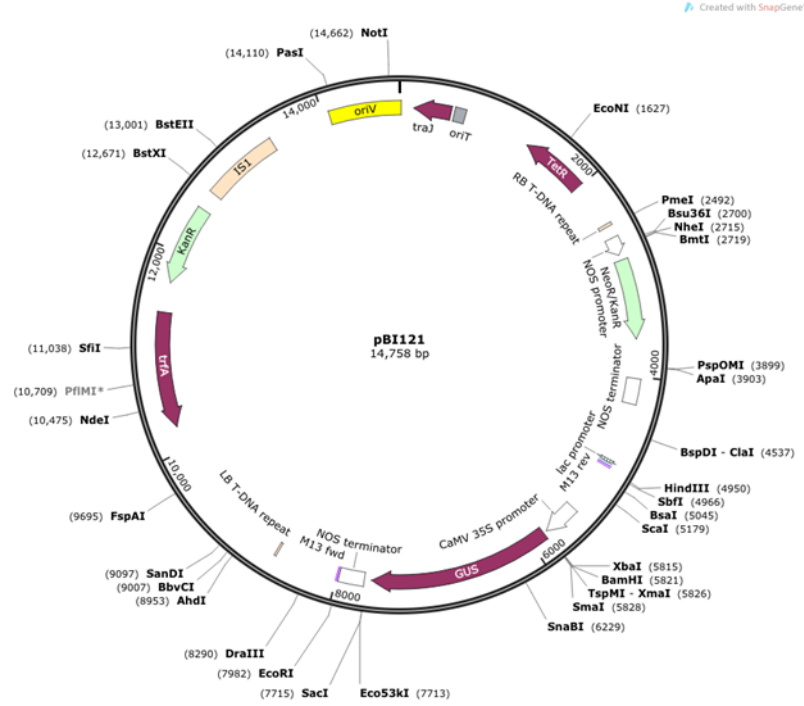
Vektörü ikinci enzimle (BamHI) kesmeden evvel T4 DNA polimeraz reaksiyonu sonrası elde edilen ürün DNA Clean & Concentrator™-5 kullanılarak Tablo 7'de belirtilen koşullarda polimeraz enziminden arındırılmıştır.

Tablo 5. SacI restriksiyon endonükleaz için optimize edilen reaksiyon koşulları

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X CUTSMART™ Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
SacI (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1 µl	U/µl
pBI121 plazmid DNA (532 ng/µl)	15 µl	6-7µg
Distile H ₂ O	1,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Tablo 6. T4 DNA Polimeraz için optimize edilen reaksiyon koşulları

Bileşenler	Son konsantrasyon
(10mM) dNTP mix	0,2 µl (100 µM)
T4 DNA Polimeraz (10U/ µl)	0,5 µl (U/ µg DNA)
Toplam reaksiyon	20 µl



Şekil 3. pBI121 binary (ikili) vektörün şematik gösterimi (GenBank: AF485783.1) (URL-1)

Tablo 7. Vektör DNA'nın saflaştırılması

Bileşenler	Son konsantrasyon
DNA bağlama tamponu	40 µl (2X)
Plazmid DNA	20 µl (X)

Karışım bir ependorf tüpün içinde Zymo-Spin™ Column'a aktarıldı.

30 sn. santrifüjün ardından tüpte kalan kısım boşaltıldı ve kolona 200 µl DNA yıkama tamponu eklendi.

30 sn. santrifüjün ardından yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandı.

Kolonun membran matrisine 10 µl DNA elüsyon tamponu eklendi.

Oda sıcaklığında 1dk.'lik inkübasyonun ardından 1,5 ml yeni temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılan kolon 30 sn. santrifüj edilerek ultra saf vektör DNA'sı elde edildi.

SacI enzimiyle kesilen ve bir ucu T4 DNA polimeraz ile küt yapılan lineer vektör *GUS* (β -Glukuronidaz) geni uzaklaştırılmak üzere, BamHI enzimiyle aşağıda belirtilmiş olan şartlarda 37°C'de gece boyunca tekrar kesildi (Tablo 8).

Kesim ürünü, son konsantrasyon 1X olacak şekilde hesaplanarak, 6X DNA yükleme tamponu (Loading Dye, Thermo SCIENTIFIC) ile (3,5 µl) karıştırıldı ve %1 oranında hazırlanan agaroz jele yüklendi. 100V altında 55 dk. süren elektroforezin ardından, DNA molekülleri UV altında gözlemlendi ve fotoğraflandı. Şekil 2'de gösterildiği üzere vektörün

CaMV 35S promotor *Nos*-terminatör ve *NPT-II (Kan^r)* genlerini kapsayan 12864 bp'lik (baz çifti) fragment (vektör) Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH CA, USA) kullanılarak jelden temizlendi ve ligasyoda kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

Tablo 8. BamHI restriksiyon endonükleaz için optimize edilen reaksiyon koşulları

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X CUTSMART™ Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
BamHI (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1 µl	U/µl
pBI121 plazmid DNA (532 ng/µl)	10 µl	4-5 µg
Distile H ₂ O	6,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

2.2.1.9. Ligasyon Reaksiyonu

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit ile jelden temizlenen vektör ve DNA Clean & Concentrator™-5 ile temizlenen *AtNHX1* PCR ürünü için, konsantrasyon belirleme işlemi NanoDrop ND1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu Tablo 9' da belirtilen koşullarda +4°C'de gece boyu gerçekleştirilmiştir.

$(\text{ng vektör} \times \text{kb fragment}) / \text{kb vektör} \times \text{fragment:vektör molar oranı (3:1)} = \text{ng fragment eşitliği kullanıldı. (1X vektör) pBI121 (12,86kb) 1,92 ng olacak şekilde 15,2 ng/µl olarak hesaplandı. (3X fragment) AtNHX1 (1,63kb) 5,77 ng olacak şekilde 9,7 ng/µl olarak hesaplandı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürün E.coli DH5a competent hücrelerine transfer edildi ve kanamisin içeren (0,05g/L) LB agar besiyerine ekilerek 37°C'de gece boyu inkübe edildi.$

Tablo 9. Ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
10X T4 DNA Ligaz Tampon	1 µl	1X
Vektör DNA (12,86 kb)	1 µl	1,9 ng
Fragment DNA (1,63 kb)	4,6 µl	5,7 ng
Distile H ₂ O	2,4 µl	
T4 DNA Ligaz	1 µl	U/µl
Toplam Reaksiyon	10 µl	

2.2.1.10. Kimyasal *E.coli* Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı ve Transformasyon

2.2.1.10.1. Koloni PCR

İlgili plazmidin kimyasal olarak hazırlanmış *E. coli* kompetent hücrelerine aktarıldığını doğrulamak için *AtNHX1* gen spesifik primerleri 35S-2: 5'-CAAGACCCTTCCTCTATATAAGG-3' ve NHX5 820R: 5'-GAGGATACCGCTCAAGTCG-3' ve kalıp olarak pBI121+*AtNHX1* plazmidi kullanılarak, kanamisin içeren (0.05g/L) LB agar besiyerinden rastgele seçilen 10 adet koloni için PCR yapıldı. PCR sonucu 890 bp ürün veren koloniler pozitif olarak değerlendirildi. Tüm reaksiyon bileşenleri PCR tüplerine aktarıldıktan sonra, DNA kalıbı olarak petrilere kurdan yardımıyla seçilen koloniler kullanıldı. Reaksiyon koşulları Tablo 10 ve 11'de belirtildiği gibidir.

İlgili fragmenti taşıyan plazmidlerin kompetent *E.coli* hücrelerine geçiş yapıp yapmadığının değerlendirilebilmesi için, PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jelle yüklendi ve pozitif koloniler belirlendi.

2.2.1.10.2. Mini Ölçekli Plazmid DNA İzolasyonu

Koloni PCR sonrası beklenen büyüklükte fragment oluşturan 8 koloniden 4'ü plazmid izolasyonunda kullanılmak üzere 0,05 g/L konsantrasyonda kanamisin içeren 3ml LB broth besiyerinde 37⁰C ve 220 rpm rotasyon seviyesindeki kuru sallayıcı inkübatörde (New Brunswick Scientific C25 Incubator/Shaker EDISON NJ, USA) gece boyu büyütüldü. Plazmid izolasyonu standart miniprep prosedürü takip edilerek gerçekleştirildi (Brinboim

HC ve Doly 1979). Gece kültürü 10000xg'de 2 dk. santrifüj edildi (Eppendorf microcentrifuge 2424). Pozitif kolonilerden seçilen 4 plazmidin restriksiyon endonükleazlarla doğrulukları sınıandı. Geni taşıdığı belirlenen plazmid daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Tablo 10. Koloni PCR

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Green GoTaq™ Tampon	5 µl	1X
10 mM dNTP mix	2 µl	0,2 mM her bir dNTP
10 µM Forward Primer	1 µl	0,1–1 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,1–1 µM
Kalıp DNA (pBI121+ <i>AtNHX1</i>)	1 koloni	
GoTaq® DNA Polimeraz (5U/µl)	0,1 µl	1,25U
Distile H ₂ O	15,9 µl	
Toplam Reaksiyon	25 µl	

Tablo 11. Koloni PCR şartları

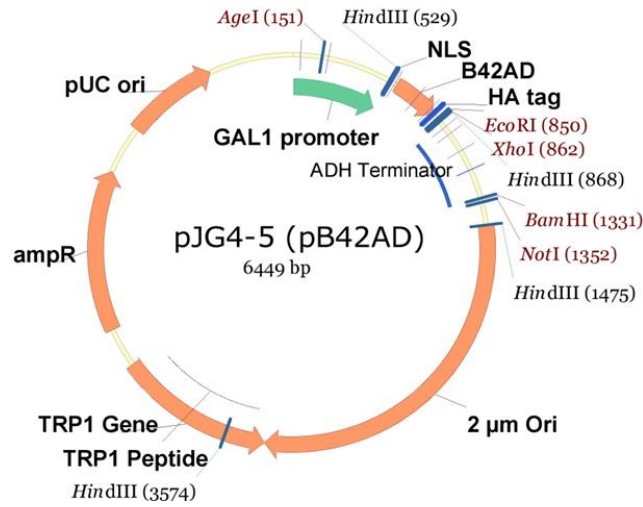
Reaksiyon döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	5 dk. 95 °C
Denatürasyon	30 sn. 95 °C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 56°C (32X)
Uzama	1,10 sn. 72°C
Son uzama	10 dk. 72°C

2.2.2. *SOS-1* Geninin Klonlanması

2.2.2.1. Vektör Modifikasyonu

SOS-1 geninin (3441 bp) (GenBank Erişim No: NM_126259) klonlanması için gerekli optimizasyon çalışmalarında düşük kopya sayısına sahip pBI121 vektörü, yüksek kopya sayısına sahip PJG4-5 maya vektörü kullanılarak modifiye edildi. (Şekil 2 ve 3). Bunun için

PJG4-5 ve PBI121 vektörlerinin her ikisi de, HindIII (New England Biolabs) enzimiyle Tablo 12 ve 13’de belirtilen şartlarda, 37⁰C’de gece boyunca kesildi. PJG4-5 vektöründeki beklenen büyüklükteki kesim ürünü (339 bp fragment) Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH CA, USA) kullanılarak %1’lik agaroz jelden temizlendi (Bkz. DNA fragmentlerinin pürifikasyonu). pBI121 vektörü ise DNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH CA, USA) kiti ile restriksiyon endonükleazlardan arındırıldı (Bkz. Hedef DNA’nın modifikasyonu).



Şekil 4. PJG4-5 vektörünün şematik gösterimi (GenBank: U89961.1) (URL-2).

Tablo 12. pBI121 plazmid DNA’nın HindIII restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X NEB Tampon 2 (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
HindIII (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1 µl	U/µl
pBI121 plazmid DNA	10 µl	30-50 ng/ µl
Distile H ₂ O	6,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Reaksiyonun son bir saatinde vektörün self ligasyonunu önlemek amacıyla reaksiyona 1 µl Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) (NEB) (10000 U/ml) eklenmiştir.

Tablo 13. PJG4-5 plazmid DNA'nın HindIII restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X NEB Tampon 2 (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
HindIII (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,2 µl	U/µl
PJG4-5 plazmid DNA	5 µl	30-50 ng/ µl
Distile H ₂ O	11,1 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Temizlenen pBI121 ikili vektör ve PJG4-5 plazmid DNA HindIII kesim ürünlerinden 339 bp fragment jelden temizlenerek, ligasyonda kullanılacak konsantrasyonlar belirlendi. (Bkz. Önceki ligasyon reaksiyonu). (1X vektör) pBI121 (14,75kb) 0,32 ng olacak şekilde 1,9 ng/µl olarak hesaplandı. (3X fragment) PJG4-5 (0.34kb) 0,96 ng olacak şekilde 4 ng/µl olarak hesaplandı ve vektör/fragment oranı 1/8 µl olarak alındı (Tablo 14).

Tablo 14. pBI121 binary vektör ve PJG4-5 plazmid DNA'nın ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
10X T4 DNA Ligaz Tampon	1µl	1X
Vektör DNA (14.75 kb)	8 µl	0,2 ng
Fragment DNA (0.34 kb)	1 µl	8,4 ng
T4 DNA Ligaz	0,3 µl	U/ µl
Toplam Reaksiyon	10 µl	

Reaksiyon sonrası elde edilen yeni vektör (pBI121+PJG4-5 339 bp) *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine transfer edildi ve kanamisin içeren (0.05g/L) LB agar besiyerine ekilerek 37⁰C'deki etüvde (Fisher Scientific Isotemp Incubator) gece boyu inkübe edildi.

Ertesi gün koloniler arasından rastgele seçilen 9 koloni içinden, yeni plazmidi taşıyan *E. coli* kolonilerinin belirlenebilmesi için; Forward primer olarak Gyp Upstream 5'-GAATGTCGCCCTTTTGTCTTTG-3' ve Reverse Primer olarak 35S-415-R 5'-AGTGTGTCGTGCTCCACCATGT-3' primerleri kullanılarak 1051bp fragment çoğaltıldı (Tablo 15 ve 16). PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve pozitif koloniler belirlendi.

Tablo 15. pBI121+ PJG4-5 339 bp vektörü için optimize edilmiş koloni PCR

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Green GoTaq™ Tampon	5 µl	1X
10 mM dNTP mix	2 µl	0,2 mM her bir dNTP
10 µM Forward Primer	1 µl	0,1–1 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,1–1 µM
Kalıp DNA (pBI121+PJG4-5 339 bp)	1 koloni	
GoTaq® DNA Polimeraz (5U/µl)	0,1 µl	1,25U
Nükleazlardan arındırılmış H ₂ O	15,9 µl	
Toplam Reaksiyon	25 µl	

Tablo 16. pBI121+ PJG4-5 339 bp vektörü için koloni PCR koşulları

Reaksiyon Döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	5 dk. 95°C
Denatürasyon	30 sn. 95°C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 56°C (32X)
Uzama	1 dk. 72°C
Son uzama	10 dk. 72°C

PCR sonrası pozitif olarak belirlenen koloniler kürdan yardımıyla 3 ml LB Broth besiyerine ekildi ve 37°C'de kuru sallayıcıda gece boyu inkübe edildi. Mini prep. plazmid izolasyonu sonrası elde edilen vektör DNA (pBI121+ PJG4-5 339bp) kontrol amaçlı önce EcoRI restriksiyon endonükleaz ile kesilerek test edildi (Tablo 17) ve 2998bp'lik fragment %1'lik hazırlanan jelde UV altında gözlenerek doğrulandı. Doğrulan vektör XbaI ve SacI

restriksiyon enzimleri ile kesilerek vektörden *GUS* geni çıkarıldı. Reaksiyon Tablo 18’de belirtildiği gibidir. *GUS* geni vektörden çıkarıldıktan sonra vektörün geriye kalan kısmı jelden kesilerek temizlendi (Bkz. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit protokol). Bu şekilde modifikasyonu tamamlanan vektör, *SOS-1* geni ile ligasyon reaksiyonuna hazır hale getirildi.

Tablo 17. pBI121+PJG4-5 339bp vektörünün EcoRI restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
(10X) EcoRI Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
EcoRI (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1 µl	U/µl
pBI121+ PJG4-5 339bp (352 ng/µl)	17 µl	6-7µg
Distile H ₂ O	1,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

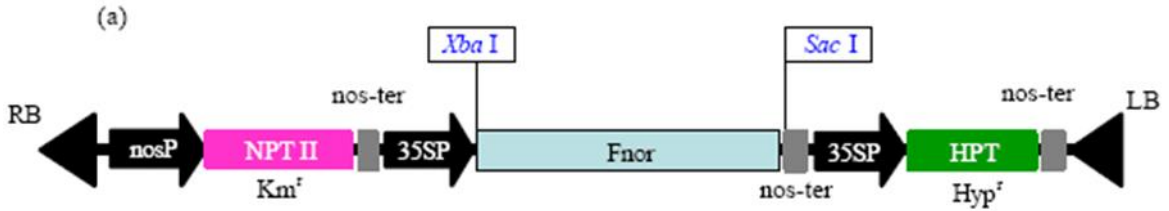
Tablo 18. pBI121+ PJG4-5 339bp vektörünün XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X CUTSMART™ Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
XbaI ve SacI (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1’er µl	U/µl
pBI121+ PJG4-5 339bp (352 ng/µl)	10 µl	5-6 µg
Distile H ₂ O	6,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

2.2.2.2. *SOS-1* Geninin Modifikasyonu

SOS-1 genini taşıyan pIG121-Hm vektör (Şekil 4) Texas Tech Üniversitesi Kimya Bölümü’nden Dr. Huazong Shi tarafından temin edildi. XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri

ile Tablo 19’da belirtilen şartlarda vektörden kesilen fragment jelden temizlenerek (Bkz. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit protokol) modifiye pBI121+ PJG4-5 339bp vektörü ile ligasyona hazır hale getirildi.



Şekil 5. *SOS-1* genini taşıyan pIG121-Hm vektörün şematik gösterimi (*SOS-1* geni *Xba*I ve *Sac*I enzim kesim bölgeleri arasında yer alır) (Ohta vd., 2002).

Tablo 19. pIG121-Hm vektörün *Xba*I ve *Sac*I çifte restriksiyon endonükleaz kesimi

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X CUTSMART™ Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
<i>Xba</i> I ve <i>Sac</i> I (New England Biolabs, Inc.) (10U/µl)	0,1'er µl	U/µl
pBI121+ PJG4-5 339bp (460 ng/µl)	10 µl	4-5µg
Distile H ₂ O	6,9 µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Ardından aynı restriksiyon endonükleazlarla (*Xba*I ve *Sac*I) kesilen modifiye vektör ve *SOS-1* fragmenti ligaz enzimiyle muamele edildi ve reaksiyon +4⁰C'ye kaldırıldı. (1X vektör) pBI121+PJG4-5 339bp (13,19 kb) 65,7 ng/µl olarak hesaplandı. (3X fragment) *SOS-1* (0,34kb) 14,8 ng/µl olarak hesaplandı ve vektör/fragment oranı =1/3 µl olarak alındı (Tablo 20).

Tablo 20. pBI121+PJG4-5 339bp ve *SOS-I* DNA fragmenti için ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
10X T4 DNA Ligaz Tampon	1µl	1X
pBI121+ PJG4-5 339bp	1 µl	0.2 ng
<i>SOS-I</i> DNA fragmenti	3 µl	8,4 ng
T4 DNA Ligaz	0,3 µl	U/µl
Toplam Reaksiyon	10 µl	

Reaksiyon sonrası elde edilen *SOS-I* genini taşıyan yeni vektör (pBI121+PJG4-5 339bp+*SOS-I*) *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine transfer edildi ve kanamisin içeren (0.05g/L) LB agar besiyerine ekilerek 37⁰C'deki etüvde (Fisher Scientific Isotemp Incubator) gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün koloniler arasından rastgele seçilen 12 koloni içinden yeni plazmidi taşıyan *E.coli* kolonilerinin belirlenebilmesi için FW primer olarak 35S-2: 5'-CAAGACCCTTCCTCTATATAAGG-3' ve Reverse Primer olarak *SOS-I*-542R: 5'-TTAGCAAAGCAACAACAGCAACC-3' primerleri kullanılarak p121*SOS-I* vektörü üzerindeki 603bp'lik fragment çoğaltıldı (Tablo 21 ve 22). PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve pozitif koloniler belirlendi.

Tablo 21. *SOS-I* geni için optimize edilmiş koloni PCR

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Green GoTaq™ Tampon	5 µl	1X
10 mM dNTP mix	2 µl	0,2mM her bir dNTP
10 µM Forward Primer	1 µl	0.1–1 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0.1–1 µM
Kalıp DNA	1 koloni	
GoTaq® DNA Polimeraz (5U/µl)	0,1 µl	1,25U
Nükleazlardan arındırılmış H ₂ O	15,9 µl	
Toplam Reaksiyon	25 µl	

Tablo 22. *SOS-1* geni için optimize edilmiş koloni PCR koşulları

Reaksiyon Döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	5 dk. 95°C
Denatürasyon	30 sn. 95°C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 56°C (32X)
Uzama	1 dk. 72°C
Son uzama	10 dk. 72°C

Koloni PCR sonrası pozitif olarak belirlenen koloniler arasından rastgele seçilen 7. 10. ve 11. koloniler kürdan yardımıyla kanamisin içeren (0,05g/L) 3 ml LB Broth besiyerine ekildi ve 37°C'de kuru sallayıcıda gece boyu inkübe edildi.

Mini ölçekli plazmid izolasyonu sonrası elde edilen vektör DNA (pBI121+PJG4-5 339bp+SOS-1) genin vektörde olduğunu doğrulamak adına kontrol amaçlı EcoRI restriksiyon endonükleaz ile 4 saat süresince 37°C'de (Fisher Scientific Isotemp su banyosu) kesilerek test edildi (Tablo 23) ve 12148bp 2661bp 1042bp ve 778bp'lik (jel fazla yürüdüğünden, 778bp fragment şekilde fark edilmiyor) fragmentler %1'lik hazırlanan jelde UV altında gözlenerek doğrulandı.

Tablo 23. pBI121+PJG4-5 339bp+SOS-1 vektör DNA'nın EcoRI restriksiyon endonükleaz ile reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X Concantrate EcoRI Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
EcoRI (New England Biolabs, Inc.) (20.000U/ml)	0.1	U/µl
(pBI121+ PJG4-5 339bp+SOS-1)	17 µl	5-6 µg
Toplam Reaksiyon	20 µl	

2.2.3. *AtNHX1*+*SOS-1* Gen Kasetinin Aynı Vektöre Yerleştirilmesi

SOS-1 geninin vektörde olduğunun doğrulanmasının ardından, pozitif kolonilerden biri (7. klon) seçilerek 50 ml hacimde, *AtNHX1* genini taşıdığı bilinen klonlardan biri de 15 ml (0.05g/L) kanamisin içeren LB Broth besiyerinde büyütülmek üzere gece kültürü hazırlandı ve 37°C'de kuru sallayıcıda gece boyu inkübe edildi. Plazmid izolasyonu Zyppe™ Plazmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH CA, USA) kullanılarak ticari firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Son aşamada kombine edilen her iki plazmid 40'ar µl hacimde TE/RNase kullanılarak (10 mM Tris/HCl pH 8 ve 1 mM EDTA pH 8) 37°C'de 2 saat süre ile RNA degerede edildi.

Genleri aynı vektöre yerleştirebilmek için *AtNHX1* genini bulduran pBI121 ve *SOS-1* genini bulduran pBI121+PJG4-5 vektörü EcoRI ile Tablo 24'te belirtilen şartlarda kesilerek %1'lik hazırlanan agaroz jelde UV altında görüntülendi ve Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit kullanılarak jelden temizlendi ve ligasyona hazır hale getirildi. *SOS-1* geni içerisinde iki adet EcoRI restriksiyon endonükleaz bölgesi bulunduğu için kısmi kesim yapılarak (Tablo 25), 35S promotor *SOS-1* geni ve NOS terminatorünün bulunduğu 4864bp'lik kaset elde edildi.

Tablo 24. pBI121+*AtNHX1* plazmid DNA'nın EcoRI enzimiyle kesim reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X Concantrate EcoRI Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
EcoRI (New England Biolabs, Inc.) (20.000U/ml)	0,1 µl	U/µl
pBI121+ <i>AtNHX1</i> plazmid DNA	17 µl	30-50 ng/ µl
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Reaksiyonun son bir saatinde vektörün self ligasyonunu önlemek amacıyla reaksiyona 1 µl Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) (NEB) (10000 U/ml) eklenmiştir.

Tablo 25. pBI121+PJG4-5 339bp+SOS-1 plazmid DNA'nın EcoRI enzimiyle kısmi kesim reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
10X Concantrate EcoRI Tampon (New England Biolabs, Inc.)	2 µl	1X
BSA (20X) (New England Biolabs, Inc.)	1 µl	1X
EcoRI (New England Biolabs, Inc.) (20.000U/ml)	0,1 µl	U/µl
pBI121+ PJG4-5 339bp+SOS-1 plazmid DNA	17 µl	6-7µg
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Her iki ürün de Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit yardımıyla jelden temizlenerek ligasyona hazır hale getirildi. (1X vektör) pBI121+*AtNHX1* (14.475 kb) 27,36 ng olacak şekilde 18,96 ng/µl olarak hesaplandı. (3X fragment) *SOS-1* (4.86 kb) 18,36 ng olacak şekilde 6,9 ng/µl olarak hesaplandı. Vektör/fragment oranı 2,88/5,32 µl olarak alındı (Tablo 26).

Tablo 26. *AtNHX1* ve *SOS-1* fragmetlerinin ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son konsantrasyon
10X T4 DNA Ligaz Tampon	1µl	1X
pBI121+ <i>AtNHX1</i>	2,88 µl	27,36ng
<i>SOS-1</i> DNA fragment	5,32 µl	18,36 ng
T4 DNA Ligaz	0,3 µl	U/µl
Distile H ₂ O	0,5 µl	
Toplam Reaksiyon	10 µl	

Reaksiyon sonrası elde edilen *SOS-1* genini taşıyan yeni vektör (pBI121+*AtNHX1*+PJG4-5 339bp+SOS-1) *E.coli* DH5α competent hücrelerine transfer edildi ve kanamisin içeren (0.05g/L) LB agar besiyerine ekilerek 37 °C'deki etüvde (Fisher Scientific Isotemp Incubator) gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün koloniler arasından rastgele seçilen 9 koloni içinden, yeni plazmidi taşıyan *E.coli* kolonilerinin belirlenebilmesi için, Forward primer olarak *NHX3* 5'-CGACTTGAGCGGTATCCTC-3' ve Reverse Primer

olarak 35S-415-R:5'-AGTGTGTCGTGCTCCACCATGT primerleri kullanılarak pBI121 *AtNHX1+SOS-1* vektörü üzerindeki 1579 bp'lik fragment çoğaltıldı (Tablo 27 ve 28). PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve pozitif koloniler belirlendi.

Tablo 27. Final vektör (pBI121+*AtNHX1+SOS-1*)'de koloni PCR koşulları

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Green GoTaq™ Tampon	5 µl	1X
10 mM dNTP mix	2 µl	0,2 mM her bir dNTP
10 µM Forward Primer	1 µl	0,1–1 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,1–1 µM
Kalıp DNA	1 koloni	
GoTaq® DNA Polimeraz(5U/µl)	0,1 µl	1,25 U
Distile H ₂ O	15,9 µl	
Toplam Reaksiyon	25 µl	

Tablo 28. Final vektörde (pBI121+*AtNHX1+SOS-1*) koloni PCR şartları

Reaksiyon Döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	5 dk. 95°C
Denatürasyon	30 sn. 95°C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 56°C (32X)
Uzama	1 dk. 40 sn. 72°C
Son uzama	10 dk. 72°C

Koloni PCR sonrası pozitif olarak belirlenen koloniler arasından rastgele seçilen bir koloni (2.), kürdan yardımıyla kanamisin içeren (0.05g/L) 3 ml LB Broth besiyerine ekildi ve 37 °C'de kuru sallayıcıda gece boyu inkübe edildi.

Mini prep plazmid izolasyonu sonrası elde edilen vektör DNA (pBI121+*AtNHX1+SOS-1*) her iki genin de vektörde olduğunu doğrulamak adına, kontrol amaçlı XhoI, EcoRI, Sall ve HindIII restriksiyon endonükleazlar ile 6 saat suresince 37°C'de (Fisher Scientific Isotemp Water Bath) kesilerek test edildi ve fragmentler %1'lik hazırlanan jelde UV altında gözlenerek doğrulandı.

2.2.4. Transformasyon Çalışmaları

2.2.4.1. *Agrobacterium tumefaciens* Kompetent Hücre Hazırlanışı

Agrobacterium tumefaciens'in GV3101 suşu -80°C 'den çıkarılarak son konsantrasyonları 0,05 g/L rifampisin, 0,025 mg/L gentamisin olan antibiyotikleri içeren LB petrilere kürdan yardımıyla çizgi ekim yapıldı ve 28°C 'de 2 gün inkübasyondan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye aktarıldı. Bu petriden seçilen tek bir koloni, yine aynı antibiyotikleri içeren (rifampisin gentamisin ve kanamisin) LB Broth'a (5ml) ekilerek gece boyu 30°C 'de inkübe edildi. Ertesi gün kültürün 2 ml'si hiçbir antibiyotik içermeyen 30 ml'lik LB sıvı besiyerine transfer edildi. Kültürün optik yoğunluğunun (OD) 0,5-1,0 arasında olduğundan emin olunana kadar 30°C 'de inkübe edilen kültür, 5-15 dk. kadar buzda bekletildikten sonra, 15'er ml'lik 2 adet falkon tüpe bölünerek, $3000g$ $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1X 10ml 20 mM soğuk CaCl_2 eklendikten sonra kısa bir vorteksin (Fisher Vortex Genie 2TM) ardından, tekrar aynı şartlarda 5 dk. santrifüj yapıldı. Pipetleme ile süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, bu kez hücrelere 1ml soğuk CaCl_2 eklendi ve pipet yardımıyla resüspanse edilen hücreler, 0.1 ml'lik hacimler halinde ependorf tüplere aktarılarak, transformasyonda kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı.

2.2.4.2. Vektör DNA'nın *Agrobacterium tumefaciens*'e Transformasyonu

Miniprep plazmid izolasyonu sonrası elde edilen ilgili vektör DNA (pBI121+*AtNHX1*+*SOS-1*) 0,1- 1,0 μg ($>100\text{ng}$ plazmid) olacak şekilde -80°C 'den çıkarılan *Agrobacterium* kompetent hücrelerine aktarıldı. Ardından hücreler 5 dk. sıvı azotta bekletildi ve hemen sonraki 5 dk. da 37°C 'de inkübe edildi. Hücrelere 800 μl LB Broth eklenerek 30°C kuru sallayıcıda (New Brunswick Scientific C25 Incubator Shaker EDISON, NJ-USA) 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin ardından suştan alınan 200'er μl , konsantrasyonları 0,05 g/L rifampisin ve 0,025 mg/L gentamisin olan antibiyotikleri içeren LB agar petrilere (1 kontrol ve 1 örnek petrisi) inoküle edildi. Rotasyon ile tüm petriye yayılan suş bir süre laminar flow kabinde (Esco) kuruması beklendikten sonra 30°C 'de 2 gün boyunca inkübe edildi ve ardından bitkilere transformasyonda kullanılmak üzere parafilmle kapalı $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

2.2.4.3. Transformasyonda Kullanılan *Arabidopsis* Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Transformasyon için gerekli olan *Arabidopsis* bitkileri 4'' (100MM) ebatlarındaki saksılarda (Kord Products, Toronto) Sunshine LC1 mix 2.8 cu ft (79L) Professional growing mix (70-80% Canadian Sphagnum peat moss perlite and dolomitic limestone) kullanılarak çiçeklenme safhasına kadar yetiştirildi. Tohum oluşturma safhasına kadar bitkiler yaşam döngüleri süresince en çok 2-3 kez olmak kaydıyla fertilizasyon uyarıcı (Miracler-Gro LJ612 Garden Feeder) ile karıştırılmış distile su ile sulandı. Bu esnada yaprakların bu çözeltiyle muamele olmasından kaçınılarak, dipten sulama yapıldı.

2.2.4.4. *Arabidopsis* Transformasyonu

İlgili kaseti taşıyan CV3101 *Agrobacterium* transformantlarından alınan tek bir koloni, konsantrasyonları 0,05 g/L rifampisin ve kanamisin ile 0,025 mg/L gentamisin olan antibiyotikleri içeren 10 ml LB sıvı besiyerine ekildi ve 30°C kuru sallayıcıda gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün gece kültürünün optik yoğunluğu 0,6 nm civarı ölçülerek (Thermo Scientific GENESYS 10S UV Vis Spectrophotometer) bunun 8 ml'si 400 ml ve aynı son konsantrasyonda üç antibiyotiği içeren LB Broth besiyerine inoküle edildi ve 6000 rpm'de 10 dk. 20°C'de (veya oda sıcaklığı da kullanılabilir) santrifüj edildi (Sorvall™ RC6, Thermo Scientific). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra transformasyon solüsyonu direkt pellete aktarıldı.

İnfiltrasyon solüsyonu için %5 sukroz ve %20 surfaktant (VAC-IN –STUFF Silwet L-77) kullanıldı. 300 ml distile suya, 15 gram sukroz eklenip karıştırıldı. Ardından bu çözeltiye 60 µl surfaktant eklendi. Pelletlere bu solüsyondan 1'er ml eklendi ve pipet yardımıyla çözülmeleri sağlandı. Daha sonra, süspansen edilen pelletler 300 ml'lik transformasyon solüsyonuna boşaltıldı ve bu solüsyona 50 ml distile su ve 2,5 g daha sukroz eklenerek çözelti iyice karıştırıldı. Beherdeki bu çözelti vakum pompasının (WELCH 25468-01 INSUL Class B, Denver Product) içine yerleştirildi (Şekil 5). Ters çevrilmiş ve çiçekleri taşıyan tüm gövde çözeltiye batırılmış şekilde bitkiler 10-15 cm Hg basınç altında 3 dk. süresince vakumlandı. Daha sonra T0 neslini verecek bu bitkiler iki saksı (üç de olabilir) halinde yanyana konularak, transformasyonun etkinliğini arttırmak amacıyla streç filmle iyice sarıldı ve oda sıcaklığında gece boyu bekletildi (karanlık veya aydınlık fark yaratmaz) (Clough and Bent, 1998) (Şekil 5). Ertesi gün streç film bir miktar aralandı ve bitkiler 22°C'de 16 saat ışık (120 µmol m⁻²sn⁻¹) 8 saat karanlık döngüde ayarlı bitki büyütme

kabinetine aktarıldı ve T0 tohumlarının oluşma safhasına kadar (yaşam döngüsü yaklaşık 2,5 ay) burada muhafaza edildi.

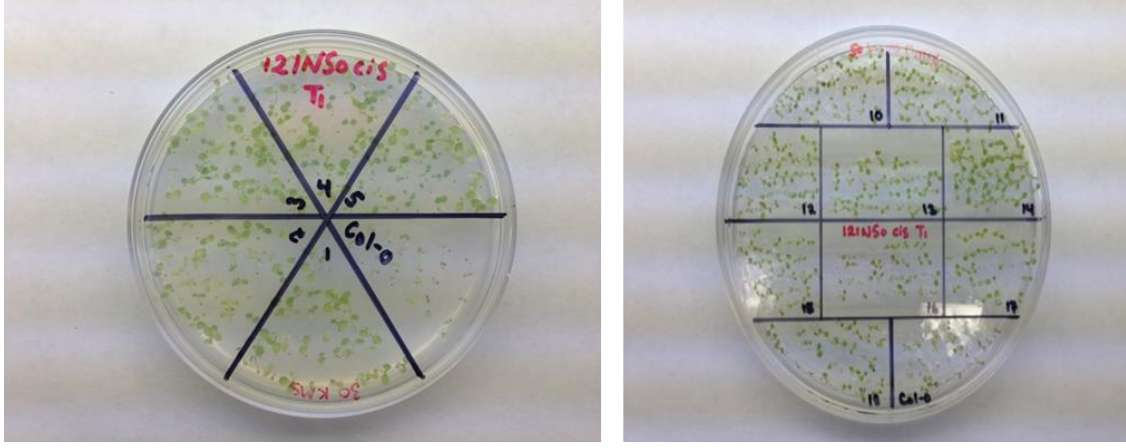


Şekil 6. *Arabidopsis* transformasyonu. İnfiltrasyon solüsyonu içerisinde gösterilmiş *Arabidopsis* bitkileri (solda). Transformasyondan 8 hafta sonra, T0 tohumlarını verecek bitkiler (sağda).

2.2.5. Segregasyon Analizi

T0 nesline ait tohumlar son konsantrasyon 30 mg/ml kanamisin ve 50 mg/ml sefotaksim antibiyotiklerini içeren $\frac{1}{2}$ xMS agar besiyerinde yaklaşık 10 gün süreyle büyütüldü ve antibiyotikler varlığında gerçek yaprak oluşturabilen (true leaves) ve yeşil kalabilen T1 bitkileri, her biri bireysel olarak numaralandırılıp toprağa transfer edildi. Daha önce bahsedilen koşullarda bitki kabinetinde yaşam döngülerini tamamlayana kadar yetiştirilen bu T1 bitkilerinden (yaklaşık 100 farklı bitki) toplanan T1 tohumları 3:1 Mendel segregasyon oranını verip vermemeleri (heterozigotluk) bakımından tarandı. Bu aşamada her bir bitki için bu kez yalnızca kanamisin içeren (son konsantrasyon 30 mg/ml) $\frac{1}{2}$ xMS kanamisinli agar petrilere yaklaşık 70'er tohum ekilerek seleksiyon yapıldı (Şekil 6). Bahsedilen oranı gösteren ve trans genleri tek kopya halinde taşıdığı düşünülen farklı T2 hatları seçilerek (örneğin 51, 62, 85..) T2 tohumlarını oluşturmak üzere toprağa transfer edildi. Yaşam döngüsü tamamlanan T2 bitkilerinden toplanan T2 tohumları (51-1, 51-2, 51-3..... ; 62-1, 62-2, 62-3.....; 85-1, 85-2, 85-3..... 85-10 gibi) bu defa homozigotluk bakımından taramak üzere, yukarıda bahsedilen konsantrasyonda kanamisin içeren $\frac{1}{2}$ xMS kanamisinli agar petrilere, hat başına 100 veya üzeri tohum olacak şekilde yerleştirilerek test edildi. Bu aşamada bitkilerin tamamı yeşil kalan ve gerçek yaprak oluşturabilen hatlar,

transgenik hatlar olarak değerlendirildi ve sonraki adımlarda kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 7. T1 nesline ait segregasyon analizi. 30 mg/ml kanamisin (solda) ve 50 mg/ml fitajel (sağda) içeren 1/2xMS agar petri tabakalarında yer alan *Arabidopsis* hatları.

2.2.6. *AtNHX1* ve *SOS-1* Genlerinin Ekspresyon Analizleri

2.2.6.1. Olası Transgeniklerden RNA İzolasyonu

Segregasyon analizi sonrası transgenik olduğu tespit edilen hatlardan, 8 ile 10 gün süresince 1/2xMS petri tabakalarında büyütülen bitkiler ve daha önce belirtilen metod kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Aynı zamanda, tohumlar sterilize edildikten sonra yaklaşık 10 gün boyunca sıvı 1/2xMS besiyeri bulunduran erlenlerde yetiştirildi. Bu sürecin ardından tuz stresi oluşturmak için bitkilere son konsantrasyon 150 mM olacak şekilde steril NaCl solüsyonu eklendi. Kontrol bitkilerine ise; aynı oranda sadece H₂O ilave edildi ve büyüme 2 gün daha devam ettirildi. İzolasyon sonrası örnek RNA'ların saflık ve konsantrasyonu NanoDrop ND1000 Spektrofotometre cihazı ile 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk ölçülerek belirlendi.

2.2.6.2. Northern Blot Analizi

2.2.6.2.1. Örneklerin Normalizasyonu ve Denatürasyonu

RNA/DEPC H₂O karışımı örnekler son konsantrasyon 10 µg/µl olacak şekilde normalize edilerek hazırlandı. Ardından aşağıda verilen oranlarda hazırlanan pre-mix (15µl) (Tablo 29) örneklerle ilave edilerek tüpler vortekslenildi ve 60°C su banyosunda 15 dk.

süresince denatürasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüplere son konsantrasyon 1X olacak şekilde 6X Formaldehid yükleme tamponu (5 µl) eklenerek, numuneler jele yüklenmeye hazır hale getirildi.

Tablo 29. Örneklerin normalizasyonu için gerekli bileşenler

Bileşenler	Miktar (µl)
10X MOPS	5
%37 Formaldehid	8
Formamid	25

Yukarıdaki bileşenler ile hazırlanan Pre-mix (1 örnek için) kullanım aşamasına kadar ve kullanım sonrası -20°C'de muhafaza edilir. 12 µl RNA/DEPC H₂O karışımına 10 µl yükleme tamponu ve 15 µl Pre-mix ilave edilerek, formaldehid agaroz jele yüklenecek RNA miktarı hazırlanır.

Örnekler, aşağıdaki oranlar takip edilerek hazırlanan formaldehid agaroz jele (agaroz 1,2 g, DEPC H₂O 87 ml, 10X MOPS 10 ml ve %37 formaldehid 3 ml/toplam hacim 100 ml) yüklenerek, elektroforez tamponu (522 ml DEPC-H₂O, 18 ml 37% Formaldehid, 60 ml 10X MOPS /toplam hacim 600 ml) içerisinde 100V altında 3 saat süresince yürütüldü. (1L 10X MOPS hazırlamak için; 41,8 g (0,4 M) MOPS, 800 ml DEPC H₂O ya eklendikten sonra NaOH ile pH.7'ye ayarlandı. Ardından bu çözeltiliye 16,6 ml (0,1 M) NaOAC (DEPC H₂O) ve 2 ml (10 mM) EDTA (DEPC H₂O) (pH.8) eklenerek son hacim DEPC H₂O ile 1 L'ye tamamlanıp otoklavlanarak kullanıldı. DEPC (Dietilpirokarbonat) ile hazırlanan su; 1 ml DEPC ile 999 ml ddH₂O'nun muamele edilmesi ve gece boyu oda sıcaklığında bar yardımıyla karıştırılıp ardından otoklavlanması sonucu elde edildi).

2.2.6.2.2. Formaldehid Jelin Membrana Transferi

Elektroforez esnasında 2 adet 9x10cm ve 1 adet 35x15 cm oranında kesilen selüloz kromatografi kâğıdı (Fisherbrand™ Pure Cellulose Chromatography Paper-Thickness 0,35 mm Cat No: 05-714-4), 9,5x10,5 cm oranında kesilen membran (*GE Healthcare Amersham™ Hybond™ -XL Membranes*), ve 8,8x9,8 cm oranında kesilen 7 cm yüksekliğinde peçeteler hazırlandı. Metal dikdörtgen bir kaba 500 ml 20X SSC (1 L salin sodyum sitrat (SSC) stok solüsyonu için; 175,3 g (3M) NaCl ve 88,2 g (0,3M) NaSitrat DEPC H₂O ile hazırlanarak otoklavlandıktan sonra kullanıldı.) kabın üzerine de uygun

ebatlarda bir cam destek yerleştirildi. Elektroforez tamamlandıktan sonra büyük ve küçük kromatografi kağıdı önce DEPC H₂O ile, daha sonra da transfer tamponu ile muamele edildi ve bunlar sırası ile cam desteğin üzerine yerleştirildi. Ardından jel, üst yüzü alta (kromatografi kağıdına) gelecek şekilde cam destek üzerine bırakıldı. Jelin üzerine uygun ebatlarda kesilen pozitif yüklü naylon membranı, mebranın üzerine 1 adet küçük kromatografi kağıdı ve en az 7 cm yüksekliğinde peçeteler yerleştirildi. Tüm bu adımlar sırasında katmanlar arasında oluşabilecek olası hava kabarcıkları bir cam pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Son olarak düzeneğin üzerine yaklaşık 1 kg'lık bir ağırlık konularak transferin gece boyu (en az 16 saat) sürmesi sağlandı. Transferin ardından düzenek dikkatlice bozuldu ve membran bir pens yardımıyla alınarak UV crosslinker (Fisher Scientific FB-UVXL-1000) içerisine yerleştirildi, 2 kez optimum sürede crosslink sonrası RNA örnekleri membrana sabitlenmiş oldu. Ardından membran laminar flow kabinde yaklaşık yarım saat kurumaya bırakıldı ve hibridizasyonda kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.2.6.2.3. Prob Hazırlama, Hibridizasyon ve Gen İfadesinin Belirlenmesi

AtNHX1, *SOS-1* ve *Aktin* olmak üzere 3 ayrı prob ile hibridizasyon yapıldı. Gen spesifik problemleri hazırlamak üzere *AtNHX1* geni için 1445 bp uzunluğundaki fragmenti elde etmek amaçlı Forward primer olarak *NHX165 FW 5' -TGATTGGGCTAGGCACTG-3'* Revers primer olarak ise; *NHX7 RW 5'- AAGATCAGGAGGGTTTCTCTC-3'* primerleri dizayn edildi. *SOS-1* geni için ise; 1959 bp uzunluğundaki fragmenti elde etmek üzere Forward primer olarak *SOS-1-842-FW 5'- GGGCTTCTGGTGTGTTTTGACG-3'* Revers primer olarak ise; *SOS-1-2881-RW 5'-CGTTAGAAGGTGATAATGCGGC-3'* baz dizisine sahip primer çifti dizayn edildi. *Aktin* internal kontrol geni için ise; 502 bp uzunluğundaki fragmenti çoğaltacak olan *Act-Forward 5'- TCACCACAACAGCAGAGCGGG-3'* ve *Act-Reverse 5'-GGACCTGCCTCATCATACTCGG-3'* primerleri kullanıldı. *SOS-1* ve *AtNHX1* fragmentlerini çoğaltmak için *SOS-1* ve *AtNHX1* genlerinin aktarıldığı vektör (pBI121+*AtNHX1*+*SOS-1*) PCR'da kalıp DNA olarak kullanıldı. *Aktin* geni ise PCR ile cDNA kütüphanesi üzerinden çoğaltıldı. Reaksiyon şartları Tablo 30 ve 31'de belirtildiği gibidir.

Tablo 30. *AtNHX1*, *SOS-1* ve *Aktin* gen problemlerinde kullanılacak DNA'nın amplifikasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Green GoTaq™ Tampon	2 µl	1X
10 mM dNTP mix (2,5 mM her birinden)	1,6 µl	0,2 mM her bir dNTP
10 µM Forward Primer	1 µl	0,1–1 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,1–1 µM
Kalıp DNA	1 µl	
GoTaq® DNA Polimeraz (5U/µl)	0,1 µl	1,25 U
Nükleazlardan arındırılmış H ₂ O	13,3µl	
Toplam Reaksiyon	20 µl	

Tablo 31. *AtNHX1*, *SOS-1* ve *Aktin* gen problemlerinde kullanılacak DNA'nın amplifikasyon şartları

Reaksiyon Döngüleri	Koşullar
İlk denatürasyon	2 dk. 95 °C
Denatürasyon	30 sn. 95 °C
Primerlerin bağlanması	30 sn. 56°C (35X)
Uzama	*1 dk. 40sn. 72°C
Son uzama	10 dk. 72°C

**AtNHX1* amplifikasyon reaksiyonunda 1 dk. 40 sn. olarak belirlenen uzama süresi *SOS-1* amplifikasyonu için 2 dk.'ya çıkarılmış, *Aktin* geni için ise 1 dk.'ya indirilmiştir.

Reaksiyon sonrası elde edilen PCR ürünleri %1 'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve elektroforezin ardından UV altında gözlemlendikten sonra jelden kesilerek temizlendi (Bkz. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit protokol). Temizlenen RNA ürünlerinin konsantrasyonu, Northern hibridizasyonu esnasında prob etiketleme reaksiyonunda kullanılmak üzere, NanoDrop ND1000 Spektrofotometre cihazı ile belirlendi ve bu ürünler direkt prob DNA olarak kullanılmak üzere etiketlenip +4°C'ye kaldırıldı. Prob işaretleme aşağıda Tablo 32'de belirtilen şartlarda AMBION DECAprime™ II DNA Labeling Kit (Cat No: AM1455) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 32. Prob işaretleme reaksiyonu

Bileşenler	(μ l)
Prob DNA (50ng Kalıp DNA)+DEPC H ₂ O	23
10X Decamer (Random Primers)	5
-dATP	10
*dATP (α^{32} P)	10
Klenow fragmenti	2
Toplam Hacim	50

Reaksiyon, 37°C su banyosunda 20 dk. inkübe edildikten sonra kısa bir santrifüj yapılmış ve üzerine 150 μ l TE tamponu eklenerek son hacim 200 μ l olacak şekilde hazırlanmıştır. * Radyoaktif işaretli bazı gösterir.

Ardından 3 ml'lik şırınga içerisine bir miktar Glass Wool (20411 SUPELCO-Sigma Aldrich) cam pipet yardımıyla yerleştirildi ve bu şırınga, 15 ml'lik konik santrifüj tüp içerisine (Fisherbrand™ 15mL Graduated Polystyrene Centrifuge Tube with conical bottom) aktarıldı. 15 ml'lik konik tüp, içerisine 2 ml Sephadex G-25 eklenerek 20°C 1800 rpm'de 3 dk. santrifüj edilip filtrasyona hazır hale getirildi. Ardından son hacmi 200 μ l olan prob reaksiyonu, şırınga içerisine pipetlendi ve aynı şartlardaki santrifüj ile kontaminantlardan uzaklaştırılarak hibridizasyona hazır hale getirildi.

100 ml maximum kapasiteli hibridizasyon tüplerine (1.37I.D. x 3,93L in. (35X100mm) Wheaton™ Hybridization Bottles-Fisher Scientific) yerleştirilen membranlar DEPC H₂O ile muamele edildikten sonra distile H₂O ile yıkandı, ardından tüplere 64°C'ye ayarlanmış 15 ml pre-hibridizasyon solüsyonu (Tablo 33) eklenerek yine 64°C'ye ayarlı hibridizasyon etüvünde (Integrated Separation Systems/Enprotech Unitherm Model 6/12 Hybridization Oven) 30-60 dk. rotasyonlu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplere 12'şer ml 64°C'ye ayarlanmış pre-hibridizasyon solüsyonu eklenerek solüsyon yenilendi.

Tablo 33. Pre-hibridizasyon solüsyonu

Bileşenler	(ml)
BSA	1(g)
0.5M EDTA(pH 8)	0.2
1M NaHPO ₄ (pH 7,2)	50
%20 SDS	35
DEPC H ₂ O	15
Toplam Hacim	100

Ependorf tüpte bulunan saflaştırılmış haldeki prob, 5 dk. 100°C’de kaynatılıp hemen ardından buza alınarak 2 dk. buzda bekletildi. İyice santrifüjlendikten sonra probun tamamı hibridizasyon tüpüne pipetlendi ve 64°C’ye ayarlı hibridizasyon etüvünde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün membranı yıkama işlemi, cam tüplerde içerisinde probun bulunduğu hibridizasyon solüsyonunun steril birer falkon tüpe aktarılması ve -20°C’de muhafaza edilmesi ile başladı. Ardından 100’er ml konsantre yıkama solüsyonu (Tablo 34) eklenen tüpler 5 dk. süresince oda sıcaklığında birkaç kez alt üst edilerek, spesifik olmayan bağlanmalar membrandan uzaklaştırıldı. Pens yardımıyla tüplerden çıkarılan membranlar yeterince derin plastik kare tablalara alınarak önceden 64°C’ye ısıtılan, seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile 5-10 dk. boyunca su banyosunda (Isotemp Waterbath, Fisher Scientific) inkübe edildi. Yıkama solüsyonu lavaboya döküldükten sonra, radyasyon ölçüm aleti ile (Geiger–Müller sayacı) (Survey meter Model 3, Ludlum Measurements Inc. Sweetweather, Texas) sinyal seviyesi ikinci bir yıkama işlemi gerekip gerekmediği bakımından test edildi (aşırı miktarda sinyal gözleendiği takdirde, yıkama 3 defaya kadar tekrarlanabilir). Ardından otoradyografi kaseti (Fisher Scientific Electrophoresis System FBXC 810 Autoradiography / X-Ray Cassette) işlem için hazırlandı. Kasete ince plastik bir film yerleştirildi ve ardından kasetin ölçülerinde kesilen kromatografi kâğıdı filmin üzerine yerleştirilerek DEPC H₂O ile muamele edildi. Membran, sinyalin bulunduğu kısım üste bakacak şekilde kromatografi kâğıdı üzerine yerleştirildi. Ardından membranın üzerine fosfor ekran (Care of GE Healthcare Storage Phosphor Screen, 00146931 SCR N UNMTD 20X25) yerleştirilerek (fosfoscreen yüzü sinyali kapatacak şekilde) kaset kilitlendi ve gece boyu oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tablo 34. Yıkama solüsyonu

Bileşenler	Konsantre (ml)	Seyreltik (ml)
BSA (gr)	1	0
0.5M EDTA (pH.8)	0.4	1
1M NaHPO ₄ (pH.7,2)	8	20
%20 SDS	50	25
DEPC H ₂ O	140	455
Toplam Hacim	200	500

Ertesi gün jel görüntüleme sistem&programı kullanılarak (BIORAD Personal Molecular Imager™ (PMI™) System) okunan fosfor ekran, görüntü temizleyicisi (Amersham Biosciences 810-UNV Image Eraser Light Box) tarafından silinip diğer hibridizasyonlara hazır hale getirildi. İkinci prob ile muameleye geçilmeden evvel, membran üçüncü bir tampon ile (arındırıcı tampon) (Tablo 35) muamele edildi. Tampon (250 ml), yeterince derin plastik kare bir tablada 74°C'ye ayarlı su banyosunda ısıtıldı. Ardından otoradyografi kasetinden çıkarılan membran, tablaya alındı ve 10 dk. süresince su banyosunda inkübe edildi. Tampon döküldükten sonra radyasyon ölçüm aleti ile sinyal ölçülerek ekstra yıkama gerekip gerekmediği belirlendi ve ardından tekrar hibridizasyon aşamasına geçilerek bu aşamadaki işlemler tekrarlandı. Tüm bu işlemler her üç prob ile de hibridizasyon tamamlanana kadar tekrar edildi.

Tablo 35. Arındırıcı tampon

Bileşenler	(ml)
1M Tris (pH.8)	1
0,5M EDTA	2
%20 SDS	2-2,5
DEPC H ₂ O	495
Toplam Hacim	500

2.2.6.3. Southern Blot Analizi

Her iki geni de taşıyan veya ilgili genleri ayrı ayrı taşıyan transgenik bitkilerde, bu genlerin kromozoma kaç kopya halinde yerleştiklerini ortaya çıkarmak için, Southern Blot hibridizasyon analizleri gerçekleştirildi. Kontrol olarak *NPTII* gen bölgesini bulundurmeyen yabancı tip *Arabidopsis* Col-0 DNA'sı kullanıldı. Southern Blot, pBI121 üzerinde yer alan kanamisin direnç genine spesifik primerlerce ana vektör (pBI121+SOS-1+AtNHX1) kalıp DNA olarak kullanılmak üzere, buradan çoğaltılan fragmentin radyoaktif ³²P ile işaretlenmesi ile, Northern Blot reaksiyon şartları ve hibridizasyon basamakları baz alınarak gerçekleştirildi. PCR primerleri olarak, Forward primer için Southern 2F 5'-CGTTGGCTACCCGTGATATTGC-3' ve Reverse primer için 1R 5'-TCCGCTCACAATTCCACACAAC-3' primerleri kullanılmış ve 1406 bp'lik *NPTII* dizisi hibridizasyon reaksiyonlarında prob olarak kullanılmak üzere etiketlendi.

Toplam beş transgenik hat ve K kontrol bitkilerinin rozet yapraklarından 2 g örneklenip, setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) kullanılarak genomik DNA izole edildi. DNA örnekleri, 0,6 hacim izopropanolde çöktürüldü. 10.000g'de 5 dk. santrifüjün ardından (oda sıcaklığında) izopropanol uzaklaştırıldı ve örnekler 1 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. Olası RNA kalıntıları örnekler 1 µl RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37 °C'de 2 saat süresince uzaklaştırıldı. Ardından, genomik DNA örnekleri fenol/kloroform ekstraksiyonu ve izopropanol çöktürmesi ile saflaştırıldı ve TE tamponu (pH.8) içerisinde çözüldü. Konsantrasyon ölçümleri NanoDrop ND1000 Spektrofotometre (DE, USA) cihazı kullanılarak yapıldı. Her hat için 20 µg DNA örneği 400µl reaksiyon hacminde EcoRI enzimiyle ilgili protokole göre (NEB, MA,USA) gece boyu kesildi. Reaksiyonun sonunda çöktürülen DNA örnekleri 33 µl saf su içerisinde çözüldü ve 7 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak +4°C'ye yerleştirilen elektroforez tankı içerisindeki, EtBr içermeyen %0,8'lik agaroz jelde gece boyu yürütülerek büyüklük farkına göre fragmentlere ayrıldı. Agaroz jelin EtBr ile boyanması işleminin ardından, pozitif yükleme yüklü membrana transfer, hibridizasyon ve görüntüleme Northern Blot hibridizasyon reaksiyonundaki aşamalarda gerçekleştirildiği şekliyledir.

2.2.7. Transgenik *Arabidopsis* Bitkilerinde Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler

2.2.7.1. Yeşil Yaprak Sayısının Belirlenmesi

Her iki geni de yüksek düzeyde ifade ettiği Northern Blot analizleri ile tespit edilen 7 farklı *Arabidopsis* hattından fenotipik açıdan stabilizasyon/benzerlik sergileyen üçü seçilerek tuz stresi altında yeşil kalabilen yaprak sayısı ile kök gelişimi, kök büyüme ve gelişme deneyi ile (root bending assay) (Zhu ve ark., 1998), agar petrielerde değerlendirildi. Bunun için, yabancı tip (K) ve transgenik tohumlar, sterilize edildikten sonra (Bkz. Bitkilerin büyütülmesi) +4°C'de 4 gün stratifikasyona bırakılarak, ½xMS agar besiyerine aktarıldı ve agar petrielerde 4 gün süresince büyütüldü. Sürecin ardından bitkiler, laminar kabin içerisinde, steril pens yardımıyla aseptik kurallar gözetilerek, 150 mM NaCl-ekli ½xMS agar besiyerlerine yatay olarak yerleştirildi ve petrielerin konumuna göre dikey durumda olan 40 watt'lık beyaz ışık kaynağı altında 12 gün boyunca yer çekimine zıt şekilde büyütülerek, yeşil yaprak sayısı ve kök büyümesi fotoğraflanarak kaydedildi.

2.2.7.2. Kök Büyüme Testi

Yabancı tip ve transgenik tohumların kök uzunlukları arasında kantitatif bakımdan fark olup olmadığını belirlemek adına, ilgili tohumlar, stratifikasyonun ardından steril pastör pipet yardımıyla 75, 100, 175 ve 200 mM NaCl içeren ½xMS besiyerlerine yerleştirildi ve 40 watt'lık beyaz ışık kaynağı altında, yer çekimi yönünde, kök uzama oranları incelendi. 10-12 gün sonra cetvel yardımıyla ölçülen değerler kayıt altına alındı. Kontrol bitkileri herhangi bir tuz konsantrasyonu içermeyen ½xMS agar petrielerde büyütülerek, farklı tuz konsantrasyonları ihtiva eden agar petrieler ile kıyaslama yapıldı.

2.2.7.3. Osmotik Stres Testi

Transgenik ve yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinin osmotik strese verdikleri cevabı ölçmek üzere, tohumlar +4°C'deki 4 günlük stratifikasyonun ardından 300 mM mannitol eklenen ½xMS agar besiyerine yerleştirildi ve 7 gün sonra bitkilerdeki kök uzunlukları kayıt altına alındı. (Kontrol petrieleri stres petrielerindeki bitkilerin tamamını bulundurmamakla birlikte, sadece ½xMS agar besiyerini ihtiva eder).

2.2.8. Tuz Stresi Uygulaması ve Cevapları

Arabidopsis tohumları önce 1/2xMS agar petrilerinde 3-4 gün süreyle büyütüldü. Ardından deneysel dizayna göre 2.5", 3" veya 4" ebatlarında, içerisinde Sunshine Mix (SunGro Horticulture, Vancouver, Canada) bulunan saksılara aktarıldı. Toprakta büyütülen 3 haftalık yabancı tip ve transgenik bitkiler, 3 hafta boyunca her 4 günde bir 50 mM 'dan 250 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edildi. Kontrol durumu için ise; aynı deneysel set hazırlanmış, fakat 4 günde bir, NaCl yerine su kullanılmıştır. Bitkiler yaklaşık altı haftalık iken, büyüme ve gelişimin kırk birinci gününde fotoğraflanarak antosiyanin, klorofil içeriği ve lipid peroksidasyonunu da içeren tüm fizyolojik parametrelerin değerlendirilmesi için örneklendi. Tuz stresi ve normal koşullar altında büyütülen transgenik ve yabancı tip *Arabidopsis* bitkileri için örnekleme yapıldıktan sonra, numunelerin kısa vadeli saklanması -80°C'de gerçekleştirildi.

2.2.8.1. Yaş Ağırlık ve Gövde Uzunluklarının Tespiti

3 hafta boyunca her 4 günde bir 50 mM 'dan 250 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edilmiş altı haftalık transgenik ve yabancı tip bitkilerin ve aynı süreç boyunca sadece su ile büyütülen kontrol bitkilerinin, toprak üzerinde kalan vejetatif bitki kısımları tartılarak, yaş ağırlık değerleri ve cetvel vasıtasıyla ölçülen gövde uzunlukları kayıt altına alındı.

2.2.8.2. Meyve Sayısı ve Tohum Miktarının Tespiti

Transgenik ve yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinin tuz stresi ve iyi sulanmış normal koşullar altında oluşturdukları meyve (silikva) sayısı ve tohum miktarının belirlenmesi/karşılaştırılması için, aynı deney düzeneği kurularak, bitkiler 3 hafta boyunca her 4 günde bir 50 mM 'dan 250 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edildi, ardından tohum oluşturabilmeleri için tuz stresi uygulaması kesilerek, su ile büyüme ve gelişim devam ettirildi ve bitkiler 8 haftalık iken bahsi geçen parametreler ölçüldü. Her bitki için silikva meyve sayısı manuel olarak sayıldı, bitki başına düşen tohum ağırlığı ise tartım yapılarak belirlendi.

2.2.8.3. Klorofil Miktarının Belirlenmesi

Klorofil miktarı metanol ekstraksiyon metodu kullanılarak belirlendi (Porra et al. 1989). Toprakta yetiştirilen 250 mM tuz stresi altındaki 6 haftalık bitkilerden alınan 0,1'er gram taze yaprak örneği 2 ml metanol içerisinde, 4°C'de 24 saat boyunca bekletilip, ertesi gün bitki başına 1 ml supernatant kullanılarak klorofil a, b ve toplam klorofil (a + b) A_{665} ve A_{652} 'deki değerlerin BioTek Synergy HT mikroplate okuyucu ile (BioTek Instruments, Inc. Vermont, US) spektrofotometrik olarak belirlenerek kayıt altına alındı. Aynı işlem 6 hafta boyunca sadece su ile muamele edilen kontrol bitkileri için de gerçekleştirildi. Klorofil a, b ve toplam klorofil (a+b) içeriği, ilgili molar katsayı kullanılarak, bu moleküller için konsantrasyon değerlerine dönüştürüldü.

2.2.8.4. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi

Antosiyanin miktarı Solfanelli ve ark., 2006'ya göre belirlendi. 0,2 g yaprak örneği 2/3'ü distile su olan metanol-HCl solüsyonunda (HCl 1% (v/v) öğütüldü ve 1dk. 14,000xg 'deki ekstraksiyonun ardından supernatant alınarak üzerine 1 hacim kloroform eklenerek, tüpler alt üst edildikten sonra 1 dk. 14,000xg'deki santrifügasyon ile klorofiller süpernatanttan uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası meydana gelen ikili fazdan, üst faz ayrılarak absorpsiyon BioTek Synergy HT mikroplate okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (A_{535}).

2.2.8.5. Malondialdehit (MDA) Miktarının Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, 6 haftalık bitkilerden alınan 0,1 gram yaprak örneklerinde 2-Tiyobarbitirik asit-MDA kompleksinin oluşum oranına bakılarak, Heath ve Packer (1968)'e göre test edildi. A_{532} and A_{600} nanometrelerdeki absorpsiyonlar BioTek Synergy HT mikroplate okuyucu ile belirlendi.

2.2.8.6. Çimlenme Testi

50 mM 'dan 250 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edilen bitkilerden elde edilen yabancı tip ve transgenik tohumlar, yüzey sterilizasyonu ve stratifikasyonun ardından 1/2xMS besiyerindeki ilgili bölmelere yatay şekilde pastör pipet yardımıyla steril koşullarda yerleştirildi ve 22°C'de 40 watt sürekli ışıkta, 7 gün boyunca

çimlenme potansiyelleri bakımından gözlemlendi. Her bir tohumun çimlenmesi, radikulanın görünür hale geldiği an referans kabul edilerek, her ayrı hat için, her gün toplam sayı mikroskop altında sayılmak suretiyle belirlendi.

2.2.8.7. Na⁺ ve K⁺ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Na⁺ ve K⁺ içerikleri Wang BS ve Zhao KF (1995)'ye göre belirlendi. Tohumlar 4°C'de 4 gün stratifikasyona bırakıldıktan ve imbibe edildikten sonra, 2 hafta için 22°C'de 16 saat ışık (120 µmol m⁻²sn⁻¹) 8 saat karanlık döngüde ayarlı bitki büyütme kabineye aktarıldı. İki haftalık bitkilere, diğer bir hafta boyunca 100 mM NaCl uygulanarak (kontrol bitkileri aynı süre boyunca yalnızca su ile sulandı) 3. haftada toprak üzerindeki biyokütle örneklendi ve 80°C'lik etüvde 48 saat kurutuldu. Numuneler toz haline getirilerek, 2 saat süresince 0,1 M nitrik asit ile muamele edildi ve K⁺ ile Na⁺ konsantrasyonları atomik absorpsiyon spektrofotometre ile (Z-8000, Hitachi, Tokyo, Japan) tespit edildi.

2.2.8.8. Tuz Stresi Şoku

Yabani tip ve transgenik *Arabidopsis* tohumları +4°C'deki 4 günlük stratifikasyonun ardından ½xMS agar besiyerinde 3 gün süresince büyütülerek, ardından rozet yaprakların hemen hemen aynı ebatta olmalarına dikkat edilerek seçilen bitkiler, 4"lik saksıların her köşesine her farklı grup bitki gelecek şekilde yerleştirildi. Bu şekilde 4 gün daha büyütülen 1 haftalık bitkiler, her 4 günde bir 300 mM NaCl uygulanarak, 3 hafta süresince büyütüldü ve 3. haftada bitkilerdeki fenotipik değişimler fotoğraflanarak kayıt altına alındı.

2.2.8.9. Eş Zamanlı Tuz ve Sıcaklık Stresi Uygulaması

Tuz ve sıcaklık stresinin kombine edildiği koşullarda, transgenik *Arabidopsis* ve yabani tip bitkilerin petri ortamında gösterdiği fizyolojik değişimler, 28°C'de sıcaklık ve 100 mM tuz stresi kombine edilerek gözlemlendi. Bunun için, 4 grup petri hazırlandı. İlk grup 100 mM NaCl+22°C, ikinci grup 100 mM NaCl+28°C, üçüncü grup ½xMS+28°C ve son grup ½xMS+22°C grubu petrilerini içerecek şekilde dizayn edildi. Stratifikasyonun ardından tohumlar aseptik şartlar altında petrilere yerleştirildi. Stres ve kontrol durumlarında 9 gün boyunca yerçekimi yönünde meydana gelen kök büyümesi, cetvel yardımıyla kök uzunlukları ölçülerek belirlendi.

Toprakta gerçekleştirilen deneyler için ise, 1/2xMS agar petrilerinde 3-4 gün süreyle büyütülmüş *Arabidopsis* tohumları 2,5" ebatındaki saksılara aktarılmış ve stres uygulaması başlayana kadar 3 hafta boyunca 22°C'lik bitki büyütme kabininde (Bkz. Bitkilerin Büyütülmesi) toprakta büyütülmüştür. Bitkiler 3 haftalık iken, 50 mM'dan başlanarak 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar 4'er gün ara ile tuz stresi uygulandı.150 mM tuz stresi altındaki 6 haftalık bitkiler için yaş ağırlık ölçümleri yapıldı, meyve sayısı ile tohum miktarı ölçülmek üzere bitkiler 6 haftadan sonra ekstra tuz solüsyonları yerine su ile sulanmaya devam edildi. Meyve sayısı ile tohum miktarı daha önce belirtilen şekilde, bitkiler 8 haftalık iken ölçüldü.

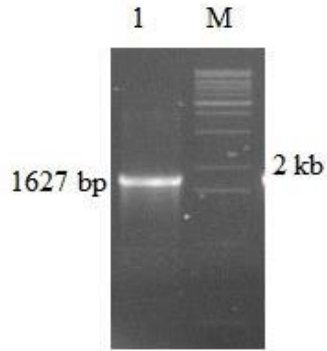
2.2.9. İstatistiksel Analizler

Bireysel ve kombine streslerin transgenik bitki hatlarının fenotip, tohum miktarı ve farklı birçok fizyolojik parametre üzerindeki etkisi, hipotez testindeki 0,05 (%5) nem derecesi baz alınarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Bağımsız değişkenlerin bitki büyüme ve gelişimi üzerine anlamlı farklar oluşturup oluşturmadıkları, çoklu kıyaslama testi (TUKEY) ile belirlenerek önem dereceleri tespit edildi.

3. BULGULAR

3.1. *AtNHX1* Geninin Klonlanması

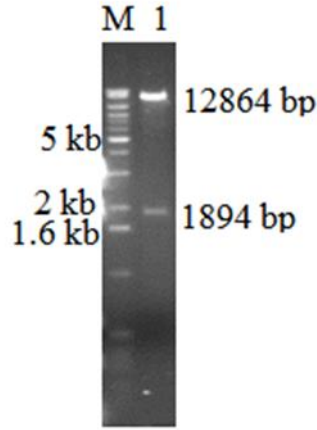
Arabidopsis thaliana cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR sonucu *AtNHX1* genini kodlayan sekans daha önce belirtilen spesifik primerlerce çoğaltıldı. (1627 bp). DNA moleküllerinin varlığı agaroz jel üzerinde gözlenip fotoğraflandı (Şekil 7).



Şekil 8. *AtNHX1* genininin cDNA'dan amplifikasyonu. 1: *AtNHX1* PCR ürünü. 1627 bp büyüklüğündeki fragment BamHI kesim bölgesini içerir. M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies).

3.1.1. Vektör Modifikasyonu

pBI121, *AtNHX1* fragmentinde bulunan BamHI ve SacI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile uyumlu hale getirilebilmek için; önce SacI ile kesilip, T4 DNA polimeraz (New England Biolabs) kullanılarak SacI uç blunt (küt) hale getirildikten sonra, *GUS* geni uzaklaştırılmak üzere, BamHI ile kesildi. CaMV 35S promotor, Nos-terminatör ve *NPT-II* (*Kan^r*) genlerini kapsayan 12864 bp'lik fragment, Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit ile jelden temizlenip ligasyonda kullanılmak üzere +4°C'de saklandı (Şekil 8).

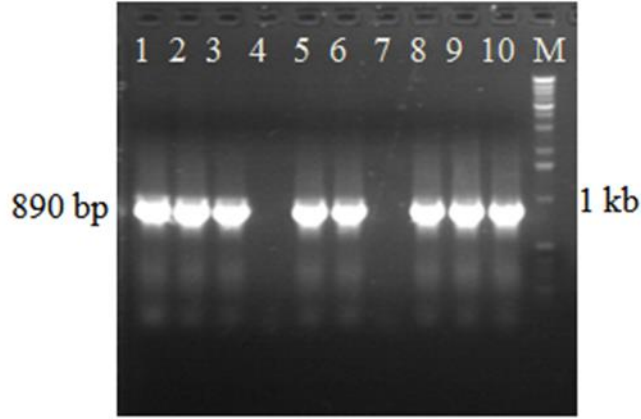


Şekil 9. pBI121 vektör modifikasyonu. 1: BamHI ve SacI restriksiyon endonükleazlarla kesilmiş pBI121 binary vektör (12864 bp). M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies).

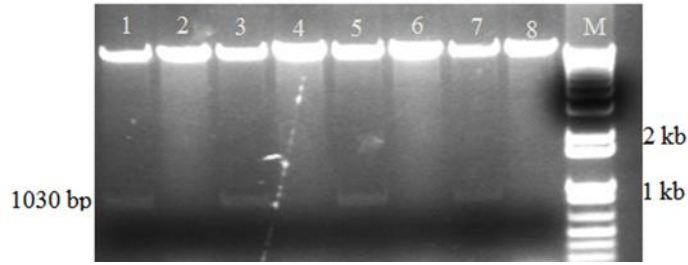
3.1.2. Koloni PCR Analizi ve Plazmid İzolasyonu

AtNHX1 fragmenti ve pBI121 binary vektör için ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra, reaksiyon sonrası elde edilen ürün *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine transfer edildi ve ilgili fragmenti taşıyan plazmidlerin kompetent *E.coli* hücrelerine transferinin değerlendirilebilmesi için, *AtNHX1* gen spesifik primerleri 35S-2: 5'- CAAGACCCTTCCTCTATATAAGG-3' ve NHX5 820R: 5'- GAGGATACCGCTCAAGTCG-3' ve kalıp olarak pBI121+*AtNHX1* plazmidini kullanılarak 10 adet koloni için PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve PCR sonucu 890 bp ürün veren koloniler pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 9).

Koloni PCR sonrası beklenen büyüklükte fragment oluşturan 8 koloniden 4'ü mini ölçekli izolasyon prosedürü takip edilerek plazmid izolasyonunda kullanıldı. Pozitif kolonilerden seçilen bu 4 plazmidin, restriksiyon endonükleazlarla doğrulukları sınıandı (Şekil 10).



Şekil 10. Koloni PCR için agaroz jel elektroforezi sonuçları. 890 bp *AtNHX1* geninin ilgili primerlerce çoğaltılmış bir parçasını işaret eder. 1-3, 5-6, 8-10 bu parçayı taşıyan pozitif koloniler. M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies)

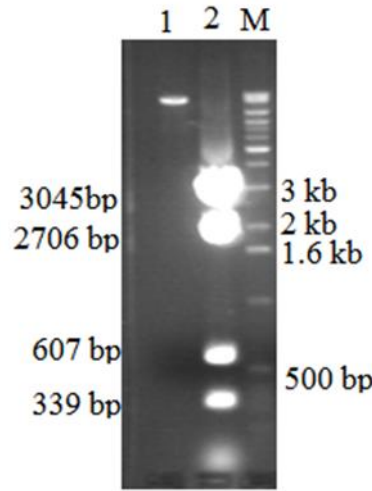


Şekil 11. pBI121 vektörünün BamHI, SacI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile *AtNHX1* genini bulundurduğunun doğrulanması. 1-2, 3-4, 5-6 ve 7-8 sırası ile BamHI+SacI ve EcoRI kesim ürünleri. M: INVITROGEN The TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder

3.2. *SOS-1* Geninin Klonlanması

3.2.1. Vektör Modifikasyonu

SOS-1 geninin klonlanması için gerekli optimizasyon çalışmalarında, düşük kopya sayısına sahip pBI121 vektörü, yüksek kopya sayısına sahip PJG4-5 maya vektörü kullanılarak modifiye edildi. PJG4-5 vektöründe beklenen büyüklükteki kesim ürünü (339 bp'lik fragment) ve PBI121 vektörü ligasyona uğratılmak üzere PJG4-5 ve PBI121 vektörlerinin her ikisi de HindIII (New England Biolabs) enzimiyle kesildi (Şekil 11).

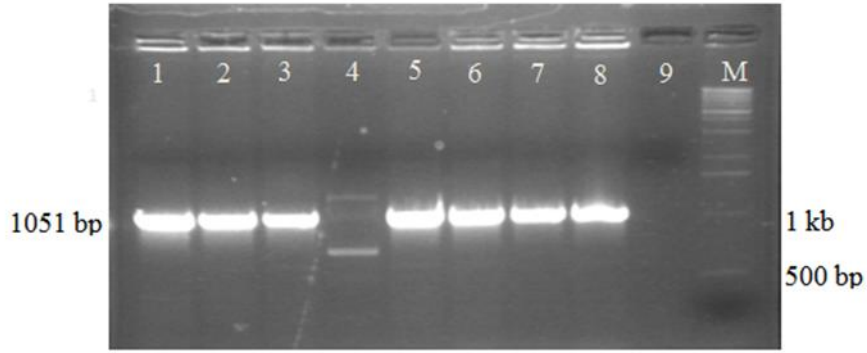


Şekil 12. *SOS-1* geninin klonlanmasında vektör modifikasyonu. 1: pBI121 plazmid DNA HindIII+CIP kesimi, 2: PJG4-5 plazmid DNA HindIII kesim ürünleri, M: INVITROGEN 1kb DNA Extension Ladder (Daha sonra vektör ve 339bp'lik fragment ligasyon reaksiyonu ile birleştirilmiş ve vektör bir EcoRI kesim bölgesi elde edilmek üzere modifiye edilmiştir.)

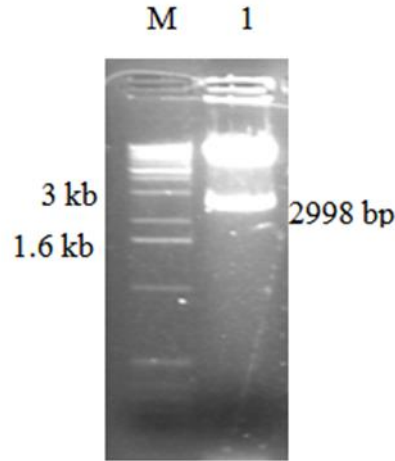
3.2.2. Koloni PCR Analizi

pBI121 binary vektör ve PJG4-5 plazmid DNA HindIII kesim ürünlerinden 339bp'lik fragment jelden temizlenerek ligasyon reaksiyonu ile birleştirildi, reaksiyon sonrası elde edilen yeni vektör (pBI121+ PJG4-5 339bp) *E.coli* DH5 α kompetent hücrelerine transfer edildi. LB agar besiyerinde inkübasyon sonrası oluşan kolonilerden rastgele seçilen 9'u, *E.coli* kolonilerinin pozitifliğini test etmek için Forward primer olarak; Gyp Upstream 5'-GAATGTCGCCCTTTTGTCTTTG-3' ve Reverse Primer olarak; 35S-415-R 5'-AGTGTGTCGTGCTCCACCATGT-3' primerleri kullanılıp, 1051 bp'lik fragment çoğaltıldı. PCR ürünleri %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendi ve pozitif koloniler belirlendi (Şekil 12).

Mini ölçekli plazmid izolasyonu sonrası elde edilen modifiye edilmiş vektör DNA (pBI121+PJG4-5 339bp), kontrol amaçlı önce EcoRI restriksiyon endonükleaz ile kesilerek test edildi ve 2998bp'lik fragment %1'lik hazırlanan jelde UV altında gözlenerek doğrulandı (Şekil 13).



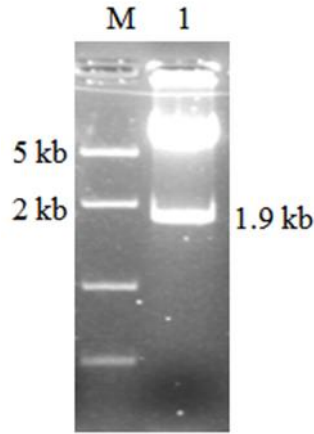
Şekil 13. *SOS-I* modifiye vektörün koloni PCR ile doğrulanması. 1-3, 5-8 pBI121+ PJG4-5 339bp'lik modifiye edilmiş yeni vektörü taşıyan pozitif *E.coli* DH5 α klonları. M: INVITROGEN 1kb DNA Extension Ladder



Şekil 14. Vektör DNA'da modifikasyon ligasyonunun doğrulanması. 1: Vektör DNA (pBI121+PJG4-5 339bp)'nın EcoRI restriksiyon endonükleaz kesim ürünleri. M: INVITROGEN 1kb DNA Extension Ladder

3.2.3. *GUS* (B-Glukuronidaz) Geninin Modifiye Vektörden Uzaklaştırılması

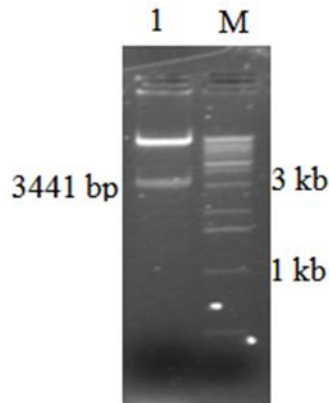
Doğrulanmış modifiye vektör (pBI121+ PJG4-5 339bp), XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile kesilerek vektörden *GUS* geni çıkarıldı (Şekil 14).



Şekil 15. Modifikasyonu tamamlanan vektör DNA'nın *SOS-1* geni ile ligasyona hazırlanışı. M: THERMO SCIENTIFIC FastRuler Middle Range DNA Ladder, 1: XbaI ve SacI enzim kesimleri ile *GUS* (1,9 kb) geni modifiye vektörden kesilip uzaklaştırılmış, vektörün geri kalan parçası jelden temizlenerek *SOS-1* geni ile ligasyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.4. *SOS-1* Geninin Ligasyona Hazırlanması

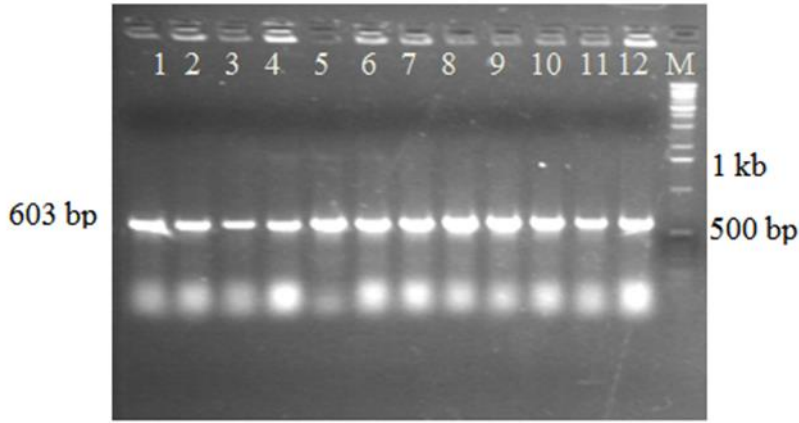
İçerisinde *SOS-1* genini taşıyan pIG121-Hm vektörü, XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve *SOS-1* genini kodlayan 3441 bp'lik fragment vektörden kesilip, jelden temizlenerek modifiye pBI121+PJG4-5 339 bp vektörü ile ligasyona hazır hale getirildi (Şekil 15).



Şekil 16. pIG121-Hm vektörün XbaI ve SacI restriksiyon enzimleri ile muamelesi. 1:*SOS-1* geni (3441 bp) M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies).

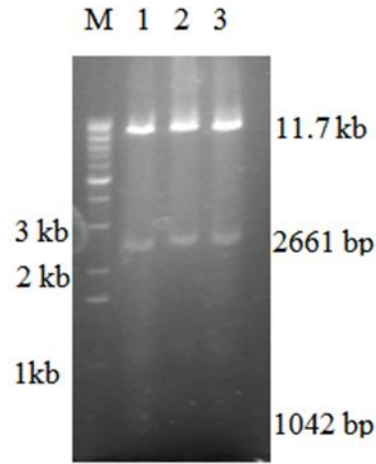
3.2.5. Koloni PCR ile Vektör Modifikasyonunun Doğrulanması

Modifiye vektör (pBI121+PJG4-5 339 bp) ile pIG121-Hm vektöründen kesilen *SOS-I* geninin ligasyonunun ardından elde edilen yeni vektör (pBI121+PJG4-5 339 bp+*SOS-I*/pBI121SOS1), *E.coli* DH5 α kompetent hücrelerine transfer edildi ve bu transformasyon sonucu oluşan koloniler için Forward primer olarak 35S-2: 5'-CAAGACCCTTCCTCTATATAA GG-3' ve Reverse Primer olarak 542R: 5'-TTAGCAAAGCAACAACAGCAACC-3' primerleri kullanılıp p121*SOS-I* vektörü üzerindeki 603bp'lik fragment koloni PCR ile işlemin doğruluğunu sınamak amaçlı çoğaltıldı (Şekil 16).



Şekil 17. *SOS-I* genini taşıyan modifiye vektörün koloni PCR ile doğrulanması. 1-12 (pBI121+ PJG4-5 339bp+*SOS-I*/pBI121*SOS-I*) vektörünü taşıyan *E.coli* DH5 α klonları. M: 1kb DNA Extension Ladder (InvitrogenTM Life Technologies)

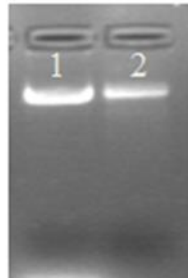
Pozitif kolonilerden mini-ölçekli plazmid izolasyonu sonrası elde edilen vektör DNA (pBI121+ PJG4-5 339bp+*SOS-I*/ p121*SOS-I*), genin vektörde olduğunu doğrulamak adına, kontrol amaçlı EcoRI restriksiyon endonükleaz ile test edildi ve 12148 bp 2661 bp 1042 bp ve 778 bp'lik fragmentler agaroz jelde UV altında gözlenerek doğrulandı (Şekil 17).



Şekil 18. *SOS-1* genini taşıyan modifiye vektörün EcoRI restriksiyon endonükleaz ile doğrulanması. 1,2 ve 3: sırası ile *SOS-1* genini taşıyan (pBI121+PJG4-5 339bp+*SOS-1*/p121*SOS-1*) modifiye vektöre ait 7., 10. ve 11., *E.coli* DH5 α kolonilerinden izole edilen plazmidlerin EcoRI restriksiyon endonükleaz ile kesimi sonucu meydana gelen ürünler. M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies)

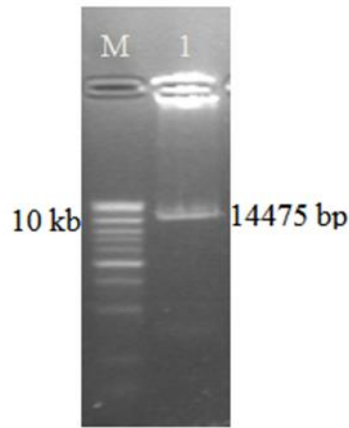
3.3. *SOS-1* ve *AtNHX1* Genlerinin Aynı Vektör Üzerine Yerleştirilmesi

SOS-1 ve *AtNHX1* genlerini taşıdığı kanıtlanan, kolonilerden kit yardımıyla ticari firmanın önerileri doğrultusunda plazmid izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 18).



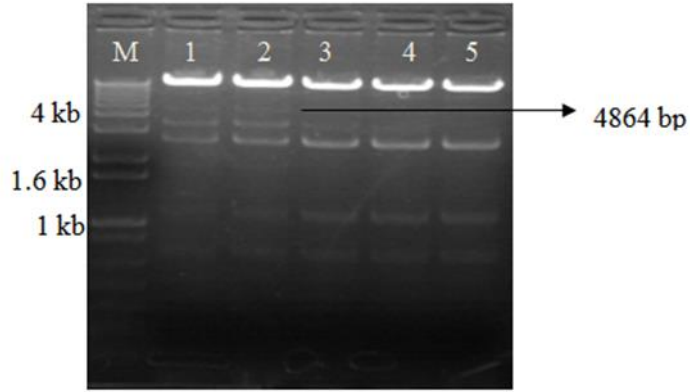
Şekil 19. Gen organizasyonu öncesi plazmid izolasyonu. 1 ve 2 sırası ile *SOS-1* ve *AtNHX1* genini taşıyan pBI121+PJG4-5 339bp+*SOS-1*/p121*SOS-1* ve pBI121+*AtNHX1* plazmidlerinden DNA izolasyonu

Genleri aynı vektöre yerleştirebilmek için; *AtNHX1* genini bulunduran pBI121+*AtNHX1* ve *SOS-1* genini bulunduran pBI121+PJK4-5 339bp+*SOS-1*/p121*SOS-1* EcoRI enzimi ile kesilerek agaroz jelde UV altında görüntülendi, jelden temizlendi ve ligasyona hazır hale getirildi (Şekil 19). *SOS-1* geni; içerisinde iki adet EcoRI restriksiyon endonükleaz bölgesi bulunduğu için, genin parçalara ayrılmasını önlemek için kısmi kesim yapılarak, 35S promotor, *SOS-1* geni ve Nos terminatorünün bulunduğu 4864 bp'lik kaset elde edildi (Şekil 20).

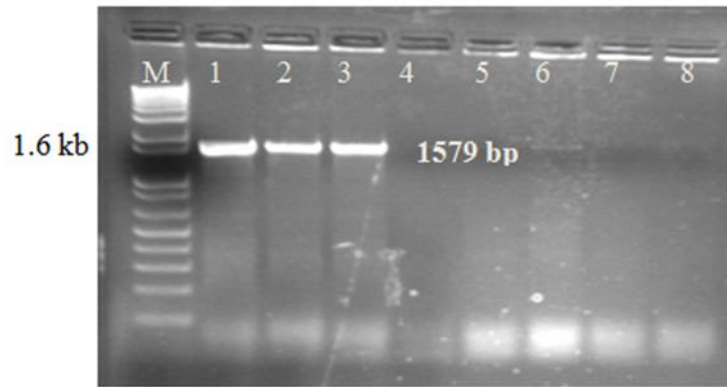


Şekil 20. *AtNHX1* genini bulunduran pBI121 vektörünün EcoRI enzimi ile muamelesi. M: 1kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™ Life Technologies) 1: EcoRI kesim ürünü (14475 bp) (plazmid linear formda görünmektedir).

AtNHX1 genini taşıyan 14.475 bp'lik pBI121 ve *SOS-1* genini bulunduran 4864 bp'lik kaset, ligasyondan sonra *E.coli* DH5 α kompetent hücrelerine transfer edildi. Oluşan kolonilerden rastgele seçilen 8 koloni arasından, yeni plazmidi taşıyan *E.coli* kolonilerinin belirlenebilmesi için, Forward primer olarak NHX3 5'-CGACTTGAGCGGTATCCTC-3' ve Reverse Primer olarak 35S-415-R:5'-AGTGTGTCGTGCTCCACCATGT-3' primerleri kullanılarak, pBI121 *AtNHX1*+*SOS-1* vektörü üzerindeki 1579 bp'lik fragment çoğaltıldı (Şekil 21).



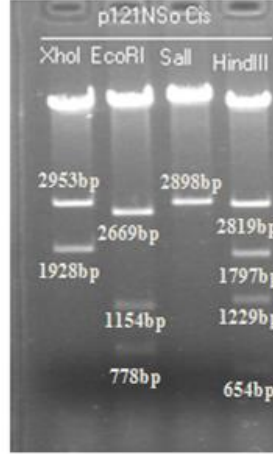
Şekil 21. *SOS-1* genini bulunduran pBI121+PjG4-5 vektörünün EcoRI enzimi ile muamelesi M: INVITROGEN The TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder 1- 2-3-4-5: EcoRI kısmi kesim (partial digestion) ürünleri; sırasıyla 10. 20. 30. 40. ve 50.dk'lar. PjG 4-5 vektöründen alınan 339 bp'lik fragment ile sonuna bir EcoRI kesim bölgesi eklenen 4864 bp'lik *SOS-1* gen kaseti (başında ve sonunda EcoRI kesim bölgesi bulundurmuş oldu) bir sonraki aşamada *AtNHX1* genini bulunduran pBI121 vektörüne aktarılmak üzere jelden temizlenmiştir.



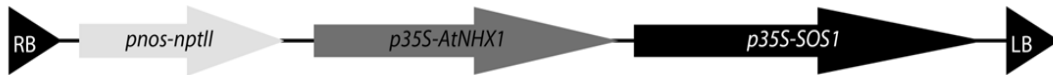
Şekil 22. *SOS-1* ve *AtNHX1* genini taşıyan (pBI121+*AtNHX1* +*SOS-1*) vektörün koloni PCR ile doğrulanması. 1-3 ile 6. ve 8. koloniler pBI121+ PjG4-5 339bp+*SOS-1* vektörünü taşıyan *E.coli* DH5α klonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: INVITROGEN The TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder

Koloni PCR'ın ardından pozitif olarak belirlenen 2. koloni büyütülerek, bu bakteriden plazmid izolasyonu sonrası elde edilen vektör DNA (pBI121+*AtNHX1*+*SOS-1*), her iki genin de vektörde olduğunu doğrulamak için, kontrol amaçlı XhoI, EcoRI, Sall ve HindIII

restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek teyid edildi (Şekil 22). Elde edilen patern aşağıda gösterildiği gibidir (Şekil 23).



Şekil 23. *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini taşıyan final vektörün restriksiyon endonükleazlar ile doğrulanması. Son adımda oluşturulan vektörün (pBI121+*AtNHX1*+*SOS-1*) XhoI, EcoRI, Sall ve HindIII restriksiyon endonükleazlar ile kesimi sonucu oluşan ürünler.



Şekil 24. Çalışmada kullanılan ifade vektörünün (pBI121:*AtNHX1*+*SOS-1*) T-DNA bölgesinin şematik gösterimi. RB: T-DNA bölgesinin sağ sınırı, LB: T-DNA bölgesinin sol sınırı, *pnos*:nopalın sentaz gen promotörü, *nptII*; neomisin fosfotransferaz geni, p35S karnabahar mozaik virüsü 35S promotörü. Çalışmada kullanılan vektör, ilgili genler ve restriksiyon endonükleazların dizileri Ek'te verilmiştir.

3.4. Transgenik *Arabidopsis* Bitkilerinin Moleküler Karakterizasyonu

3.4.1. Transgenik Bitkilerin Oluşturulması ve Mendel Kalıtım Analizleri

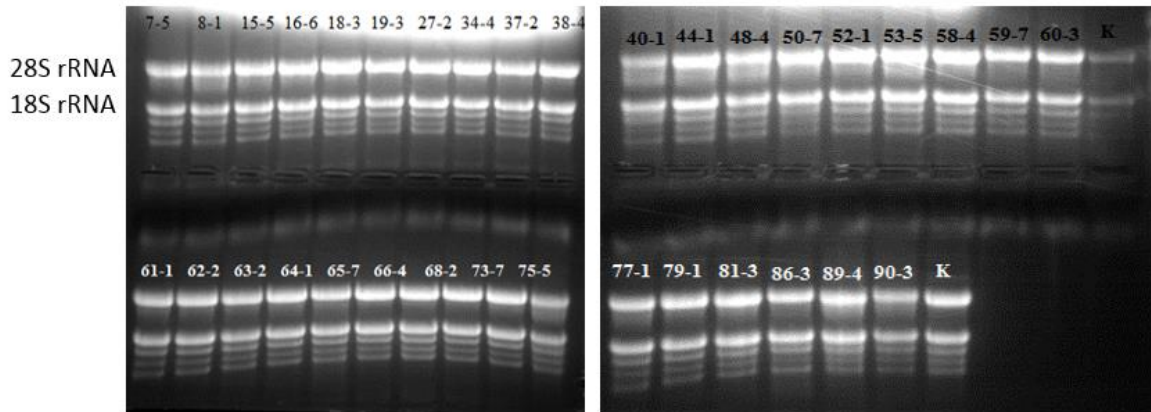
AtNHX1 ve *SOS-1* cDNA'ları ligasyon reaksiyonu üzerinden, 35S CaMV promotörünün kontrolü altında, pBI121 vektörüne yerleştirildi. Vektör *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon ile bitki nükleer genomuna entegre edildi. Vektörün

üzerindeki kanamisin direnç geni seleksiyon markörü olarak kullanıldı ve toplamda 56 T1 transgenik hat elde edildi. İkinci nesilde (T2) Mendel ki-kare testi üzerinden bunların 39'unun homozigotluk bakımından pozitif olduğu tarandı.

3.4.2. *AtNHX1* ve *SOS-1* Genlerinin İfade Analizleri

3.4.2.1. Olası Transgenik *Arabidopsis* Bitkilerinden Toplam RNA İzolasyonu

T2 nesline ait transgenik adayı hatlar ve kontrol bitkileri transfer edilen genin entegrasyonu ve ekspresyon profilini ortaya koymak adına, ilk adım olan toplam RNA izolasyonu, Trizol metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonuçları %1'lik agaroz jel konsantrasyonunda yapılan elektroforezin ardından, UV altında incelendi ve gen ifade çalışmalarında kullanılacak olan RNA materyalinin sağlamlığı, yıkıma uğramamış ribozomal RNA (rRNA) alt birimlerinin (28 ve 18S) fotoğraflandığı formaldehit jeller gösterilerek ispatlandı (Şekil 24).

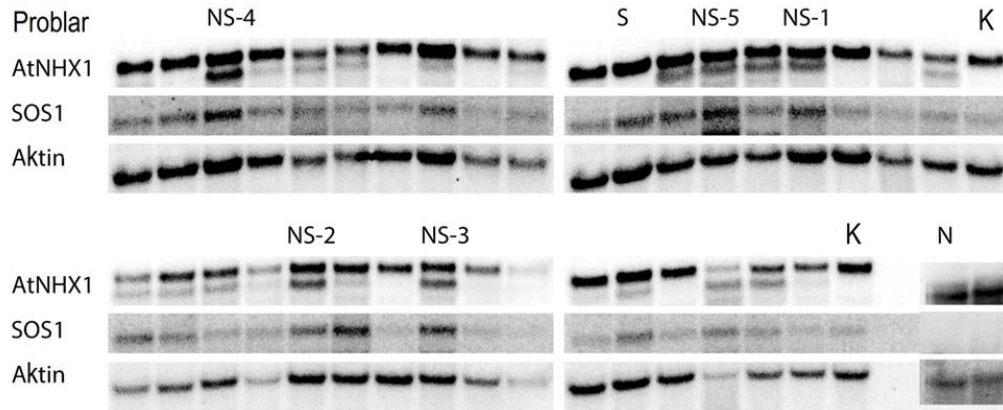


Şekil 25. Olası transgenik hatlardan toplam RNA izolasyonu. T2 neslinden her bağımsız hatta ait RNA moleküllerinin varlığı, (her bir hat için 10 µg) 0,4 M'lık formaldehid %1,2 agaroz jelde UV altında gözlemlendi ve fotoğraflandı. RNA moleküllerinin sağlamlığı/degrede olup olmadığı 28S ve 18S ribozomal RNA (rRNA) fragmentleri gözlenerek değerlendirilmiştir. K yabancı tip Col-0 *Arabidopsis* bitkilerini simgeler.

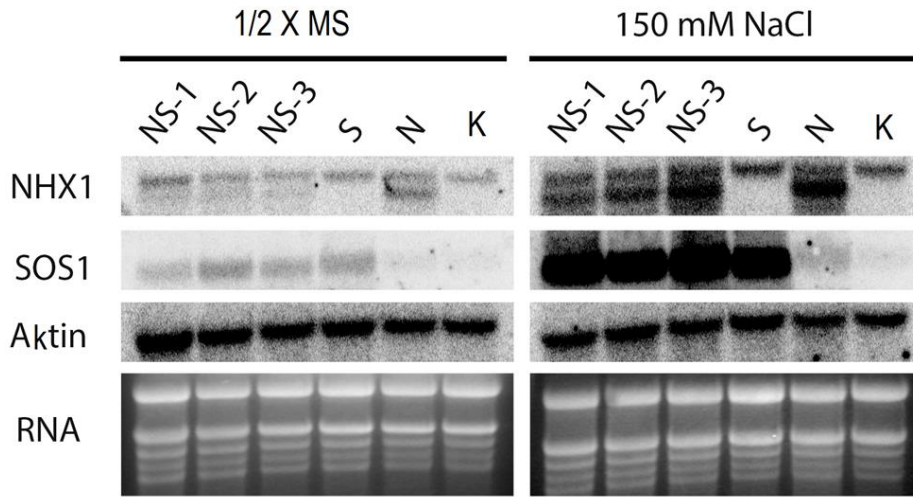
3.4.2.2. *Arabidopsis* Transgeniklerinde Aşırı İfadenin Northern Hibridizasyonu ile Analizi

Arabidopsis genomunda doğal olarak bulunan *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin her ikisinin de aynı anda aşırı ifade ettirildiği transgenik hatlar ile, sadece *SOS-1* ve sadece

AtNHX1 genini aşırı ifade eden transgeniklerin tespiti için, gen spesifik problar ile Northern Blot hibridizasyon analizi gerçekleştirildi. Hatlardan NS-1, NS-2, NS-3, NS-4 ve NS-5 her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden Arabidopsis hatları olarak belirlenerek, fizyolojik analizlerde kullanılmak üzere diğer hatlardan ayrıldı (Şekil 25 ve 26). *AtNHX1* klonlama esnasında translasyona uğramayan bölgeleri bitki genomunda olduğu orjinal durumundan daha kısa dizayn edildiği için jel görüntülerinde internal *AtNHX1* fragmentinin altında yürümüş bir fragment olarak gözlenir. *SOS-1* ise hemen hemen Arabidopsis'deki internal *SOS-1* geni ile aynı büyüklükte dizayn edilmiş olmasından dolayı, formaldehit jel görüntülerinde internal gen ile aynı hizada görüntülenmiştir. Transgenik hatlar Northern Blot analizi sonrası bu bilgi kullanıldığı jel görüntüleri incelenerek belirlenmiştir.



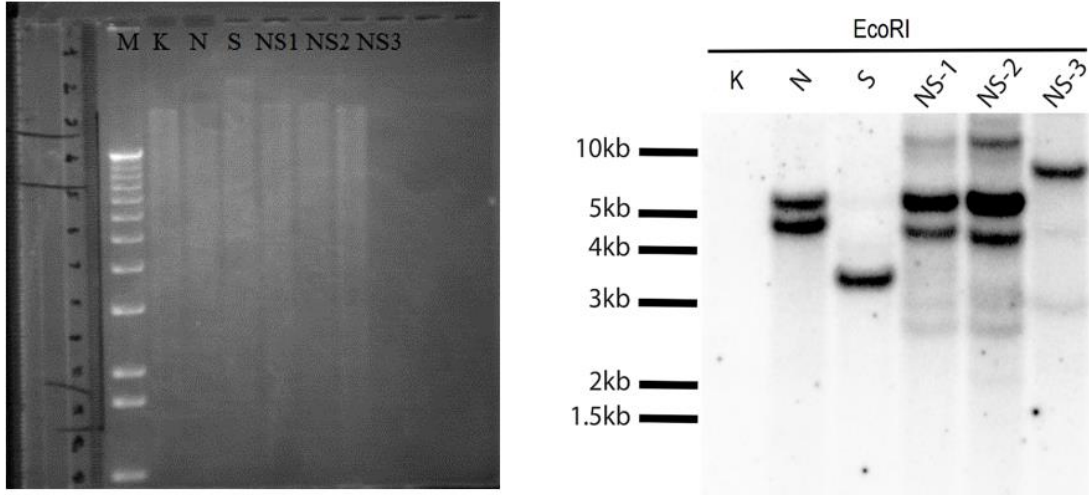
Şekil 26. Northern Blot hibridizasyon analizi. Tuz stresi uygulanmamış normal koşullar altında *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin ifadesini gösterir. Northern Blot hibridizasyon analiz sonuçları, RNA izolasyon sonuçları ile örtüştürüldüğünde; NS-1:52-1, NS-2:65-7, NS-3:73-7, NS-4:15-5, NS-5 50-7 numaralarını gösteren örnekler, her iki geni aynı anda ifade eden T2 nesline ait farklı *Arabidopsis* hatlarını simgeler. S harfi ile gösterilen ise, sadece *SOS-1* genini aşırı ifade edip, *AtNHX1* genini bulandırmayan *Arabidopsis* hattını işaret eder. Prob olarak kullanılan genler şeklin solunda sıralanmıştır. Aktin ekspresyonunun her durumda her dokuda sabit olduğunu gösteren internal referans genidir.



Şekil 27. *Arabidopsis* transgeniklerinde tuz stresi ile uyarılan ifadenin Northern hibridizasyonu ile gösterilmesi. 150 mM NaCl, 2 gün boyunca uygulanarak tuz stresi ile ifadeleri uyarılmış, her iki geni birden (NS-1, NS-2 NS-3), sadece *SOS-1* (S) ve sadece *AtNHX1* (N) genlerini taşıyan transgeniklerdeki ve K yabancı bitkilerdeki ifade düzeyini, $\frac{1}{2}xMS$ ise aynı set bitkilerin normal koşullar altındaki (sıvı $\frac{1}{2}xMS$ besiyeri) gen ifade düzeylerini gösterir. K herhangi bir trans gen taşımayan yabancı tip Col-0 *Arabidopsis* bitkilerini simgeler.

3.4.2.3. Southern Blot Hibridizasyon Analizi

Her ayrı *Arabidopsis* hattı için izole edilen genomik DNA, EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak kesilip, %0.7'lik agaroz jelde büyüklüklerine göre fragmentlere ayrıldı ve negatif yüklü DNA molekülleri pozitif yükle yüklü membrana aktararak (GE Healthcare Amersham™ Hybond™ -XL Membranes), sırasıyla pre-hibridizasyon ve kanamisin spesifik radyoaktif ^{32}P ile işaretli prob DNA kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirildi (Prob işaretleme reaksiyonunda AMBION DECAprime™ II DNA Labeling Kit kullanıldı). N hatlarının *AtNHX1* genini genomlarında çift kopya halinde, S hatlarının *SOS-1* genini tek kopya halinde taşıdıkları, çifte transgeniklerin ise NS-3 hattı hariç, *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini çifte kopya halinde taşıdıkları bulgusuna ulaşıldı. NS-3 hattının ise; diğer iki hattın aksine, *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini tek kopya halinde genomunda taşıdığı tespit edildi (Şekil 27).

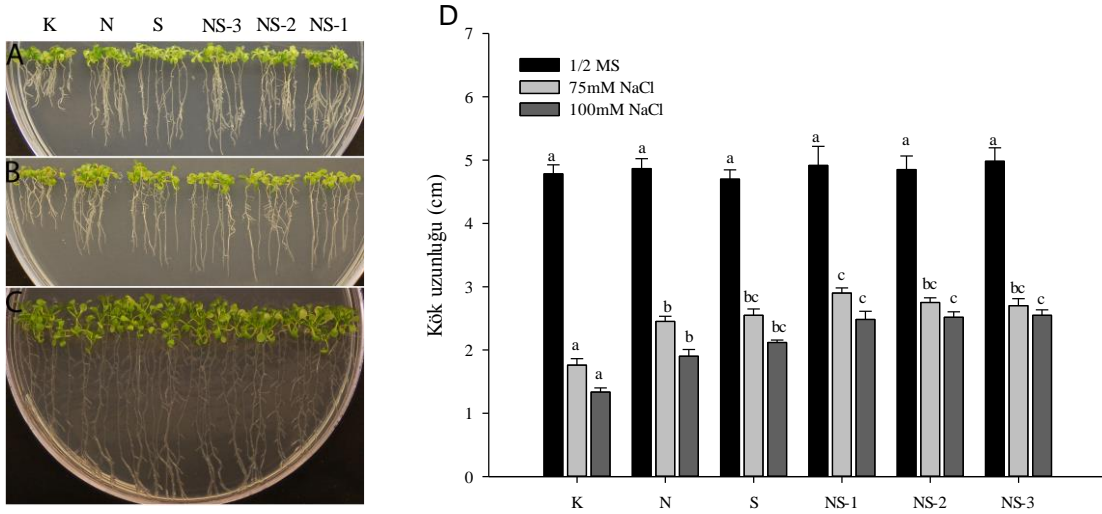


Şekil 28. Southern Blot analizi. K yabani tip Col-0, N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır. İlgili hatlara ait DNA moleküllerinin EcoRI restriksiyon endonükleaz ile kesimi sonucu %0,7'lik agaroz jelde büyüklüklerine göre fragmentasyonu (Solda). NS-3; *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini genomunda tek kopya halinde, NS-1 ve NS-2 ise *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini genomlarında iki kopya halinde bulunduran transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin Southern Blot profili. N; *AtNHX1* ve S; *SOS-1* genlerini genomlarında sırasıyla çift ve tek kopya halinde bulunduran tek gen transgenikleri (Sağda). Görüntülerde ZYMO RESEARCH 1 kb DNA Marker™ kullanılmıştır.

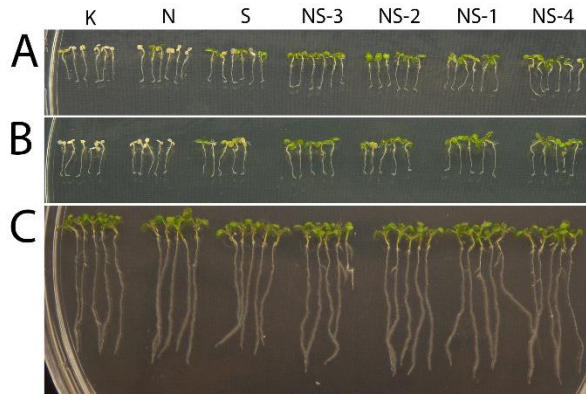
3.5. Transgenik *Arabidopsis* Bitkilerinin Bazı Fizyolojik Parametreler Yönünden İncelenmesi

3.5.1. Tuz Stresinin Kök Büyümesi Üzerine Etkileri

NS, N, S ve K kodlu bitkiler, 75 ve 100 mM gibi düşük ve 175 ve 200 mM gibi yüksek tuz konsantrasyonlarında büyütüldü. Tüm NS bitkilerinin kök uzama performansının, 75 mM NaCl içerikli besiyerindeki 14 günlük periyod sonrası düşük oranda da olsa, diğer transgenikler N, S ve yabani tip K bitkilerinden daha iyi seyrettiği gözlemlendi. Her iki geni birden aşırı ifade eden NS bitkileri arasından sadece NS-1 hattının N, S ve yabani tip K bitkilerinden önemli ölçüde farklılık gösterdiği saptandı. 100 mM NaCl içerikli besiyerinde, 14 günlük gelişim süresi sonrası NS transgeniklerinin fenotipik olarak N, S ve yabani tip K hatlarından fark edilir derecede sağlam olduğu bulundu (Şekil 28). Tuz stresi altında tüm hatların kök uzunluklarında, normal koşullara göre bir azalış tespit edildi, fakat oranlardaki bu düşüşün, çift gen transgeniklerinde, tek gen transgenikleri ve K Col-0 yabani tip kontrol bitkilerinden daha az olduğu görüldü.



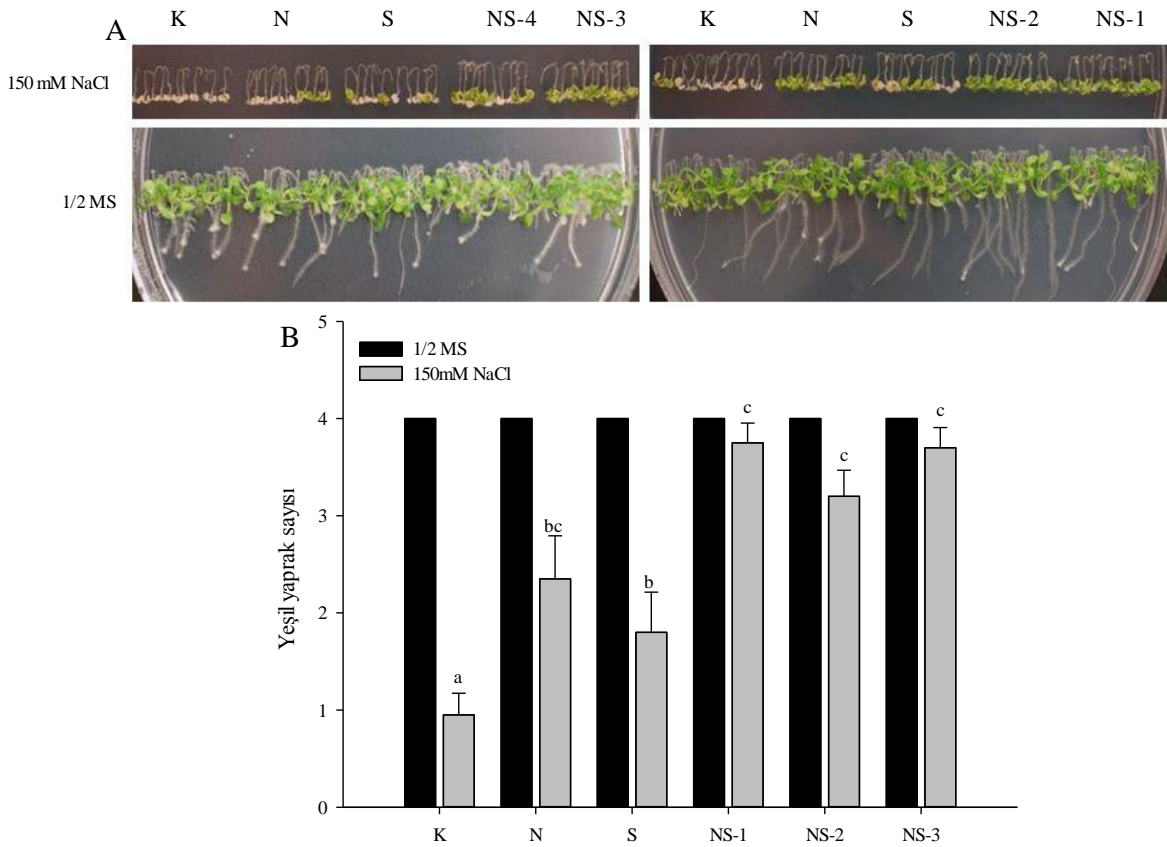
Şekil 29. Farklı konsantrasyonlardaki tuz stresi altında *Arabidopsis* kök uzunlukları. 75 mM ve 100 mM NaCl içerikli $\frac{1}{2}$ xMS besiyerinde stratifikasyondan sonraki 14.gün kök uzunluğu fenotipleri (Sırasıyla A ve B). $\frac{1}{2}$ xMS besiyerinde stratifikasyondan sonra 14 gün kontrol grubu olarak büyütülmüş hatlar (C). Transgenik ve K yabani tip *Arabidopsis* bitkilerinde 14 günlük kök uzunluğu istatistikleri (D). Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=6). a,b,c aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, $p<0,05$). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.



Şekil 30. 175 ve 200 mM NaCl stresinin *Arabidopsis* kök uzunlukları üzerine etkisi. 175 mM NaCl içerikli $\frac{1}{2}$ xMS besiyerindeki 7 günlük transgenik *Arabidopsis* (N, S ve NS hatları) ve K kontrol (A) 200 mM NaCl içerikli $\frac{1}{2}$ xMS besiyerindeki 7 günlük transgenik *Arabidopsis* (N, S ve NS hatları) ve K kontrol (B) Yalnız $\frac{1}{2}$ xMS besiyerindeki 10 günlük yabani tip kontrol bitkileri (C). 4 gün stratifikasyonun ardından 3 günlük bitkiler 175 mM ve 200 mM NaCl içerikli $\frac{1}{2}$ xMS besiyerine aktarılmıştır.

3.5.2. Tuz Stresinin Yeşil Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi

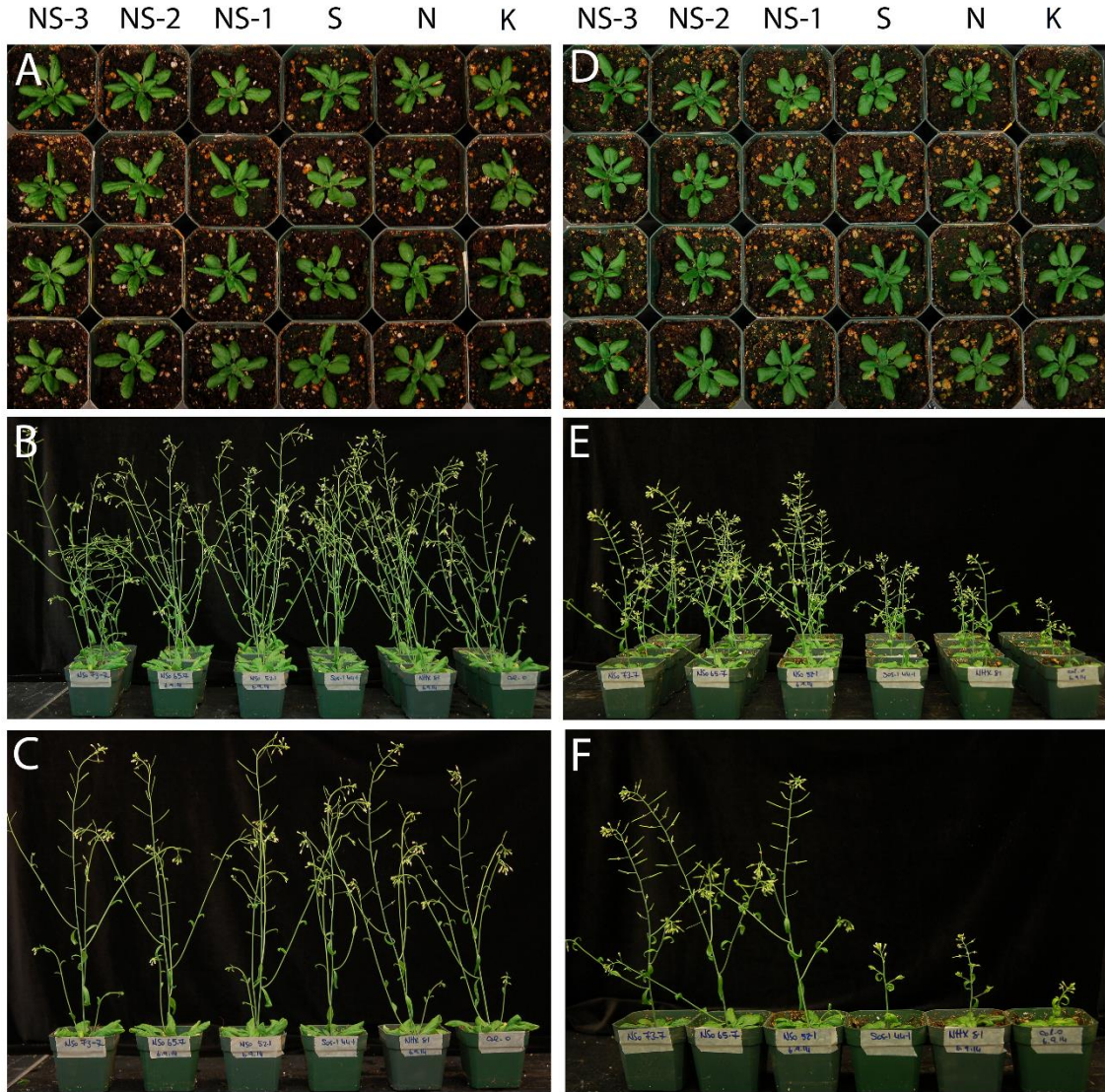
NS, N, S ve K yabancı tip *Arabidopsis* tohumları, 150 mM NaCl ve kontrol koşullarında 12 gün boyunca büyütüldü. Kontrol durumundaki hatların 12 gün sonunda eşit performans sergilediği, tuz stresi altındaki NS hatlarının ise; klorofil yıkımını gösterir işaretleri barındırmadığı tespit edildi. Bununla birlikte, K yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinin, gelişiminin 12. gününde şiddetli derecede klorozis sergilediği tespit edildi (Şekil 30). Bu veriler ile yeşil yaprak sayısı fazla olan NS transgeniklerinde stres altındaki hücresel metabolizmanın diğer hatlara göre normal olduğu gösterildi.



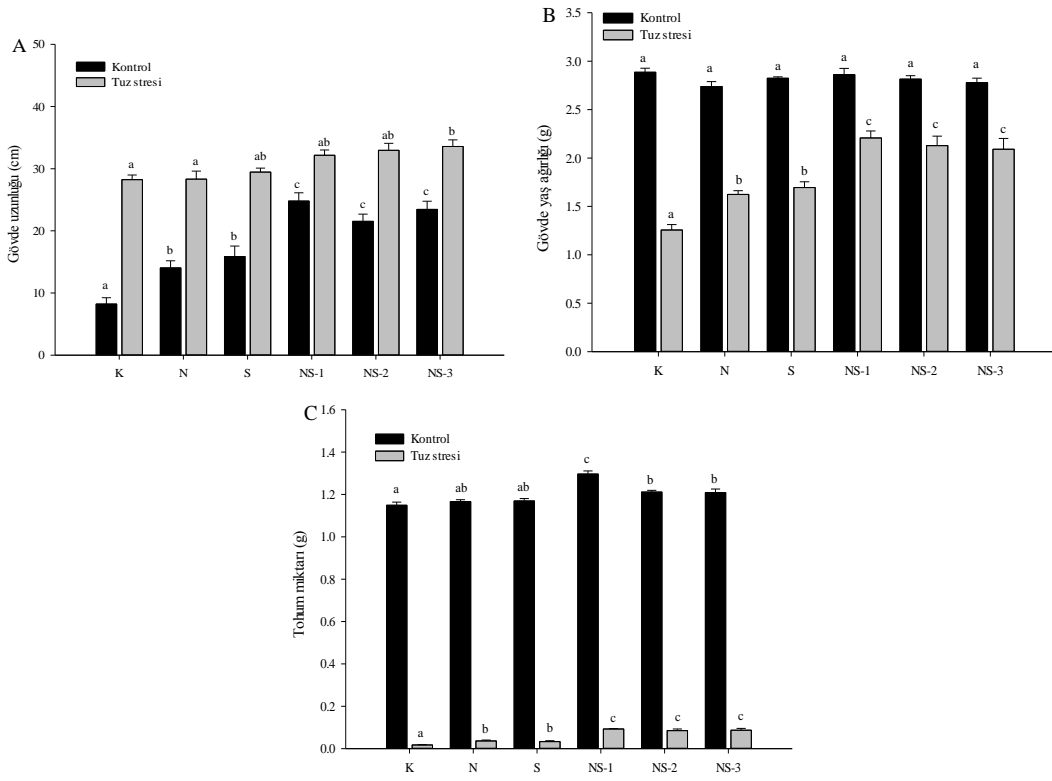
Şekil 31. 150 mM NaCl stresinin *Arabidopsis* bitkilerinde fenotip üzerine etkisi. (A) 12 günlük transgenik N, S, NS ve K yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinde canlılık istatistikleri (1/2xMS kontrol koşulu olarak kullanılmıştır) (B) Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=3). a,b,c aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, p<0,05). K yabancı tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.3. Tuz Stresinin Fenotip ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi

AtNHX1+SOS-1 genlerinin aşırı ifadesinin toprakta tuz stresi altındaki fenotipik sonuçlarını incelemek üzere; N, S, NS ve K *Arabidopsis* bitkileri, 6 haftalık olana kadar, 50 mM'dan 250 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edildi. 3 hafta boyunca 250 mM NaCl ile muamele edilen NS bitkilerinin, yüksek miktarda silikva tipi meyve ürettiği ve aynı süre boyunca iyi sulanmış kontrol bitkilerinin gövde uzunluk değerleri ile hemen hemen aynı seviyede seyrettiği tespit edildi. Tam tersi, yabani tip K *Arabidopsis* bitkileri, çok az miktarda meyve oluşumu, nekrotik solma, baskılanmış rozet yaprak gelişimi ve kısa gövde uzunluğu ile karakterize edildi. N ve S hatlarının ise, şiddetli derecede olmasa da, az miktarda meyve üretimi, kısa gövde, baskılanmış rozet yapraklar gibi, yabani tip K bitkileri ile benzer özelliklere sahip olduğu gözlemlendi. 250 mM NaCl stresi altında üretilen tohum miktarı, N, S ve K bitkilerine kıyasla çift gen transgenik NS bitkilerinde önemli ölçüde fazla bulundu. 250 mM tuz stresi altındaki NS-3 bitkilerinin K yabani tip kontrol bitkilerinden %80, sadece N bitkilerinden %56, ve S bitkilerinden %60 oranında fazla tohum ürettiği belirlendi. NS-2 ve NS-1 bitkilerinin ise; K kontrol bitkilerinden sırasıyla %78 ve %82, N bitkilerinden ise %53 ve %60, S bitkilerinden ise; %57 ve %63 oranında fazla tohum ürettiği tespit edildi. N, S ve K bitkilerinin ve hemen hemen birbirlerine yakın miktarda düşük oranda tohum ürettikleri ve N ile S bitkilerinin tohum miktarının minimum varyasyon ile birbirlerinden ayrıldığı belirlendi. Stres altındaki NS bitkilerinin, gövde yaş ağırlık ölçümleri ve gövde uzunlukları dikkate alındığında N, S ve K yabani tip bitkilerine oranla oldukça iyi performans gösterdikleri tespit edildi. Gövde uzunluğu ölçümlerinde, N ve S bitkileri, yabani tip K bitkilerinden gözle görülür derecede farklı bulundu. Kontrol durumunda ise; iyi sulanmış çift gen transgeniklerinin dahi, tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkilerinden daha uzun gövdeye sahip oldukları tespit edildi. (Şekil 31 ve 32).

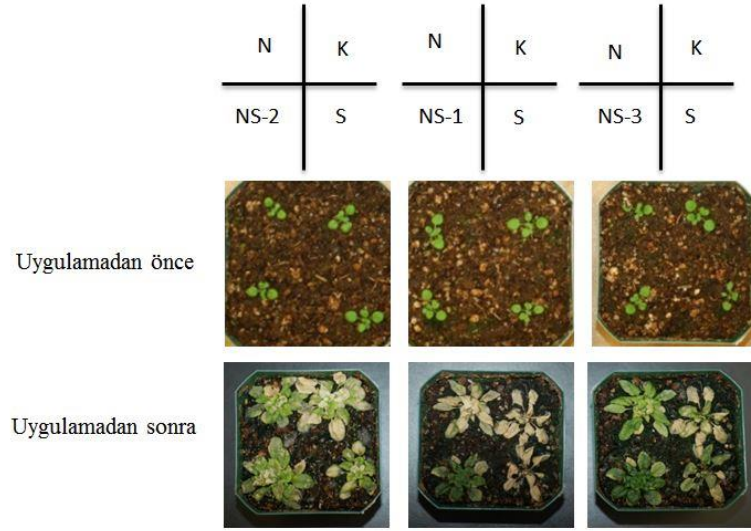


Şekil 32. 250 mM NaCl stresi altında *Arabidopsis*'teki fenotipik değişimler. 16 gün süresince 4'er gün aralıklarla 50 mM'dan 250 mM'a artan NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılmış 6 haftalık *Arabidopsis* bitkileri (E ve F). NS-1-3 *AtNHX1*+*SOS-1* çift gen transgenikleri. N (*AtNHX1*) ile S (*SOS-1*) tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkiler. Kontrol bitkileri aynı süreyle yalnızca su ile sulanmıştır (B ve C). Fotoğraflar uygulama başlamadan önce büyüme ve gelişimin 20. gününde (A ve D) ve uygulama başladıktan 3 hafta sonra büyüme ve gelişimin 41. gününde çekilmiştir (B, C, E ve F).



Şekil 33. Yabani tip ve transgenik *Arabidopsis*lerde kantitatif analizler. Büyüme ve gelişimin 41. gününde gövde uzunluğu (A), gövde yaş ağırlığı (B) ve 8 haftalık bitkilerde oluşan tohum miktarı (C). “Tuz stresi” 16 gün süresince 4'er gün aralıklarla 50 mM'dan 250 mM'a artan NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılan, “Kontrol” ise; aynı süreyle yalnızca su ile sulanan *Arabidopsis* bitkilerini simgeler. Her bir hat için tohum miktarı, 3 hafta tuz stresi uygulaması sonrası, bitkiler 2 hafta daha su ile sulanarak elde edilmiştir. Hata çubukları üç ayrı deneysel sonuçtan elde edilen standart hatayı belirtmektedir, her deneyde 12 bitki kullanılmıştır (n=12). a,b,c aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, p<0,05). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

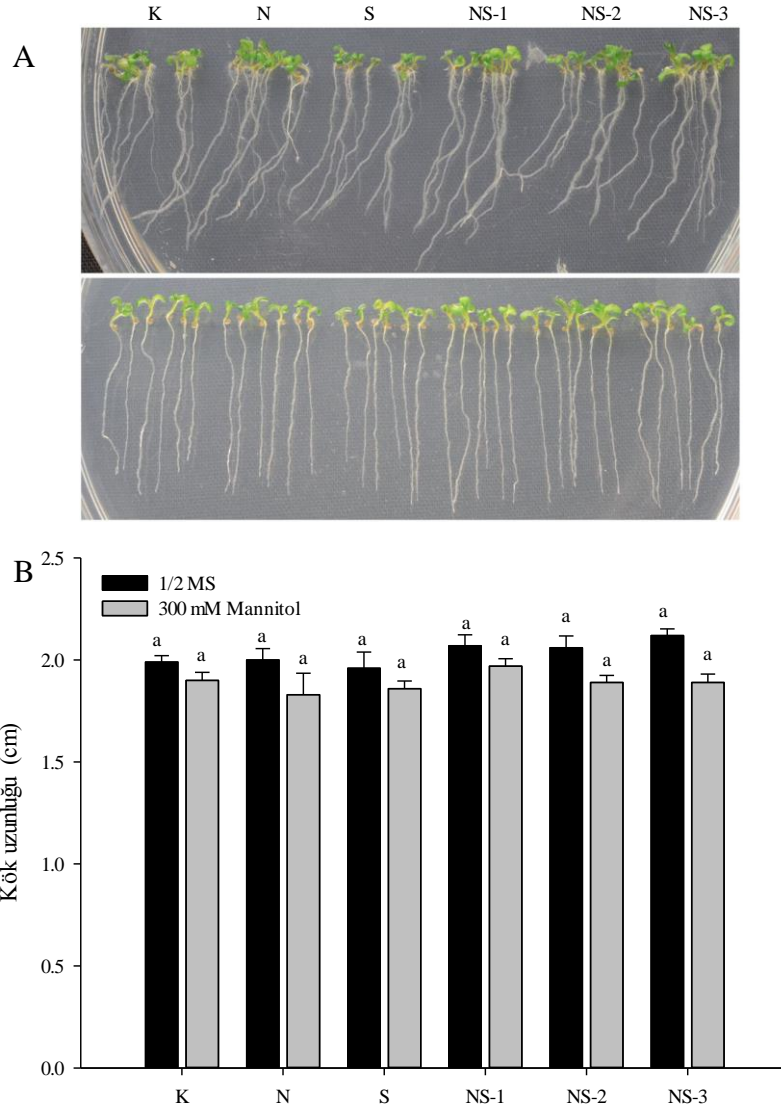
AtNHX1+SOS-1 (NS) çift gen transgenikleri, N (*AtNHX1*) ile S (*SOS-1*) tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkiler, letal sayılabilecek dozda, 300 mM NaCl varlığında aynı saksılarda 2 hafta boyunca yanyana büyütüldüklerinde ise; K yabani tip bitkilerin muameleden yaklaşık 1 hafta sonra hızlı bir nekrozis sergiledikleri, N ve S tek gen transgeniklerinin ise; klorofillerinin tamamen yıkıldığı gözlemlendi. NS bitkilerinin iki haftalık 300 mM NaCl karşısında, sadece az oranda fenotipik hasar sergileyerek, hala canlı kaldıkları tespit edildi (Şekil 33).



Şekil 34. *Arabidopsis*'te tuz stresi şoku.16 gün boyunca 4'er gün aralıklarla 300 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılmış 1 haftalık K yabani tip kontrol bitkileri ve transgenik bitkiler (üst panel). Fotoğraflar uygulama başladıktan iki hafta sonra (bitkiler üç haftalık iken) çekilmiştir (alt panel). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (overexpression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.4. *AtNHX1+SOS-1* Transgeniklerinde Fenotipin NaCl Kaynaklı Olduğunun Doğrulanması

AtNHX1+SOS-1 bitkilerinde tuz stresi altında elde edilen fenotipin NaCl dışında başka herhangi bir molekül tarafından oluşturulmadığının doğrulanması amacıyla düşük osmotik potansiyeli indükleyici özellikteki mannitol, NaCl'ye alternatif olarak seçilmiştir. *Arabidopsis* tohumları 4 günlük stratifikasyonun ardından, düşük osmotik potansiyeli indükleyici 300 mM mannitol içeren ½xMS agar besiyerinde, 40W ışık yayan floresan altında, 22 °C'de 7 gün boyunca büyütüldü. Yedi günün ardından NS, N, S ve K yabani tip bitkilerinin kök uzunlukları arasında önemli bir fark belirlenemedi. 7 gün sonunda K yabani tip kontrol bitkileri için minimum ve maksimum kök uzunluğu 1,6 cm ve 2 cm iken, N bitkileri için bu değerler 1,9 cm ile 2 cm, S bitkileri için 1,6 ve 2 cm, NS bitkileri için ise; 1,7 ve 2 cm olarak tespit edildi (Şekil 34).

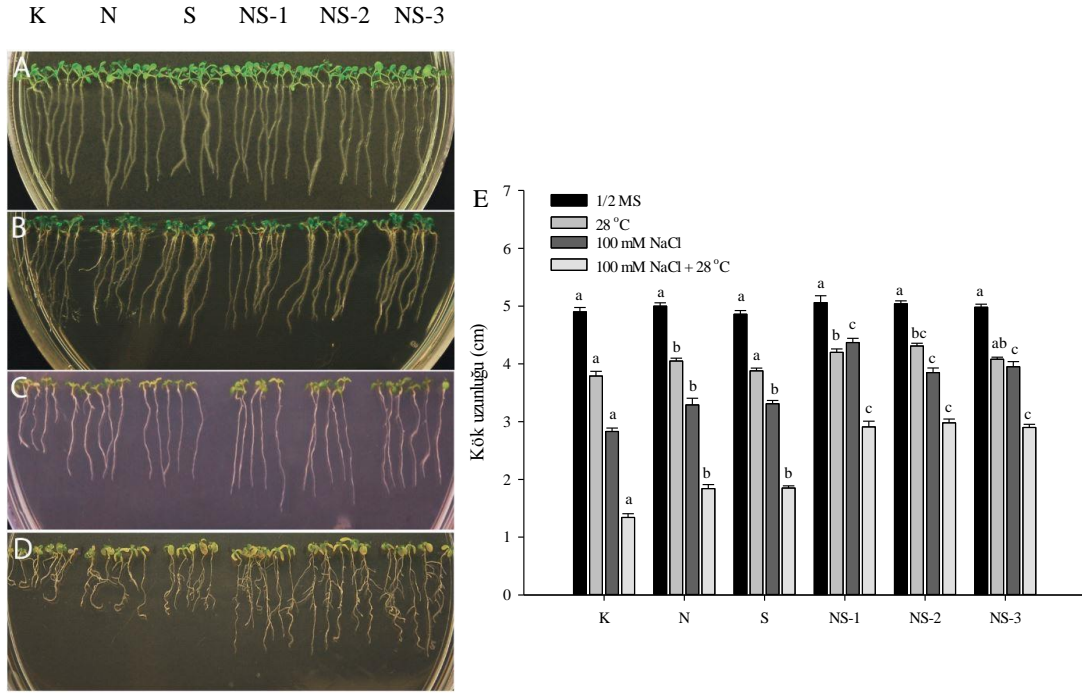


Şekil 35. *Arabidopsis* bitkilerinde osmotik stresin değerlendirilmesi. NS-1-3, N, S ve K yabani tip bitkilerin 300 mM mannitol içeren 1/2xMS agar besiyerindeki kök büyüme potansiyelleri (üstteki fotoğraf 300 mM mannitol, alttaki ise 1/2xMS kontrol besiyeri) (A) ve kök uzunlukları istatistikleri (B). Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=10). Benzer harfler (a), aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasında istatistiksel fark olmadığını belirtir (ANOVA, $p>0,05$). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.5. *AtNHX1+SOS-1* Transgeniklerinin Eş Zamanlı Sıcaklık ve Tuz Stresine Cevabı

3.5.5.1. Sıcaklık ve Tuz Stresinin Kök Büyümesi Üzerine Etkisi

AtNHX1+SOS-1 transgenikleri üzerinde, sıcaklık ve tuz stresinin kombine etkilerini tespit etmek üzere, tohumlar, stratifikasyonun ardından aktarıldıkları 100 mM NaCl içerikli ½xMS agar besiyerinde, 28°C sıcaklık muamelesiyle 9 gün boyunca büyütüldü ve her hattan gelişen bitkilerin kök uzunlukları ölçüldü. Birlikte uygulanan stres koşulları altında çift gen transgeniklerin (NS) kök uzunlukları, tek gen transgenikleri N, S ve yabani tip K kontrol bitkileri ile kıyaslandığında, aradaki farkların NS çift gen transgeniklerin lehine anlamlı olduğu tespit edildi. Sıcaklık ve tuzun kombine edildiği şartlarda, NS bitkilerinin kök uzunlukları, minimum 2,6 cm maksimum 3,3 cm olarak belirlendi. Bu değerler S için 1,8 cm ve 2 cm iken N için 1,6 cm ile 2,1 ,K kontrol bitkileri için ise 1,2 cm ve 1,7 cm olarak ölçüldü. Yalnızca tuz stresi altında ise; NS bitkilerinden N, S ve K yabani tipe doğru, kademeli bir azalış tespit edildi. Yalnızca sıcaklık stresinin hakim olduğu koşulda ise; hatlar arasında önemli kök uzunluk varyasyonlarına rastlanmadı (Şekil 35). Ayrıca NS çift gen transgeniklerin lateral kök yoğunlukları; N, S ve K yabani tip bitkilere göre çok daha fazla bulundu.



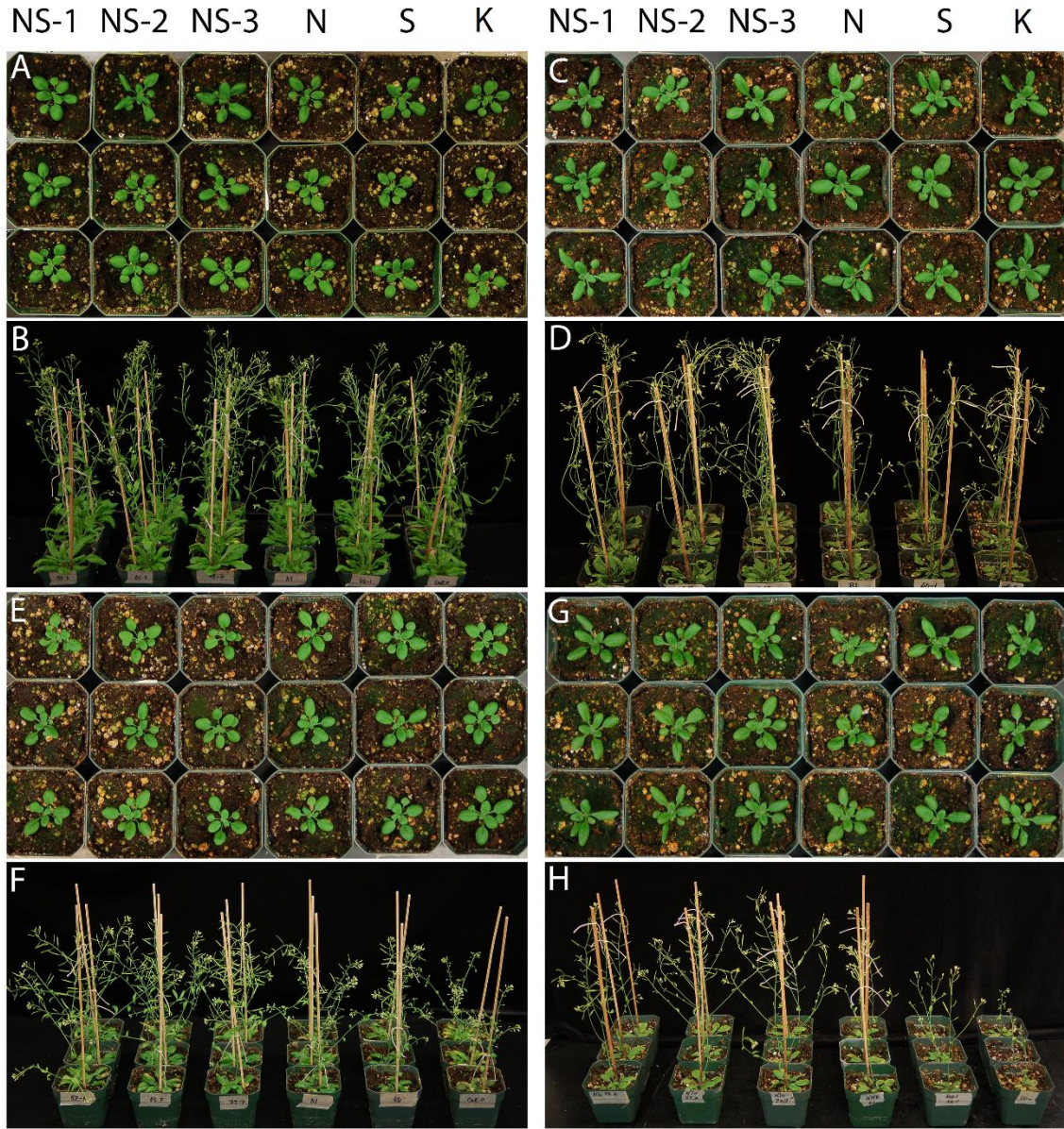
Şekil 36. Kombine stres altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde kök uzunlukları. NS-1-3, N, S ve K yabani tip bitkilerin 1/2xMS agar besiyerinde (A), 28°C sıcak koşullarda (B), 100 mM NaCl varlığında (C) ve 28°C ile 100 mM NaCl stresinin kombine edildiği durumdaki kıyaslamalı kök gelişimi (D ve E). Stres 4 günlük stratifikasyondan sonra 9 gün süresince uygulanmıştır. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=3). Farklı harfler (a, b, c) aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, $p < 0,05$). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *OS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.5.2. Sıcaklık ve Tuz Stresinin Fenotip ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi

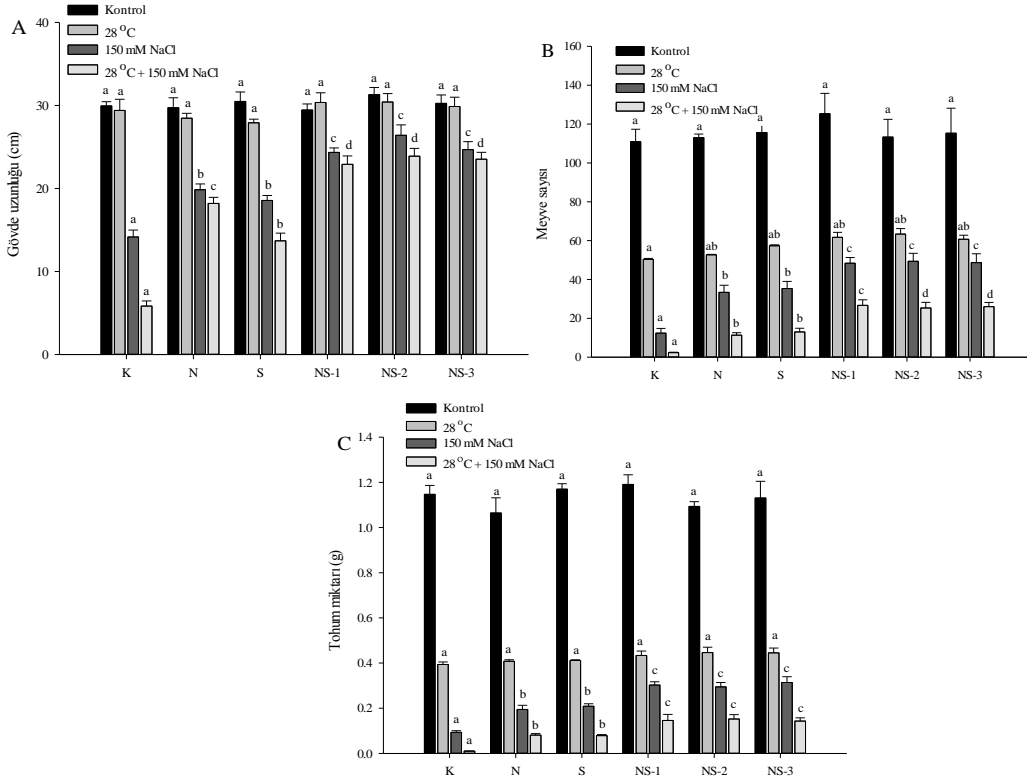
AtNHX1+SOS-1 genlerinin aşırı ifadesinin, toprakta tuz stresi ve sıcaklık stresinin birlikte uygulandığı durumda meydana getireceği fenotipleri incelemek üzere N, S, NS ve K *Arabidopsis* bitkileri 6 haftalık olana kadar, 28°C sıcaklık ve 50 mM'dan 150 mM'a kadar 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edildi (Stres başlatılmadan evvel tüm hatlar benzer rozet yaprak ebatlarına sahipti). Sıcaklık ve tuz stresinin birlikte uygulandığı durumda büyütülen NS-1-2-3 *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerinin, yoğun lateral dallanma ve gövde uzunluğu ile karakterize, güçlü gövdeler ve geniş rozet yapraklar oluşturduğu gözlemlendi.

N (*AtNHX1*) tek gen transgeniklerinin, S (*SOS-1*) tek gen transgeniklerine göre; yan dallanma ve gövde uzunluğu bakımından gözle görülür derecede iyi performans sergilediği

tespit edildi. Yalnızca 150 mM tuz stresi altında büyütülen bitkilerin, 250 mM tuz stresi uygulanmış gruplardaki profile benzer bir profil oluşturdukları saptandı. Yalnızca sıcaklık stresi ile birlikte büyütülen *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerinin, meyve ve tohum miktarı ile gövde uzunluğu bakımından, kalan üç gruptan farklı olarak, orta derecede gelişmeler sergilediği bulundu (Şekil 36 ve 37). 150 mM tuz stresi altında NS-1 bitkilerinin, yabancı tip K kontrol, N ve S bitkilerinden sırasıyla %68, %35,%31 daha fazla tohum ürettiği belirlendi. NS-2 bitkileri ise K kontrol, N ve S bitkilerinden sırasıyla %67 ,%33 ve %29 oranında, NS-3 bitkileri ise %69, %37 ve %33 oranında daha fazla tohum ürettikleri tespit edildi. 28°C sıcaklık ve 150 mM tuz stresi altında ise; tohum miktarı NS-1 bitkileri için, K yabancı tip bitkilere göre %91 fazla, N bitkilerine göre %44 ve S bitkilerine göre %46 fazla bulundu. Aynı oranlar NS-2 ve NS-3 bitkileri için sırasıyla %93, %46, %48 ve %93, %44 ve %46 fazla olarak belirlendi. Bitkiler silikva tipi meyve üretimi bakımından kıyaslandığında ise; yalnızca 150 mM tuz stresi altında NS-3, NS-2 ve NS-1 N bitkilerinden sırasıyla %32 S bitkilerinden ise; %28 oranında fazla meyve ürettiği, 28°C sıcaklık ve 150 mM tuz konsantrasyonunun kombine edildiği durumda ise; NS-3, NS-2 ve NS-1 bitkilerinin, N bitkilerinden sırasıyla %57, S bitkilerinden ise %47 ve K kontrol bitkilerinden ise %90 oranında fazla meyve ürettiği tespit edildi.Yalnızca 28°C sıcaklık stresinin uygulandığı durumda ise; NS-3, NS-2 ve NS-1 bitkileri, N bitkilerinden %14, S bitkilerinden %5 ve K kontrol bitkilerinden ise %17 civarında fazla meyve ürettiği bulundu.



Şekil 37. Tuz ve sıcaklık eş zamanlı streslerinin *Arabidopsis*'lerde fenotipe etkisi. NS-1-3 *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgenikleri, N (*AtNHX1*) ile S (*SOS-1*) tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkilerdir. Uygulamadan önce 3 haftalık *Arabidopsis* bitkileri (A, C, E ve G). 42. günde (6 haftalık) iyi sulanmış kontrol grubu bitkileri (B). 21 gün boyunca yalnızca 28°C sıcaklık uygulaması yapılmış bitkiler (D). Yalnızca 50 mM'dan 150 mM'a kadar 4 gün ara ile 50 mM farkla artan NaCl konsantrasyonları ile muamele edilmiş *Arabidopsis* bitkileri (F) 21 gün boyunca 28°C sıcaklık ile beraber 50 mM'dan 150 mM'a kadar, 4 gün ara ile 50 mM farkla artan tuz stresi uygulanmış bitkiler (H).

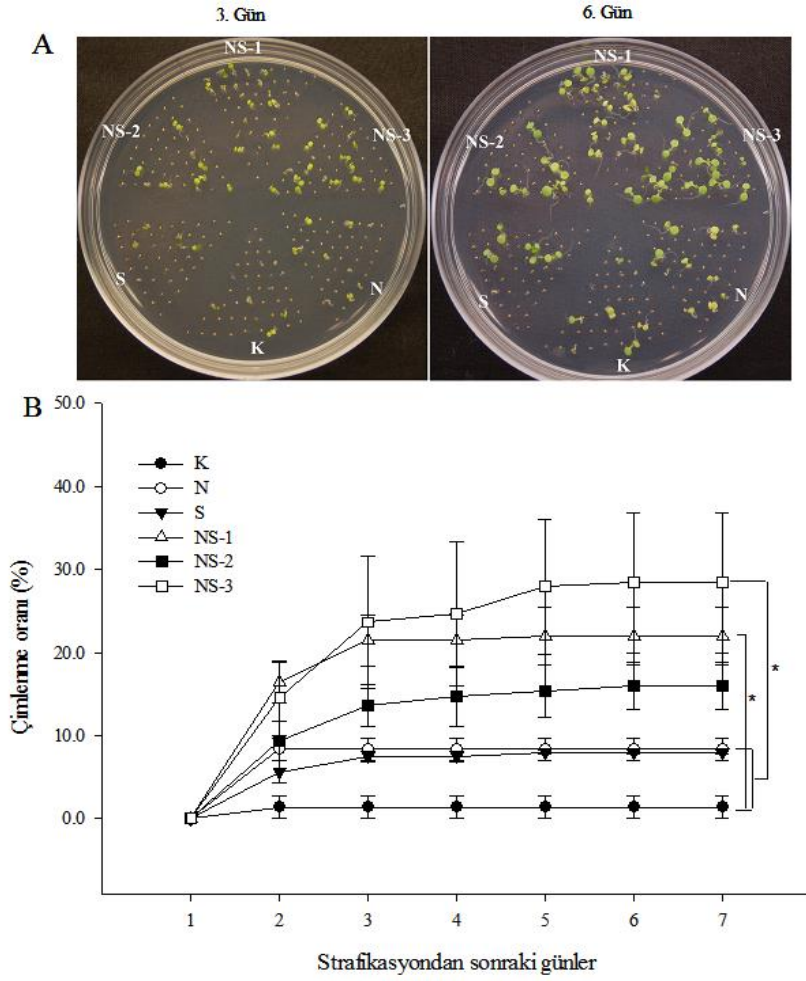


Şekil 38. Sıcaklık ve tuz stresinin *Arabidopsis* bitkilerinin kantitatif özellikleri üzerine kombine etkisi. Bitkilere 3 hafta boyunca 28°C sıcaklık ile birlikte, 50 mM'dan 150 mM'a kadar 4 gün ara ile 50 mM farkla artan tuz stresi kombine edilerek uygulanmıştır. Grafiklerde farklı gruplar arasındaki gövde uzunlukları (A), silikva meyve (B) ve tohum miktarındaki (C) değişimler gösterilmiştir. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=3). Tohum miktarı ve meyve sayısı bitki başına olacak şekilde ifade edilmiştir. Farklı harfler (a, b, c) aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, p<0,05). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.6. Tuz Stresinin Çimlenme Potansiyeline Etkisi

250 mM NaCl muamele edilmiş bitkilerden toplanan tohumlar, çimlenme potansiyellerini ölçmek amacıyla ½xMS agar petrilere ekilip, her bir tohumun çimlenmesi radikulanın görünür hale geldiği an referans kabul edilerek, 7 gün boyunca çimlenme kabiliyetlerine göre değerlendirildi. Yaklaşık tüm K yabani tip tohumları 6. güne kadar çimlenemezken, bazı N (*AtNHX1*) ve S (*SOS-1*) tek gen transgenik tohumlarının zayıf morfo-fizyolojik göstergelerle olsa da, belli oranda çimlenebildiği tespit edildi. Bunların aksine, NS *AtNHX1*+*SOS-1* çift gen transgeniklerinin başarılı bir şekilde çimlendiği bulundu (Şekil 38). Yedi günün sonunda, NS-3 tohumlarının %30'a yakınının çimlendiği ve, K

kontrol tohumlarından % 95, N tohumlarından % 70 ve S tohumlarından %71 oranında fazla çimlendiği gözlemlendi. NS-2 ve NS-3'ün ise K kontrol tohumlarından sırasıyla %91 ve %93, N tohumlarından %47 ve %61, S tohumlarından ise %50 ve %63 oranında fazla çimlendiği tespit edildi. 15 gün sonra dahi, K yabancı tip bitkilerde ekstra çimlenme gözlenmediği, fakat NS *AtNHX1*+*SOS-1* çift gen transgeniklerinin %90 çimlenme başarısı sergilediği saptandı.



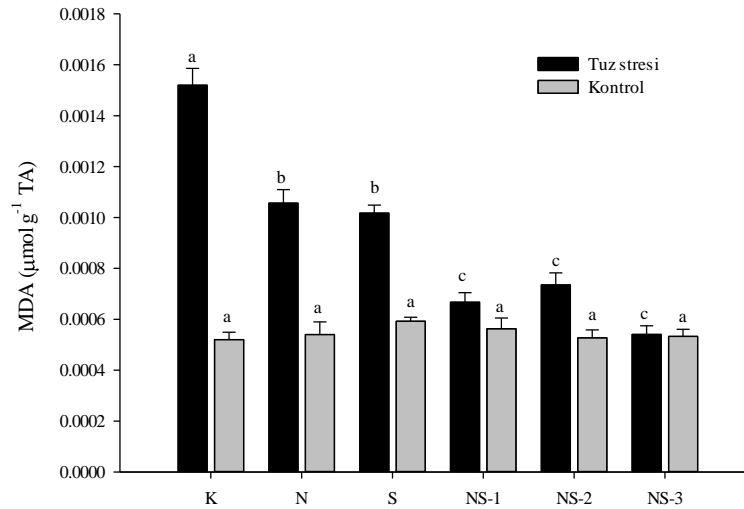
Şekil 39. 250 mM NaCl stresinin *Arabidopsis* tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi. (A). Fotoğraflar stratifikasyondan sonraki 3. ve 6. günde çekilmiştir. K yabancı tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır. Çimlenme yüzdesi imbibisyonun ardından çimlenen tohum sayısının, toplam tohum sayısına oranlanmasıyla belirlenmiştir (B). Hata çubukları standart sapmayı belirtmektedir. Üç farklı deney yapılmış ve her bir hat için ilgili bölmeye 45 adet tohum yerleştirilmiştir (n=45) ve ilgili günde çimlenen tohum sayısı toplam tohum sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak hesaplanmıştır.* Aynı günde NS-1, NS-2 ve NS-3 ile N, S ve K arasındaki farkı belirtir (*t*-test, $p < 0,05$).

3.5.7. Tuz Stresinin MDA Miktarı ile İlişkisi

AtNHX1+SOS-1 çift gen transgeniklerinin 250 mM NaCl varlığındaki membran sağlamlığının derecesini anlamak için, iyi sulanmış koşullar ve tuz stresi altındaki *Arabidopsis* bitkileri karşılaştırıldı. Kontrol durumundaki bitkilerde biriken malondialdehit miktarında önemli bir varyasyona rastlanmadı. Fakat, tuz stresi altında MDA miktarında *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerinden K yabani tip bitkilere doğru, dereceli bir azalma tespit edildi. K yabani tip bitkilerin en yüksek oranda MDA içeriğine sahip iken; N (*AtNHX1*) ile S (*SOS-1*) tek gen transgeniklerinin K yabani tip bitkilere göre, yaklaşık %30 daha az MDA biriktirdiği belirlendi.

N bitkilerindeki lipid oksidasyon oranının NS-3'den %95, NS-2'den %43 ve NS-1'den %58 daha fazla olduğu bulundu. S bitkilerindeki lipid oksidasyon oranının ise, NS-3'den %88, NS-2'den %38 ve NS-1'den %52 oranında fazla olduğu belirlendi.

AtNHX1+SOS-1 çift gen transgeniklerinin ise; hem tek gen transgeniklerinden, hem de K bitkilerden, MDA birikimi bakımından daha iyi performans gösterdiği belirlendi. NS hatları arasında en fazla MDA birikimi NS-2'de, en az birikim ise; K bitkilerin 1/3'ü ve NS bitkilerinin yaklaşık yarısı kadar olacak şekilde NS-3'te gözlemlendi (Şekil 39).



Şekil 40. Tuz stresi altında *Arabidopsis* yapraklarında MDA birikimi. Bitkiler 3 hafta boyunca 50 mM'dan 250 mM'a artan NaCl uygulamasına maruz bırakılmıştır. MDA miktarı taze ağırlık (TA) olarak hesaplanmıştır. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=6). Farklı harfler (a, b, c) aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, p<0,05). K yabani tip Col-0, N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

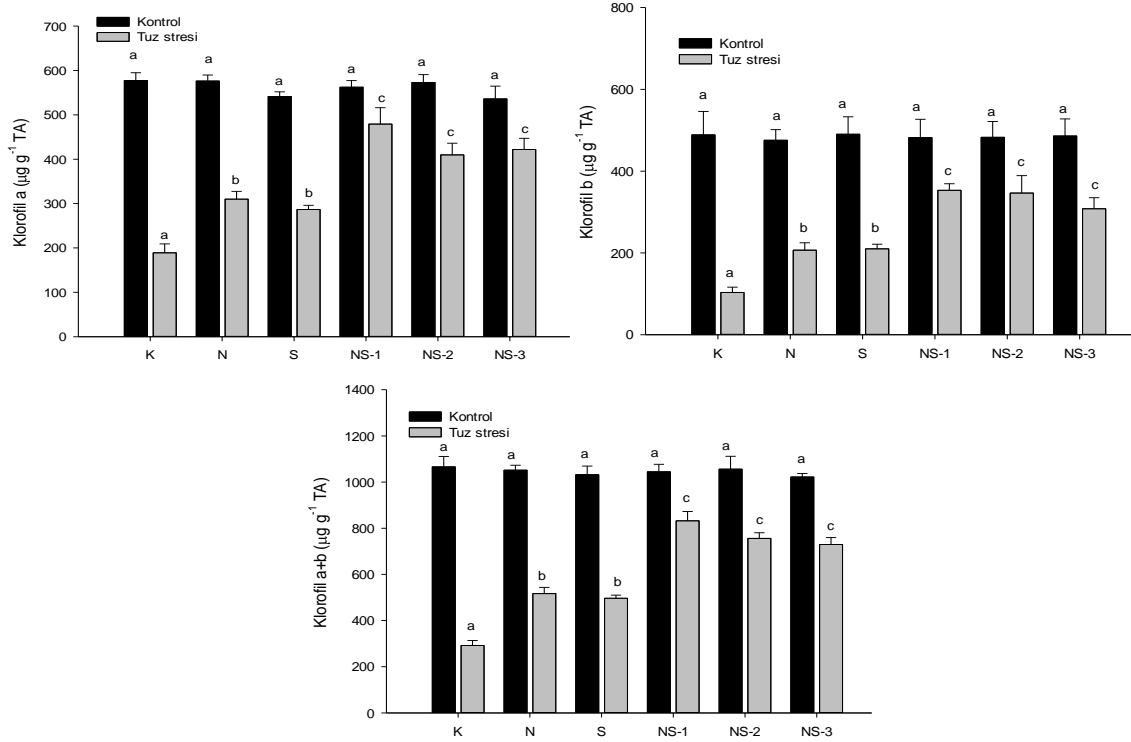
3.5.8. Tuz Stresinin Klorofil Miktarı ile İlişkisi

Yüksek tuz stresinin fotosentetik kapasite üzerine etkisi, yapraklardaki klorofil içeriği (a, b ve a+b) ölçülerek belirlendi. K yabani tip bitkilerde ve transgenik *Arabidopsis*lerde 250 mM stresin ardından klorofil miktarında azalma gözlemlendi. Fakat miktardaki bu düşüşün, transgeniklerde daha az oranda seyrettiği bulundu. Klorofil a, b ve a+b konsantrasyonları *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerinin K yabani tip bitkilere göre %70-100 oranında daha iyi performans sergilediğini gösterdi. N (*AtNHX1*) ile S (*SOS-1*) hatları klorofil içeriği bakımından az oranda varyasyon göstermesine rağmen, her ikisi de K yabani tipten daha iyi durumda bulundu. Fakat NS bitkileri için klorofil miktarı diğer hatlardan daha fazla olarak belirlendi (Şekil 40). Bunun dışında, 175 ve 200 mM NaCl içerikli besiyerlerinde, 7 gün büyütülen çift gen transgeniklerinin (NS hatları), tek gen transgenikleri N ve S hatlarına göre, yok denecek kadar az klorofil yıkımı sergilediği tespit edildi. Aynı stres koşullarındaki K yabani bitkilerin ise; tamamen ölü bazı organlara sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 29).

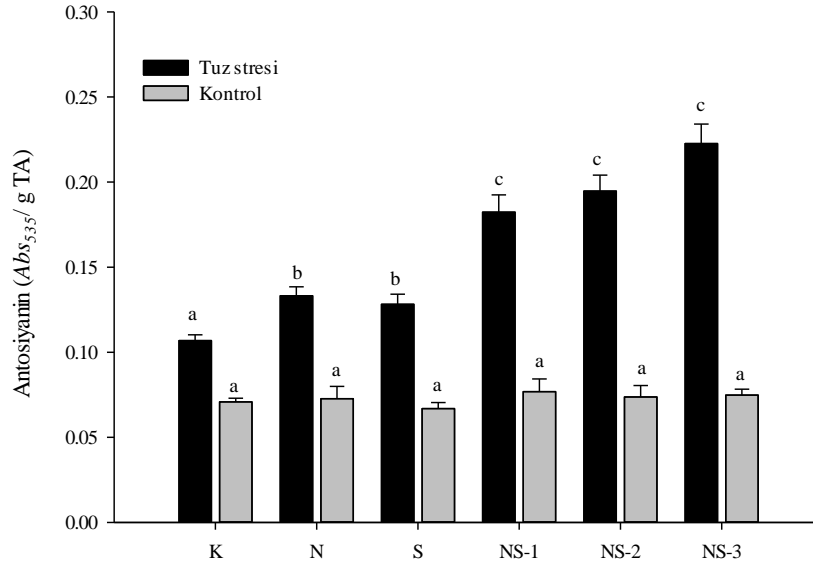
3.5.9. Tuz Stresinin Antosiyanin İçeriği ile İlişkisi

Antosiyanin içeriği bitkilerin radikal uzaklaştırma potansiyelleri açısından değerlendirilmek üzere bir markör olarak kullanıldı. *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerinde antosiyanin birikiminin yüksek seviyelerde olduğu gözlemlendi, bunların arasında en yüksek seviye NS-3 bitkilerinde tespit edildi. NS-3 bitkilerinde antosiyanin içeriği K kontrol bitkilerinden %52, N bitkilerinden % 40 ve S bitkilerinden % 42 fazla bulundu. NS-2 ve NS-1 bitkilerindeki antosiyanin içeriği, K kontrol bitkilerinden sırasıyla % 45 ve % 41, N bitkilerinden ise % 31 ve % 26 ve S bitkilerinden ise; % 34 ve %29 fazla bulundu.

N (*AtNHX1*) ve S (*SOS-1*) hatlarının benzer seviyelerde antosiyanin içeriğine sahip olduğu fakat NS bitkilerinden daha düşük seviyede birikim yaptıkları belirlendi. K yabani tip bitkilerinin ise antosiyanin içeriği bakımından en son sırada yer aldığı saptandı (Şekil 41).



Şekil 41. Tuz stresi altında *Arabidopsis* yapraklarında klorofil içeriğindeki değişimler. Transgenik ve K *Arabidopsis* kontrol şbitkileri 3 hafta 3 hafta boyunca 50 mM'dan 250 mM'a artan NaCl uygulamasına maruz bırakılmıştır. A; klorofil a, B; klorofil b, C; toplam klorofil (a+b) miktarı ölçümleridir. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=6). a,b, c aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, $p < 0,05$). K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

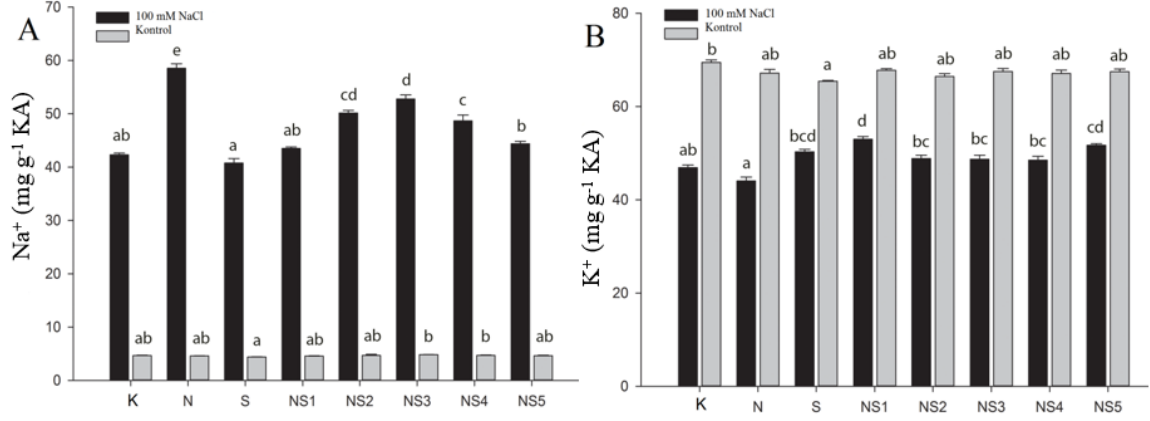


Şekil 42. Tuz stresinde *Arabidopsis* yapraklarında antosiyanin miktarındaki değişimler. Transgenik ve K *Arabidopsis* bitkileri 3 hafta boyunca 50 mM'dan 250 mM'a artan NaCl uygulamasına maruz bırakılmıştır. 535 nm'de (A_{535}) okunan absorbans değerleri, her bir hat için g/taze ağırlık (TA) olarak belirtilmiştir. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir ($n=6$). a,b,c aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, $p<0,05$). K yabancı tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

3.5.10. Tuz Stresinin Na^+ ve K^+ Konsantrasyonları ile İlişkisi

AtNHX1 ve *SOS-1* aşırı ifadesinin, çift gen transgenik bitkilerdeki Na^+ ve K^+ iyon konsantrasyonlarında, tek gen transgenikleri ve K yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerine nazaran, herhangi bir değişime sebep olup olmadığını görmek adına, 1 haftalık 100 mM NaCl stresi altında, bahsi geçen iyonların miktarı ölçüldü. NS-1-5 çift gen transgeniklerinin, K yabancı tip kontrol bitkilerine göre daha fazla Na^+ ve K^+ biriktirdikleri tespit edildi. Kontrol durumundaki Na^+ ölçümlerinde, hatlar arasında hemen hiç varyasyon gözlenmezken, *AtNHX1* tek gen transgeniklerinde, tüm hatlardan daha fazla oranda Na^+ konsantrasyonuna rastlandı. K^+ konsantrasyonunun *SOS-1* tek gen transgeniklerinde (S), K ve *AtNHX1* tek gen transgeniklerine göre (N), daha yüksek bulundu. *AtNHX1* tek gen transgeniklerinin K^+ iyon konsantrasyonu bakımından en az miktara sahip olduğu tespit edildi. NS-2-3 ve 4'ün *SOS-1* tek gen transgenikleri ile benzer oranda K^+ içeriğine sahip oldukları belirlendi. İyi sulanmış

kontrol durumunda ise; transgenik *Arabidopsis*ler ve K yabani tip kontrol bitkileri arasında fazla varyasyon tespit edilemedi (Şekil 42).



Şekil 43. *Arabidopsis* yapraklarında tuz stresi altında Na⁺ (A) ve K⁺ (B) konsantrasyonları. Tuz stresi, 2 haftalık bitkilere 1 hafta 100 mM NaCl muamelesi şeklinde uygulanmıştır. Hata çubukları standart hatayı belirtmektedir (n=3). a, b,c,d aynı koşullar altında bulunan *Arabidopsis* hatları arasındaki istatistiksel farkı belirtir (Tukey, p<0,05). Değerler, her bir hat için g/kuru ağırlık (KA) olarak belirtilmiştir. K yabani tip Col-0 N; yalnız *AtNHX1* genini, S; yalnız *SOS-1* genini ve NS-1, NS-2, NS-3, NS-4 ve NS-5 hatları; her iki geni birden aynı anda aşırı ifade eden (over-expression) *Arabidopsis* hatlarıdır.

4. TARTIŞMA

Dünya, tuzluluk problemi olan bir gezegendir fakat; yeryüzünde 400 mM'dan fazla tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen bitkiler (halofitler), bu miktarları tolere edemeyenlere göre oldukça azdır (Flowers, 2004). Yeryüzü yüzey alanının artan sıcaklığı, yağış rejimlerini değiştirmiş, bu durum birçok bölgede ekstrem hava şartlarının daha sık oluşmasını tetiklemiştir. Dünya popülasyonundaki artışın da bu etmenlere eklenmesiyle, uzun vadede yiyecek ihtiyacının karşılanması önemli bir hedef haline gelmiştir. Bu koşullarda bitkilerde tohum verimi ve miktarını etkileyen tuz ve sıcaklık stresi gibi eş zamanlı streslere tolerans için, çoklu genler kullanılarak, etkili ve hızlı genetik stratejiler geliştirmek zorunludur.

Bitki ıslahı, içinde bulunduğumuz yüzyılda, tuzluluğa toleranslı varyeteler geliştirilmesine yönelik çalışmalarla gündemde yerini almıştır. Fakat; kaliteli tohum üretebilme amaçlı (tohum ıslahı) yapılacak çalışmalar, özellikle yiyecek olarak kullanılan bitkilerdeki dar genetik çeşitlilik engeline takılmaktadır. Strese toleransta kullanılacak gen havuzundaki kısıtlamalara rağmen, moleküler klonlama sayesinde, artık aynı anda birkaç geni birlikte taşıyan vektörlerin oluşturulması rutin bir hal almış (Schmidt vd., 2008) ve bu metodların tamamı (birtakım avantaj ve dezavantajlarıyla) iki ya da daha fazla genin farklı türlerde ifadesini geçmişte başarılı kılmıştır (Naqvi vd., 2010).

Mevcut çalışmamızda olduğu gibi, ard arda düzenlenmiş, farklı bir organizmadan değil, tamamen bitki orijinli iki geni taşıyan tek bir vektör oluşturulması, geleneksel çaprazlama yöntemlerine kıyasla, sadece bir defalık transformasyon gerektiren bir yöntemdir. Oluşan potansiyel transgenik bitkiler, antibiyotik direnci taşıyıp taşımadıklarına göre, Mendel segregasyon analizi ile homozigotluk bakımından taranır ve bu tarama diğer yöntemlere kıyasla daha az iş gücü gerektirir. Ayrıca, transferi yapılan genler arasındaki fonksiyonel benzerlik, ifadelerinin benzer yollarla koordine edilebileceğini ve farklı *Arabidopsis* nesillerinde her iki genin aynı anda ifade edildiği transgenik hatları yakalama ihtimalinin yüksek olabileceğini gösterir. (Rukavtsova vd., 2013). Bu öneriyi destekler şekilde, mevcut çalışmada her iki trans geni taşıyan 39 adet homozigot hat tespit edilmesi, yöntemin etkinliğine işaret eder.

Çalışmada; *Arabidopsis AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin, tuz stresi altında, tohum miktarı ile meyve üretim kapasitesini iyileştirmek ve stres toleransını arttırmak amacıyla, *Arabidopsis* bitkisinde ifadeleri arttırılmıştır. Küresel ısınmanın olumsuz etkileri göz önünde

bulundurulup; ışık, ağır metal, radyasyon gibi diğer abiyotik streslerdense, ek çevresel stres çeşidi olarak sıcaklık stresi seçilmiştir. Bu sayede laboratuvar ortamında gerçek doğa şartları oluşturulmaya çalışılmış ve sıcaklık stresinin tuz stresi ile birlikte uygulandığı koşullar test edilmiştir.

Geçmiş yıllarda her iki gen ile ayrı ayrı yapılmış çalışmalar olmakla beraber, her iki genin aynı anda kullanıldığı bu çalışma literatürde bir ilktir. Bu iki genin eş zamanlı ifadesinin, test edilen tüm *Arabidopsis* çift gen transgeniklerinde, uygulanan 28°C sıcaklıkla beraber etkileri ağırlaşan koşullarda dahi, tuz stresine toleransı arttırdığı gösterilmiştir. Stres durumunda tüm çift gen transgeniklerinde, tohum ve meyve üretimi kapasitesi, kök ve gövde uzunluğu, gövde yaş ağırlığı, antosiyanin ve klorofil miktarının arttığı, MDA birikimi ile karakterize lipid peroksidasyonunun az oranda meydana geldiği, dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılma potansiyelinin fazla olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonları ölçülerek, çift gen transgeniklerinde Na ve Cl iyonlarının meydana getirdiği hasarın (kontrol bitkilerinde klorofil yıkımının fazla bulunması bu hasarı gösterir) kontrol gruplarına göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; NaCl dışında bitkilerde osmotik stres oluşturan bir başka ajan olarak mannitol kullanılmış, ve tuz stresi altında çift gen transgeniklerinde elde edilen fenotipin (yabani tip ve diğer tüm transgenik hatların kök uzunluğunda herhangi bir fark gözlenmemesi sebebi ile) herhangi başka bir molekül değil, NaCl kaynaklı olduğu gösterilmiştir.

1996 yılından bu yana, çoklu gen aktarımı yapılan bitki biyoteknolojisi çalışmalarının neredeyse üçte biri, farklı genleri taşıyan tek bir vektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çoklu gen transfer çalışmalarının %50'den fazlası, abiyotik strese tolerans kazandırma üzerine odaklanan çalışmalardır. Örneğin; *SOS-1*, *SOS2* ve *SOS3* genlerinin eş zamanlı ifadesi ile, tuza tolerans arttırılmış (Yang vd., 2009), *TsVP* ve *Beta* genlerinin aktarılması, mısır bitkilerinde kuraklık tolerans kapasitesini iyileştirmiştir (Wei vd., 2011). Ayrıca, *AtbHLH17* ve *AtWRKY28* genlerinin aşırı ifadesinin tuz, kuraklık ve oksidatif streslere eş zamanlı direnç kazandırdığı ortaya çıkarılmıştır (Babitha vd., 2013).

İleri teknolojiye rağmen, şu ana kadar stresi kontrol eden gen ağlarındaki genlerden herhangi biri, ya da aynı anda birkaçı, dışarıdan aşırı ifade ettirilerek stres toleransı geliştirilmiş bitkilerin, gerçek tarımsal koşullarda denendiği ve tarladaki tohum verim ve kalitesinin arttırıldığını gösteren çalışmalar nadirdir. Örneğin; sitokinin biyosentezinde görevli bir enzim olan izopentenil transferaz geninin pamuk (*Gossypium hirsutum*) bitkisindeki ifadesi laboratuvar koşullarının yanı sıra, tarla koşullarında da denenmiş ve

kuraklık stresi altındaki rejenerasyon kabiliyetlerinin, kontrol bitkilerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Qin vd., 2011) Bir başka çalışmada; *Arabidopsis*'in vakuolar H^+ pirofosfataz geni olan *AVPI*'in, yerfistiğine aktarıldığı sınırlı sulama koşullarında dahi, bitkilerin %37 daha fazla tohum oluşturma kapasitesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Qin vd., 2013).

Her ne kadar bu tip çalışmalar, toprak analiz verileri değerlendirilerek, toprak suyundaki temel iyon konsantrasyonlarının (Na^+ , Mg^{+2} , Cl^- ve SO_4^- gibi) belirlenmesinin ardından yapıldığında daha sağlam temellere oturacaksa da, mevcut çalışmamızda kullanılan genlerin sıcaklık ve tuz stresleriyle etkilenmiş gerçek tarımsal koşullarda, tarladaki zirai ürünlerin tohum verim ve kalitesini arttırmada kullanılacak aday genler olduğu öngörülmektedir. Keza *SOS-1* geninin Shi vd. (2000) tarafından *Arabidopsis*'te tanımlanmasının ardından 2007 yılında çeltikte (Martinez-Atienza vd., 2007), 2008'de buğdayda (Xu vd., 2008) 2009'da domates bitkisi ile (Olias vd., 2009) *Thellugiella halophila*'da (Oh vd., 2009) ve 2010'da *Physcomitrella patens* yosununda (Fraile-Escanciano vd., 2010) olmak üzere bir dizi çalışmada karakterize edilmiş, ve bu genin ksilem ve gövdede Na^+ akümülyasyonunu kısıtlayarak, tuza tolerans sağladığı tespit edilmiştir. Son olarak Yue vd. (2012) ilgili genin aşırı ifade edildiğinde, transgenik tütün bitkisinde yüksek K^+/Na^+ dengesini koruyarak, tuz stresine tolerans sağladığını rapor etmişlerdir. *SOS-1* Na iyonlarını sitoplazmadan apoplasta gönderen ve şu ana kadar bitkilerde tanımlanmış tek plazma zar proteini olup, bu genin çalışıldığı literatürler yukarıda belirtilenler ile kısıtlıdır.

AtNHX1 ise, *SOS-1* ile kıyaslandığında, literatürde *AtNHX1* geni hakkında çok daha fazla sayıda çalışma olduğu bilinmektedir. Fonksiyonu 1999'da "Science" dergisinde yayınlanan bir çalışma ile keşfedildikten sonra (Apse vd., 1999), Zhang vd. (2001) *Arabidopsis AtNHX1* genini *Brassica napus* bitkisine aktardıklarında, 200 mM NaCl stresi muamelesiyle dahi, büyüme, çiçeklenme ve tohum üretebilme kapasitesinin arttığını, aktarılan genin aktivitesi ile tuzun toksik etkilerinin, prolin birikimi üzerinden hafifletildiğini rapor etmişlerdir. Aynı yıl sözkonusu gen, domates bitkisine (*Lycopersicon esculentum*) aktarıldığında, kofuldaki Na^+/H^+ taşıyıcısının aktivitesi uyarılarak büyüme, çiçeklenme ve tohum üretiminin artırılması sağlanmıştır (Zhang ve Blumwald, 2001). Aynı *Arabidopsis Na^+/H^+ antiport geni, pamuk bitkisine (*Gossypium hirsutum*) aktarılmış ve 200 mM tuz stresi altındaki bitkilerde, bu genin daha fazla biyokütle ile beraber, yabani tip pamuk bitkilerine göre, daha iyi kalitede ve daha fazla pamuk lifi elde edilmesini sağladığı, bunu da azot asimilasyonunu ve fotosentetik performansı artırarak gerçekleştirdiği rapor*

edilmiştir (He vd., 2005). Karabuğday (*Fagopyrum esculentum*) bitkisine aktarılan *AtNHX1* geninin, 200 mM tuz stresi altındaki bitkilerde rutin şekilde büyüebilme, çiçeklenme ve tohum oluşturma kabiliyetinin korunmasını sağladığı bulunmuş, ayrıca bitkideki önemli temel besin elementlerinin içeriğinin, topraktaki yüksek tuz konsantrasyonlarından etkilenmediği tespit edilmiştir (Chen vd., 2008). Buğday (*Triticum aestivum*) *TaNHX2* geni alfalfa (*Medicago sativa*) bitkisine aktarıldığında, oluşan transgeniklerde, tonoplast H^+ -ATPaz, H^+ -pirofosfataz (PPaz) ve ATP bağımlı proton pompalarının aktiviteleri yabancı tip bitkilerden daha fazla bulunmuş, bu enzim aktivitelerinin tuz stresi ile indüklenebileceği ihtimali üzerinde durulmuştur. 100 mM NaCl stresi altında, transgenik bitkilerde vakuolar Na^+/H^+ taşıyıcısı aktiviteleri yabancı tip bitkilere göre 2-3 kat fazla bulunmuştur ve adaptasyonu sağlayan faktörün, aktivitedeki bu artış olduğu düşünülmüştür (Zhang vd., 2012).

Yukarıda sıralanan çalışmalar incelendiğinde, literatürde gen aktarımı yapılarak tuzu tolere edebilme kabiliyetinin arttırıldığı çalışmaların, bunu yalnızca 200 mM NaCl konsantrasyonuna kadar tolerans sağlamak suretiyle başardığı anlaşılmaktadır. Fakat mevcut çalışmada literatürün aksine; 200 mM ile sınırlı kalan tolerans limiti, *Arabidopsis* gibi fenotipik değişimlerin çok net olarak ayırt edilemeyeceği hassas ve küçük bir bitkide, 250-300 mM'a kadar yukarıya taşınmıştır. Ayrıca, 150 mM tuz stresi ve 28 °C sıcaklık stresinin kombine edildiği durumda, *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin çifte etkisi ilk kez değerlendirilmiş ve her iki genin de fonksiyonel anlamda antagonistik bir etki oluşturmayıp, tam tersi sinerjistik olarak eş zamanlı tuz ve sıcaklık streslerine toleransı özellikle biyokütle, tohum verimi ile meyve oluşturma kapasitesi üzerine negatif etki oluşturmaksızın, belli düzeyde arttırdığı saptanmıştır.

Trans gen tabanlı çalışmalar incelendiğinde, bu tip çalışmaların genellikle kontrollü koşullarda veya bitki büyütme odalarında gerçekleştirildiği, sadece çok az hattan, tarla ortamında denendiği görülür. Özellikle tuz stresi, tarla koşullarında birden fazla stres ile kombine halde ortaya çıkar. Her ne kadar ülkemiz dahil birçok ülkede trans gen tabanlı teknoloji ile ilgili birtakım önyargılar ve yasaklar var ise de; bu çalışmadaki sistemin; ilgili genlerin mısır, çeltik ve buğday gibi ekonomik anlamda önemli tahıllara aktarılmasıyla daha da geliştirilebileceği ihtimali öngörülmektedir. Bu çalışma ile, *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin doğal sistemleri olan *Arabidopsis*'te fonksiyon gösterebildiklerinin ispatının ardından, bu genlerin heterolog sistemlerdeki cevaplarının belirlenebilirliğinin önü açılmıştır. *Arabidopsis*'te gerçekleştirilen bu çalışma, tarla koşullarında denenmeye değer sonuçlar

vermiş ve *AtNHX1* ile *SOS-1* genlerinin farklı bitkilere aktarılmasına ve büyük ölçekli tarla çalışmalarına zemin hazırlamıştır.

AtNHX1 ve *SOS-1* ifadesi ile promotor sayısının ilişkisi incelendiğinde; çalışmamızda, biri *AtNHX1*, diğeri *SOS-1* 35S ve son olarak da, transgenik bitkilerin seleksiyonunda kullanılan kanamisin (*kan*) geni için pnos olmak üzere üç ayrı promotor kullanıldığı görülür. Gen ifadesini etkilediği bilinen ve genomda ifade ettirilen promotor sayısı arttıkça T4, T5 gibi daha sonraki nesillerde trans gen ifadesinin gittikçe azalacağı tahmin edilmektedir. Fakat bu çalışmada, T2 ve T3 nesillerinde yapılan Northern Blot analizleri, her iki genin de ifade seviyesinde, bir stabilizasyon sorunu yaşanmadığını gösterdi. Bu durum, yapılan farklı çalışmalarla kanıtlandı. Örneğin; sadece *SOS-1* genini aşırı ifade eden hatlara bakıldığında, bunlardan 8/10'unun pozitif olduğu belirlendi. Bu veri göz önünde bulundurulduğunda, 35S CaMV promotorunun kullanımının trans gen tabanlı çalışmalarda, genleri aşırı ifade eden hatların eldesi bakımından çok yüksek olasılıkla fonksiyonunu yerine getirdiği anlaşılabilir. Fakat abiyotik stres çalışmalarında, 35S CaMV promotorunun çokça kullanılıyor olduğu bilinmesine rağmen, sadece spesifik stres koşulları altında veya spesifik dokuda uyarılabilen (inducible), diğer durumlarda aktif olmayan (genin ifadesini sağlamayan), dolayısıyla da gen susturulmasına (gene silencing) sebebiyet vermesi çok az muhtemel olan promotorlar kullanılması daha sağlam bir yaklaşım olacaktır.

Mevcut çalışmada, 2 adet 35S CaMV promotoru altında ifade ettirilen *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini taşıyan transgenik bitkilerde herhangi bir metabolik hasara veya toksisiteye rastlanmamış, tüm hatlar normal koşullarda ve uygulanan stresler altında sağlıklı bir biçimde büyüebilmiştir. Bu durum, çift gen transgenik bitkilerinde promotor kaynaklı herhangi bir fizyolojik sorun oluşmadığının göstergesidir.

Çalışmamızda, transgenik bitkilerin yabancı tip eşlerinden yüksek seviyede *AtNHX1* ve *SOS-1* transkripti biriktirdiği ve genlerin ifadesinin tuz stresi ile indüklendiği tespit edilmiştir. Literatürde, her iki gen ile ayrı ayrı transformasyon çalışmaları yapılmış olmasına rağmen; iki gen birleştirilerek yapılan herhangi bir transgenik çalışmaya rastlanmamıştır. Northern Blot analizi bu iki genin de başarılı bir biçimde *Arabidopsis*'e aktarıldığını ve burada ifade olduğunu kanıtlar. Southern Blot analizi de, genleri taşıyan T-DNA bölgesinin genomda kaç kopya halinde bulduklarını gösterir. Birbirinden bağımsız transgenik hatlarda pozisyon etkisinden ya da aktarılan genlerin genomdaki kopya sayılarının fazla oluşundan meydana gelen ifade varyasyonlarına sahip olanlar ve hedef geni almayan yabancı tip bitkiler, transgenik olmayan bitkiler (non-transformant) olarak kategorize edilerek,

çalışmanın sonraki aşamalarına dahil edilmemiştir. Southern Blot verileri incelendiğinde, T-DNA bölgesini genomunda iki kopya halinde taşıyan bitkilerle farklı tuz stresi konsantrasyonlarında yapılan denemeler, gen ifadesinde kopya sayısının birden fazla olması kaynaklı herhangi bir ifade sorunu oluşturmadığını göstermiştir.

Klorofil ve fotosentetik kapasite ilişkisini araştıran çalışmalar incelendiğinde; *AtNHX1* geninin yer fıstığına (*Arachis hypogaea*) aktarıldığı bir çalışmada, bitkilerin 150 mM tuz konsantrasyonu altında daha az zarar gördüğü ve oluşan transgenik yer fıstığı bitkilerinde klorofil yıkımının yabani tip bitkilere göre daha az olduğu bulunmuş ve fotosentetik kapasitenin transgenikler lehine arttığı ortaya konulmuştur (Banjara vd., 2012). Bu çalışmada, tuz stresi altında NS-1-2-3 çift gen transgeniklerinde, klorofil yıkımının diğer hatlara göre az bulunması, yeterli su alınımıyla beraber, kloroplast fonksiyonlarının korunarak, fotosentetik kapasitenin transgeniklerde daha az hasara uğradığı şeklinde açıklanabilir. Ayrıca klorofil içeriği, bitkinin azot kullanabilme oranını da belirlemesi bakımından, çift gen transgeniklerinin diğer gruptaki bitkilere göre büyüme ve gelişim açısından daha iyi performans sergilemesi, azotu kullanabilme yeteneklerinin sağlam kalmasıyla ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmadaki veriler, kök/gövde gelişiminin çift gen transgeniklerinde, tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkilere göre daha az inhibe olduğunun yanı sıra, bu hatlar arasında, rozet yaprak gelişiminin de farklılık arz ettiğini göstermiştir. Bu da çift gen transgeniklerinin, kontrol gruplarına göre daha fazla fotosentez yüzey alanına ve daha fazla fotosentetik aktiviteye sahip olabilecekleri anlamına gelir. *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini eş zamanlı aşırı ifade eden transgeniklerin tuz stresi koşulları altında neden diğer bitkilerden daha iyi büyüme ve gelişim sergiledikleri bu yolla açıklanabilir.

Çalışmamızdaki en önemli bulgu, *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerini eş zamanlı aşırı ifade eden transgeniklerde tohum üretebilme kapasitesinin tuz ve tuzun sıcaklık stresi ile kombine edildiği durumlarda, diğer gruplara göre en az % 47 arttığını göstermiş olmaktır. Tohum verimi, farklı birçok karakterden etkilenen kompleks bir özellik olmasına rağmen (Sinhamahapatra vd., 2010); bitki başına düşen meyve sayısının (silikva) her iki geni birden aşırı ifade eden *AtNHX1* ve *SOS-1* transgeniklerinde kayda değer derecede fazla olması, temel olarak bu bitkilerin daha fazla sayıda ana ve yan dallar bulundurması ile ilişkilendirilebilir. Az sayıda ana ve yan dal bulunduran *AtNHX1* ile *SOS-1* tek gen transgeniklerinin ise; çok daha az sayıda meyve üretebildiği tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında da, Ohta ve ekibinin, halofit olan *Atriplex gmelini* bitkisinden klonladıkları

AgNHX1 genini, *Oryza sativa* bitkisine aktardıkları ve Na^+/H^+ taşıyıcısı aktivitesini 8 kat arttırmayı başararak, bitkilere 3 gün 300mM NaCl stresi uygulamasından sonra elde ettikleri tohumlarda %50'lerden %81 ile %100 arasında canlı kalabilme oranlarını elde ettikleri görülür (Ohta vd., 2002). Sonuçları mevcut çalışmamız ile uyumlu olan bir diğer çalışma da, *AtNHX1* geninin, buğday (*Triticum aestivum*) bitkisine aktarıldığında tuz stresi koşulları altında yapılan denemelerde, tane ağırlığı ve tohum miktarının aktarılan gen tarafından sırasıyla % 75-116 ve % 41-50 oranlarında arttırıldığı tespit edildiği çalışmadır (Xue vd., 2004).

Bunların yanı sıra, mevcut çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, 250 mM tuz stresine maruz bırakılmış NS *AtNHX1+SOS-1* çift gen transgeniklerine ait tohumlarda, çimlenmenin 7. günde %30 oranında başarılı bir şekilde meydana geldiği belirlenmiştir. Yabani tip K bitkilerinin ise stresin ardından tohum canlılığını neredeyse kaybettikleri tespit edilmiştir. Nitekim bu sonuç, *AtNHX1* geninin mısır (*Zea mays*) bitkisine aktarıldığı ve bazı mısır hatlarının %0,8 ile %1'lik NaCl konsantrasyonlarında çimlenebilme ve büyüyebilme kabiliyetini yitirmedikleri çalışma ile de uyumludur (Yin vd., 2004).

OsNHX1 geni, *Oryza sativa*'da aşırı ifade ettirilmiş ve tuz stresi kaynaklı hasar ve ölüm oranının transgenik bitkilerde daha az olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2007). 2004 yılında, kanola (*Brassica napus*) *BnNHX1* geni tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisine transfer edildiğinde de benzer bir sonuç ortaya çıkarılmıştır. Yabani tip bitkiler ölürken, transgenik tütün bitkileri 200 mM tuz stresi altında daha iyi büyümüş, çiçeklenme ve tohum oluşturma durumunda herhangi bir fizyolojik aksaklık tespit edilememiştir (Wang vd., 2004). Ayrıca, yüksek otlak ayrığı bitkisinden *AeNHX1* (*Agropyron elongatum NHX1*) geni *Arabidopsis thaliana* ve bir çim türü olan *Festuca arundinacea* bitkisine aktarılmış, osmotik denge, fotosentez ve tuza toleransın ilgili gen tarafından geliştirildiği tespit edilmiştir (Qiao vd., 2007). Mevcut çalışmada ise; bitkilere çimlenmeden sonraki hafta başlanılmak üzere 2 hafta süresince birçok glükofit için öldürücü sayılabilecek 300 mM konsantrasyonda tuz stresi uygulanmış ve yukarıda sayılan çalışmalarla uyumlu olacak şekilde, 2 hafta sonunda çift gen transgeniklerinde oluşan nekrozisin, diğer tüm hatlara nazaran çok daha az oranda meydana geldiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda oluşturulan transgenik bitkiler stres şartlarını az hasarla atlattırken, yabani tip *Arabidopsis* bitkileri, 250 mM NaCl ile 150 mM NaCl+28°C sıcaklık stresi koşullarından önemli ölçüde zarar görmüştür. Tuz stresi koşulları altında, transgenik NS bitkilerinin yapraklarında tespit edilen yüksek Na^+ konsantrasyonunun, vakuolar Na^+/H^+

taşıyıcısının aktivitesini arttırarak, Na iyonlarının kofuldaki birikimini arttırdığını ve transgenik bitkilerin bu şekilde sitoplazmadaki Na⁺ toksisitesini azalttıkları söylenebilir. *AtNHX1* geninin tuz stresi altında Na⁺ ile beraber K iyonlarını da hızlıca kofullarda biriktirdiği, bu selektif iyon birikiminin, kofullardaki osmotik potansiyeli düşürerek, hürelere su alınımını uyardığı bilinmektedir. *AtNHX1* geninin bu işlevlerinin yanı sıra, pH regülasyonu ve K⁺ dengesi ile ilgili olabileceği ve kök ucu hariç bitkinin tüm kısımlarında sentezlendiği ortaya çıkarılmış özellikleri arasındadır (Zhang ve Shi, 2013). Çalışmamızda, çifte trans genleri taşıyan hatlarda tespit edilen fenotipik özelliklere, *AtNHX1* geninin bu özelliği ile stres durumunda iyon dengesi ve osmotik dengeyi sağlayarak, hücre uzaması esnasında daha uzun hücrelerin gelişimini uyarabileceği sonucu ulaşıldığı düşünülmektedir.

SOS-1 geninin Na iyonlarını hücre zarından uzaklaştırma işlevi 2000 yılında bir kök gelişim deneyi (root bending assay) ile ortaya çıkarılmadan önce, bu genin 1996'da yüksek afiniteli K⁺ iyon taşınımından sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu görevi, aşırı Na⁺ iyon konsantrasyonlarında hürelere K⁺ girişini sağlayan kanalları korumak suretiyle gerçekleştirdiği önerilmiştir. Dolayısıyla tuz stres toleransı ile dokulardaki K⁺ iyon birikimi arasında doğru bir orantı olduğu söylenebilir (Shi vd., 2000).

SOS-1 geninin en kritik rolü, hücrelerdeki Na⁺ iyonlarını bitkinin farklı organlarına taşıyıp bu dokulara bölüştürerek, özellikle fotosentetik dokuları aşırı Na⁺ konsantrasyonlarından korumak olarak karşımıza çıkar (Yue vd., 2012). Çalışmamızda, her iki geni de aşırı ifade eden NS bitkilerinde 250 mM gibi çok yüksek tuz konsantrasyonu altında K⁺ iyonlarının diğer hatlara göre fazla birikmiş olması, hürelere K⁺ girişini sağlayan kanalların *SOS-1* geni tarafından korunmuş olabileceği ile açıklanabilir. Yüksek K⁺/Na⁺ oranı sitozolik enzimlerin aktivitesi, membran potansiyeli ve hücre hacminin kontrolü gibi, normal hücresel fonksiyonların devamı için elzem olmakla beraber, tuza toleransın göstergesidir ve bu çalışmada çift gen transgeniklerinde bu dengeyi *SOS-1* geninin kurduğu düşünülmektedir.

Hücreye aşırı Na⁺ iyonu girişi, hücre membran potansiyelini hasara uğratar ve bu değişim Cl⁻ iyonlarının pasif yoldan hücre içine girmeye başlamasına yol açar. Na veya Cl iyonunun, ya da her ikisinin kofullardaki birikimi veya hücreden dışarı atılması, benzer şekildedir ve bitkinin tuza tolerans kapasitesi ile ilişkilidir (Apse vd., 1999). Tuz stresinin bir sonucu olarak hücrede Na ve Cl iyonlarının artmasıyla büyüme ve gelişimin farklı mekanizmalar ile fakat eş zamanlı kısıtlandığı, aşırı Na iyonlarının K⁺ ve Ca⁺² alınımını, aşırı Cl⁻ iyonlarının ise klorofil yıkımı üzerinden fotosentetik kapasiteyi engellediği

bilinmektedir (Apse vd., 1999). Kofullarda biriken bu iyonlar, oluşturdukları osmotik potansiyeli dengelemek için *Arabidopsis* hücrelerine su alınımını tetikler. Çalışmamızda, tuz stresi altında kontrol gruplarından daha fazla su alabildiğini düşündüğümüz çift gen NS transgeniklerinde, muhtemelen hücre genişlemesi diğer bitkilere nazaran fazla oranda gerçekleşmiş ve gruplar arasında biyokütlerde doğan fark bu sebeple meydana gelmiştir. Bu durum, yeteri kadar su alabilen NS bitkilerinde diğer hatlara nazaran gözlenen gövde uzunluğu, kök gelişimi, çimlenme, tohum oluşumu gibi büyüme faktörlerindeki olumlu farkın meydana gelmesini açıklar. *HKT* (high affinity K^+ transporter) gen ailesinden *HKT1* *Arabidopsis*'te ve çeltikte aşırı ifade edildiğinde, gövdedeki Na^+ iyonlarını kök ksilemine taşıması sebebiyle, kök korteksindeki Na^+ miktarı artmış, gövdedeki Na^+ azalmış ve çalışmamızda olduğu gibi gövde yaş ağırlığında, yani vejetatif safhadaki biyokütle miktarında artış tespit edilmiştir (Plett vd., 2010). Mevcut çalışmalar K^+ biriktirme kabiliyetinin bitkiler arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin; 100 mM ve 150 mM NaCl uygulanan buğday yapraklarında, düşük oranda Na^+ ve yüksek oranda K^+ biriktirildiği bulunmuştur (Xue vd., 2004). Fakat *OsNHX1* geni çeltikte aşırı ifade ettirildiğinde, transgeniklerin 200 mM tuz stresi koşulları altında yüksek oranda Na^+ ve düşük oranda K^+ biriktirdiği rapor edilmiştir (Fukuda vd., 2004). Çeltikte elde edilen bu sonuç, mevcut çalışma ile paraleldir.

Bunun dışında çalışmamızda, tuza tolerant NS transgeniklerinin fenotipik özelliklerinin, osmotik stres oluşturan başka herhangi bir molekül ile ilişkili olmadığı, tamamen iyon stresi kaynaklı olduğunun doğrulanması amacıyla, tohumlar düşük osmotik potansiyeli indükleyici bir molekül varlığında (300 mM mannitol içeren $\frac{1}{2}$ xMS agar besiyerinde) büyütüldüklerinde, aralarında kök uzunluğu bakımından herhangi istatistiksel bir fark olmadığı ortaya konulmuş, dolayısıyla elde edilen fenotipin yalnızca NaCl stresi kaynaklı olduğu, başka herhangi osmotik stres oluşturacak bir molekül vasıtasıyla kontrol edilmediği tespit edilmiştir.

İki genin aynı anda aşırı ifade ettirildiği çalışmalara bakıldığında, sırası ile *Suaeda salsa* ve *Arabidopsis thaliana* orijinli iki gen; *SsNHX1* ve *AVP1* *Oryza sativa* (çeltik) bitkisine aktarıldığında bitkiler, çiçeklenme safhasına kadar canlı kalabilmiş ve 300 mM NaCl stresi altında sadece 5 gün boyunca yaşayabilmiştir. Fakat çalışmamızda oluşturulan transgenik bitkiler 8 haftalık yaşam döngülerini tamamlayarak, tohum oluşturabilmiştir. *SsNHX1* ve *AVP1* kombinasyonu bu genlerin eş zamanlı ifadesi, mevcut çalışmamızda olduğu gibi strese tolerans noktasında, yalnız *SsNHX1* veya yalnız *AVP1* ekspresyonundan

daha ileri seviyede performans göstermiştir (Zhao vd., 2006). Buğday (*Triticum aestivum*) *TNHX1* ve *TVPI* genleri *Arabidopsis thaliana* bitkisine aktarıldığında, oluşan transgeniklerin 200 mM NaCl stresi altında büyüebildiği ve yaprak dokularında K iyonlarından fazla Na⁺ biriktirdikleri saptanmıştır. Na iyon birikiminin sitoplazmadaki toksik etkisi çalışmamızda olduğu gibi, bu iyonların kofulda biriktirilmesi suretiyle tersine çevrilmiştir (Brini vd., 2007). *Oryza sativa* *OsNHX1* ve *OsVPI* genlerinin eş zamanlı aşırı ifadesiyle, uzun süreli 100 mM NaCl stresi altındaki bitkilerin yaprak dokularında daha az MDA biriktirildiği ortaya çıkarılmıştır (Liu vd., 2010). Sırasıyla *Pennisetum glaucum* ve *Arabidopsis thaliana* kökenli iki gen *PgNHX1* ve *AVPI* (*Lycopersicon esculentum*) domates bitkisine aktarıldığında, bitkilerde 200 mM NaCl stresi karşısında klorofil yıkımı daha az oranda seyretmiş ve yaprak dokularında tek gen transgeniklerinden 1,4 kat kadar fazla prolin ve 1,5 kat fazla Na iyonu biriktiği saptanmıştır (Bhaskaran ve Savithramma, 2011). Mevcut çalışmamızdaki sonuçlar bahsi geçen çalışmalar ile benzer sonuçlar ortaya koymuştur.

Antosiyaninler; pH'ya bağlı olarak kırmızı, mor ya da mavi renkte olabilen ve suda çözünen vakuolar pigmentlerdir. Antosiyaninler yüksek bitkilerde yaprak, kök, gövde, çiçek ve meyvelerin her birinde bulunabilir. Her ne kadar stres durumlarında miktarlarında azalış tespit edildiğine dair veriler olsa da, yaprakları serbest radikallerden koruyabilecek, güçlü antioksidan moleküller olarak miktarlarının arttığı da bilinir. Kofulda yer alan antosiyaninlerin metabolik serbest radikalleri nasıl temizlediği hala tam aydınlatılmamış olmakla birlikte, bazı araştırmalara göre; *MYB75/PAP1* transkripsiyon faktörünün aktarıldığı domates bitkilerinde antosiyanin miktarı artmış ve bu artışın yüksek ışık yoğunluğunun transgenik bitkilerde oluşturduğu hasarı hafifletici etki meydana getirdiği bildirilmiştir (Zuluaga vd., 2008). Yapraklardaki toplam antosiyanin miktarı belirlendiğinde, çift gen transgenikleri olan NS bitkilerinde, tek gen transgenikleri N ve S ile, K yabani tip kontrol bitkilerinden daha fazla antosiyanin oluşmuş olması, bu bitkilerde stres esnasında oluşan serbest radikallerin vakuolar antosiyaninlerce, radikallere H⁺ kazandırmak suretiyle temizlendiği şeklinde açıklanabilir. Dolayısıyla antosiyanin miktarındaki artış, çift gen transgeniklerinin reaktif oksijen türlerini temizleme kapasitelerinin diğer hatlara göre fazla olmasını sağlamıştır.

Lipid peroksidasyonu; doymamış yağ asitlerinin yıkımı ile karakterizedir ve süreç sonunda, hücrede serbest radikallerin açığa çıkmasına yol açar. Membran hasarı, malondialdehit oluşumunu meydana getirir ve açığa çıkan MDA seviyeleri, stres koşulları altında, hücrelerdeki antioksidatif kapasiteye ayna tutar (Glenn vd., 1999). Çalışmamızda,

transgenik hatların ve diğer grupların yapraklarındaki membran lipid peroksidasyon durumu karşılaştırılmıştır. Tuz stresi sonrası, hem transgeniklerde hem de yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinde MDA içeriği artmış, fakat bu artış tek gen transgenikleri ve K yabancı tip kontrol bitkilerinde çok daha fazla oranda olmuştur. Bu sonuçlar, *AtNHX1* ve *SOS-1* aşırı ifadesinin transgeniklerde arttırılmış stres toleransı ile karakterize olduğunu ve bu genlerin tuz stresi altında hücre zarının oksidatif hasarını hafifletecek mekanizmalarla işlev gördüğünü göstermektedir.

Tuz stresi fizyolojisi incelendiğinde, tuza tolerans özelliğinin birçok alt özellik ve bu özellikleri kontrol eden genler silsilesi tarafından yönlendirildiği görülür. Dolayısıyla tuza toleransın kontrolü multi-geniktir. Yani regülasyon mekanizmasını birçok farklı genin etkileşimi/interaksiyonu etkiler. Bu kompleks karaktere bir de sıcaklık stresi eklendiğinde, stres faktörleri karşısında ortaya çıkan yanıtlar da çokça karmaşıklaşmaktadır.

Fizyolojik çalışmalar bitkilerin yalnızca tek bir stres çeşidine verdikleri cevap ile, stres kombinasyonlarına verdikleri cevabın aynı olmadığını ortaya koymuştur. Örneğin; birçok abiyotik ve biyotik stresin birlikte çalışıldığı geniş ölçekli mikroarray deneylerinde, transkriptlerin %60'ı yalnızca tek bir stres muamelesi sonucu elde edilemeyen transkriptlerdir (Rasmussen vd., 2013). Buradan hareketle, farklı stres kombinasyonlarının bitki tarafından yeni uyum cevapları geliştirmesi gereken, yeni bir abiyotik stresmiş gibi algılandığı söylenebilir. Diğer yandan, farklı stresler bitkide birtakım antagonistik cevaplar da doğurur. Örneğin; sıcaklık stresi esnasında bitkiler yapraklarını transpirasyon ile soğutmak için stomalarını açar. Fakat aşırı sıcak, kuraklık ile kombine edildiğinde bitkiler stomalarını açamayabilir, bu da yaprağın daha fazla ısınmasına yol açar. Tuz stresi de sıcaklık ile kombine etki gösterdiğinde benzer bir problem oluşur. Yaprağın soğumasını sağlamak için bitki fazla transpirasyon yapar fakat, bu durum toksik iyonların hücrelere alınımının artmasıyla sonuçlanır.

Orta derecede sıcaklık ve tuz stresi kombinasyonu, domates fidelerinde test edilmiş, beklenenin aksine stres cevabı daha az olmak yerine, yalnızca tuz stresi uygulanan durumdaki toleranstan fazla bir tolerans oluştuğunu ortaya konulmuştur (Rivero vd., 2014). Sıcaklık ile uyarılan tuz stresi toleransı, oksidatif hasara karşı korumanın yükseltilmiş olması, Na^+ , K^+ ve su dengelerinin gelişmiş olması ve daha sağlam bir fotosentetik aktivite ortaya çıkması gibi bitkilerde sıkça bahsedilen bir olgu olan çapraz ilişki (cross-talk) mekanizmalarıyla açıklanmıştır (Rivero vd., 2014). Bu durum, “tuz stresine uyum (aklimasyon) sürecinin ardından termotoleransın geliştiği” şeklinde yorumlanabilir. 2011’de

farklı bir çalışmada sıcaklık+tuz stresinin fazla miktarda glisin betain oluşturduğu, bu küçük koruyucu moleküllerin de reaktif oksijen türlerinin birikmesini engellemek suretiyle stres toleransını arttırdığı tespit edilmiştir. Bir diğer senaryo; kök ksilem parankimasından gövdeye Na^+ taşınmasında görevli katyon kanallarının, sıcaklık stresi ile inaktif olmaları dolayısıyla, bitkide toksik düzeylerde iyon birikiminin engellenmesidir. Bu çalışmada tuz stresinin sıcaklık ile eş zamanlı uygulandığı durumda, ilginç bir şekilde sadece *AtNHX1* genini aşırı ifade eden hatlarda hemen hemen çift gen NS transgenikleri kadar tolerans tespit edildi. Şu ana kadar *NHX* gen ailesine ait sıcaklık ile ilgili tek çalışma, üzümde geçici olarak ifade ettirilen *cNhx1* geninin sıcaklık stresi ile uyarıldığını göstermiştir (Porat vd., 2002). Çalışmamızda, 150 mM tuz stresine 28°C sıcaklık ile beraber maruz kalan NS bitkilerinin, yalnızca 250 mM tuz stresine bırakılmış bitkilere benzer fenotipik karakteristikler sergilediği fakat, bu bitkiler diğer gruplar ile (tek gen transgenikleri ve K yabani tip bitkiler) karşılaştırıldığında, fenotipik farkın özellikle agar petrielerde sadece tuz stresi uygulamasında elde edilenden daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Tuz ve sıcaklık stresinin eş zamanlı uygulandığı çalışmalardan elde edilen veriler literatürde daha çok yeni olup, NS çift gen transgeniklerindeki toleransın prolin, glisin betain gibi osmoregülasyonu sağlayıcı moleküllerin devreye girerek gerçekleştirip gerçekleştirmediği, veya oksidatif hasarın koruyucu enzimatik reaksiyonların artması sonucu azaltılıp azaltılmadığı gibi sorular daha sonra araştırılmaya açık konulardır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, orjinal *AtNHX1* ve *SOS-1* genleri *Arabidopsis*'ten çoğaltılarak cDNA'ları 35S CaMV promotorunun kontrolü altında pBI121 vektörüne yerleştirildi. Vektör, *Agrobacterium tumefaciens* aracılı doğal transformasyon ile bitki nükleer genomuna entegre edildi. Vektördeki kanamisin direnç geni, seleksiyon markörü olarak kullanıldı ve toplamda 56 T1 transgenik hat elde edildi. T2 neslinde bunların 39'unun homozigotluk bakımından pozitif olduğu belirlendi. Ekspresyon çalışmaları ile, genlerin her ikisinin de eş zamanlı ifade olmadığı ya da düşük ve orta dereceli ifadeye sahip olanlar elenerek, ileriki çalışmalar genleri aşırı ifade eden hatlar kullanılarak devam ettirildi. Tespit edilen hatların farklı NaCl konsantrasyonları altındaki rejenerasyon kabiliyetleri değerlendirilerek, çalışmada kullanılan hat sayısı minimuma (her iki geni birden ifade eden 3, genleri ayrı ayrı ifade eden 2) indirildi. Çimlenme etkinliği, tohum ve meyve miktarları, gövde yaş ağırlıkları, kök ve gövde uzunlukları, MDA, klorofil, antosiyanin, K⁺ ve Na⁺ içerikleri gibi bir dizi analiz ile, her iki geni birden taşıyan ve ifade eden transgenik *Arabidopsis*'lerin diğer hatlardan fizyolojik anlamda daha sağlam oldukları ve bu hatlarda sıcaklık stresinin tuz stresine verilen cevabı daha etkili hale getirdiği saptandı. Çalışmadaki en önemli bulgu, 250 mM NaCl stresi uygulamasının ardından, çift gen *Arabidopsis* transgeniklerinin tohum üretebildiklerinin ve bu tohumların çimlenme kabiliyetlerini kaybetmediklerinin ortaya konulmuş olmasıdır.

Bu çalışmada, transgenik teknoloji model bir bitki (*Arabidopsis*) üzerinde uygulanarak, yetersiz büyüme ortamı koşullarıyla ortaya çıkıp, verim ve tohum kalitesini olumsuz etkileyen, rasyonel kayıplar, istatistiki olarak minimuma indirgenmiştir. *Arabidopsis* kökenli *AtNHX1* ve *SOS-1* kullanılarak dizayn edilen sistemin çalışması sağlanmış, toprakta 250 mM'dan fazla Na⁺ konsantrasyonlarının tolerasyonu düşük MDA içerikleri ve yüksek yaş ağırlık ile başarılmıştır. Bu sistemin çalışması için ilgili taşıyıcılara enerjiyi sağlayacak olan doğal pompaların (ATPaz ve Pirofosfataz) oluşturduğu proton elektrokimyasal gradiyenti etkili ve belirleyici faktördür.

6. ÖNERİLER

Günümüzde genellikle laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen moleküler tarım, bulunduğumuz yüzyılda rutin bir hal almıştır. Ayrıca; bu çalışmalar sadece tarımsal ürün verim ve miktarını artırma amaçlı değil, bazı immünolojik (yenilebilir aşular, endüstriyel proteinler, hormonlar, antijenler vb.), sağlık (kansere sebep olan gen ürünlerinin belirlenmesi vb.), çevresel (metal kirliliğinin temizlenmesi vb.), yenilenebilir enerji (yüksek bitkilerdeki lignin içeriğinin artırılması vb.) ve hatta askeri savunma sanayii (biyoterörizme karşı geliştirilen ajanlar) odaklı problemleri aşmada da önemli bir seçenek haline gelmiştir (Biotechnology Research and Education Initiative (BREI) committee/University of Kentucky).

Bu çalışmada kullanılan genlerin hangi miRNA'lar tarafından kontrol edildiğinin belirlenmesi ve *AtNHX1* ve *SOS-1* genlerinin ifadesinin, hangi downstream genlerin ifadesini etkilediğinin belirlenmesi, yine bu konseptin oksidatif stresle ilişkisinin ortaya çıkarılması, biyokimyasal deneylerin sadece tuz stresi altında değil, sıcaklık stresi ile kombine edilmiş durumlarda da test edilmesi, transgeniklerin azotu kullanım etkinliğinin tespiti, iyonların sitoplazmik ve vakuolar birikimlerinin ayrı ayrı çalışılması ve oluşturulan tohumların hastalıklara hassasiyetinin belirlenmesi bu çalışmanın eksik ayağını oluşturmaktadır. Sekanslama teknolojisi ve omik (proteomik, metabolomik vb) çalışmaları, her geçen gün yeni bir organizmanın genomunu ve fonksiyonlarını aydınlatmakta ve bu durum, transformasyon çalışmalarında kullanılacak aday genlerin her geçen gün artmasını sağlamaktadır. Ancak bu şekilde tuza tolerant genler tespit edilip, transgenik teknoloji ile harmanlanabilir.

Tüm dünyada hızla artan yiyecek ihtiyacının karşılanabilmesi sorunu için, geleneksel tarım stratejilerinin yetersiz kalacağı çok yakın bir gelecekte, hem gıda olarak kullandığımız, hem de ihracatını yaptığımız tarımsal ürünleri, kendi tohum stoklarımızı hazırlayarak koruma altına almak, ülke tarımsal ekonomisi adına atılması gereken en önemli adımlardan biridir. Transgenik çalışmalar, genellikle belirli yasaklar çerçevesinde ele alınıyor olmalarına karşın, bazı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de rutine döküldüğünde, abiyotik stres koşullarına dayanıklı, kaliteli kök ve tohumlara sahip bitkiler geliştirilmesi, uzun vadede hem ticari hem de bireysel tarım üreticilerine güven ortamı sağlanmasının önünü açacaktır.

Ayrıca düşük maliyetli kolay uygulanabilir gen teknolojileri tabanlı bu tarz çalışmalar, uluslararası otoritelerin ilgisini kolayca çekecek ve çoklu işbirliklerinin geliştirilmesine öncülük edecek, uygulamaya yönelik çalışmalar üzerinden elde edilen bilgiler ülkemizce literatüre kazandırılarak, bitki biyolojisi alanında etkili mühendislik stratejilerinin temellerini oluşturacak değerdedir.

7.KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Azooz, M., M. ve Prasad, N., V., 2013. Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations, Springer New York, 509 s.
- Apse, M., P., Aharon, G., S., Snedden, W., A. ve Blumwald, E., 1999. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*, Science, 285, 5431, 1256-1258.
- Apse, M., P. ve Blumwald, E., 2007. Na⁺ Transport in Plants, FEBS Letters, 581, 12, 2247-2254.
- Ashraf, M., 2010. Inducing Drought Tolerance in Plants: Recent Advances, Biotechnology Advances, 28, 1, 169-183.
- Asif, M., A., Zafar, Y., Iqbal, J., Iqbal, M., M., Rashid, U., Ali, G., M., Arif, A. ve Nazir, F., 2011. Enhanced Expression of *Atnhx1*, in Transgenic Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.) Improves Salt and Drought Tolerance, Mol. Biotechnol., 49, 3, 250-256.
- Babitha, K., C., Ramu, S., V., Pruthvi, V., Mahesh, P., Nataraja, K., N. ve Udayakumar, M., 2013. Co-Expression of *Atbhlh17* and *Atwrky28* Confers Resistance to Abiotic Stress in *Arabidopsis*, Transgenic Res., 22, 2, 327-341.
- Banjara, M., Zhu, L., Shen, G., Payton, P. ve Zhang, H., 2012. Expression of an *Arabidopsis* Sodium/Proton Antiporter Gene (*Atnhx1*) in Peanut to Improve Salt Tolerance, Plant Biotechnology Reports, 6, 1, 59-67.
- Bhaskaran, S. ve Savithramma, D., L., 2011. Co-Expression of *Pennisetum glaucum* Vacuolar Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ Antiporter and *Arabidopsis* H⁽⁺⁾-Pyrophosphatase Enhances Salt Tolerance in Transgenic Tomato, J. Exp. Bot., 62, 15, 5561-5570.
- Blokhina, O. ve Fagerstedt, K., V., 2010. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Plant Mitochondria: Origin and Redundant Regulatory Systems, Physiol. Plant, 138, 4, 447-462.
- Bokszczanin, K., L. ve Fragkostefanakis, S., 2013. Perspectives on Deciphering Mechanisms Underlying Plant Heat Stress Response and Thermotolerance, Front Plant Sci., 4, 315.
- Bressan, R., A., Park, H., C., Orsini, F., Oh, D., Dassanayake, M., Inan, G., Yun, D., J., Bohnert, H., J. ve Maggio, A., 2013. Biotechnology for Mechanisms That Counteract Salt Stress in Extremophile Species: A Genome-Based View, Plant Biotechnology Reports, 7, 1, 27-37.
- Brett, C., L., Donowitz, M. ve Rao, R., 2005. Evolutionary Origins of Eukaryotic Sodium/Proton Exchangers, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 288, 2, C223-239.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G., A. ve Masmoudi, K., 2007. Overexpression of Wheat Na⁺/H⁺ Antiporter *Tnhx1* and H⁺-Pyrophosphatase *Tvp1* Improve Salt- and Drought-Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana* Plants, J. Exp. Bot., 58, 2, 301-308.

- Chen, H., An, R., Tang, J., H., Cui, X., H., Hao, F., S., Chen, J. ve Wang, X., C., 2007. Over-expression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene Improves Salt Tolerance in an Upland Rice, Molecular Breeding, 19, 3, 215-225.
- Chen, L., H., Zhang, B. ve Xu, Z., Q., 2008. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of *Arabidopsis* Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene Atnhx1 in Common Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum*), Transgenic Research, 17, 1, 121-132.
- Chomczynski, P., 1993. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples, Biotechniques, 15, 3, 532-534, 536-537.
- Cuartero, J., Bolarin, M., Moreno, V. ve Pineda, B., 2009. Molecular Tools for Enhancing Salinity Tolerance in Plants. Molecular Techniques in Crop Improvement. S. M. Jain and D. S. Brar, Ed., Springer Netherlands, 373-405.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları, Afyon Kocatepe Üniveristesi Fen Bilimleri Dergisi, 11, 11-34.
- Flowers, T. ve Yeo, A., 1986. Ion Relations of Plants under Drought and Salinity, Functional Plant Biology, 13, 1, 75-91.
- Flowers, T. ve Yeo, A., 1995. Breeding for Salinity Resistance in Crop Plants: Where Next?, Functional Plant Biology, 22, 6, 875-884.
- Flowers, T., J., 2004. Improving Crop Salt Tolerance, J. Exp. Bot., 55, 396, 307-319.
- Flowers, T., J. ve Muscolo, A., 2015. Introduction to the Special Issue: Halophytes in a Changing World, AoB Plants, 7.
- Fraile-Escanciano, A., Kamisugi, Y., Cuming, A., C., Rodriguez-Navarro, A. ve Benito, B., 2010. The Sos1 Transporter of *Physcomitrella patens* Mediates Sodium Efflux in Planta, New Phytol., 188, 3, 750-761.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2006. Crosstalk between Abiotic and Biotic Stress Responses: A Current View from the Points of Convergence in the Stress Signaling Networks, Curr. Opin. Plant. Biol., 9, 4, 436-442.
- Fukuda, A., Chiba, K., Maeda, M., Nakamura, A., Maeshima, M. ve Tanaka, Y., 2004. Effect of Salt and Osmotic Stresses on the Expression of Genes for the Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase, H⁺-Atpase Subunit a, and Na⁺/H⁺ Antiporter from Barley, J. Exp. Bot., 55, 397, 585-594.
- Gaxiola, R., A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S., L. ve Fink, G., R., 1999. The *Arabidopsis* Thaliana Proton Transporters, Atnhx1 and Avp1, Can Function in Cation Detoxification in Yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 4, 1480-1485.
- Glenn, E., P., Brown, J., J. ve Blumwald, E., 1999. Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes, Critical Reviews in Plant Sciences, 18, 2, 227-255.
- He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A., S., Auld, D., Blumwald, E. ve Zhang, H., 2005. Expression of an *Arabidopsis* Vacuolar Sodium/Proton Antiporter Gene in Cotton Improves Photosynthetic Performance under Salt Conditions and Increases Fiber Yield in the Field, Plant Cell Physiol, 46, 11, 1848-1854.

- Heath, R., L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Arch. Biochem. Biophys., 125, 1, 189-198.
- Hernandez, J., A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J., J. ve Sevilla, F., 1999. Response of Antioxidant Systems and Leaf Water Relations to NaCl Stress in Pea Plants, New Phytologist, 141, 2, 241-251.
- Khan, M., S., Ahmad, D. ve Khan, M., A., 2015. Utilization of Genes Encoding Osmoprotectants in Transgenic Plants for Enhanced Abiotic Stress Tolerance, Electronic Journal of Biotechnology, 0.
- Leidi, E., O., Barragan, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M., T., Cubero, B., Fernandez, J., A., Bressan, R., A., Hasegawa, P., M., Quintero, F., J. ve Pardo, J., M., 2010. The Atnhx1 Exchanger Mediates Potassium Compartmentation in Vacuoles of Transgenic Tomato, Plant J., 61, 3, 495-506.
- Li, W., Zhang, C., Lu, Q., Wen, X. ve Lu, C., 2011. The Combined Effect of Salt Stress and Heat Shock on Proteome Profiling in Suaeda Salsa, J. Plant Physiol., 168, 15, 1743-1752.
- Liu, S., Zheng, L., Xue, Y., Zhang, Q., Wang, L. ve Shou, H., 2010. Overexpression of Osvp1 and Osnhx1 Increases Tolerance to Drought and Salinity in Rice, Journal of Plant Biology, 53, 6, 444-452.
- Martinez-Atienza, J., Jiang, X., Garcia-deblas, B., Mendoza, I., Zhu, J., K., Pardo, J., M. ve Quintero, F., J., 2007. Conservation of the Salt Overly Sensitive Pathway in Rice, Plant Physiol., 143, 2, 1001-1012.
- McDonald, G., K. ve Paulsen, G., M., 1997. High Temperature Effects on Photosynthesis and Water Relations of Grain Legumes, Plant and Soil, 196, 1, 47-58.
- Mian, A., Oomen, R., J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F., J. ve Very, A., A., 2011. Over-Expression of an Na⁺-and K⁺-Permeable Hkt Transporter in Barley Improves Salt Tolerance, Plant J., 68, 3, 468-479.
- Mohammad, P. ve Szabolcs, I., 2010. Soil Salinity and Sodicity as Particular Plant/Crop Stress Factors. Handbook of Plant and Crop Stress, Third Edition. M. Pessarakli, Ed., CRC Press, Baco Raton, 3-21.
- Munns, R., 2002. Comparative Physiology of Salt and Water Stress, Plant Cell Environ., 25, 2, 239-250.
- Munns, R., 2005. Genes and Salt Tolerance: Bringing Them Together, New Phytologist, 167, 3, 645-663.
- Munns, R. ve Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance, Annu. Rev. Plant Biol., 59, 651-681.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid GroKh and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, 15, 3, 473-497.
- Naqvi, S., Farre, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C. ve Christou, P., 2010. When More Is Better: Multigene Engineering in Plants, Trends Plant Sci., 15, 1, 48-56.
- Niu, X., Bressan, R., A., Hasegawa, P., M. ve Pardo, J., M., 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments, Plant Physiol., 109, 3, 735-742.

- Oh, D., H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S., M., Li, Y., Quintero, F., J., Jiang, X., D'urzo, M., P., Lee, S., Y., Zhao, Y., Bahk, J. D., Bressan, R. A., Yun, D. J., Pardo, J., M. ve Bohnert, H., J., 2009. Loss of Halophytism by Interference with *Sos1* Expression, Plant Physiol., 151, 1, 210-222.
- Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T. ve Hayakawa, T., 2002. Introduction of a Na^+/H^+ Antiporter Gene from *Atriplex Gmelini* Confers Salt Tolerance to Rice, FEBS Lett., 532, 3, 279-282.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P., A., Marin-Manzano, M., C., Pardo, J., M. ve Belver, A., 2009. The Plasma Membrane Na^+/H^+ Antiporter *Sos1* is Essential for Salt Tolerance in Tomato and Affects the Partitioning of Na^+ between Plant Organs, Plant Cell Environ., 32, 7, 904-916.
- Panta, S., Flowers, T., Lane, P., Doyle, R., Haros, G. ve Shabala, S., 2014. Halophyte Agriculture: Success Stories, Environmental and Experimental Botany, 107, 0, 71-83.
- Parida, A., Das, A., B. ve Mittra, B., 2004. Effects of Salt on GroKh, Ion Accumulation, Photosynthesis and Leaf Anatomy of the Mangrove, *Bruguiera Parviflora*, Trees., 18, 2, 167-174.
- Peleg, Z., Apse, M., P. ve Blumwald, E., 2011. Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. *Advances in Botanical Research*. T. Ismail, Ed., Academic Press, 405-443.
- Plett, D., Safwat, G., Gilliam, M., Skrummsager Moller, I., Roy, S., Shirley, N., Jacobs, A., Johnson, A. ve Tester, M., 2010. Improved Salinity Tolerance of Rice through Cell Type-Specific Expression of *Athkt1;1*, PLoS One, 5, 9, e12571.
- Porat, R., Pavoncello, D., Ben-Hayyim, G. ve Lurie, S., 2002. A Heat Treatment Induced the Expression of a Na^+/H^+ Antiport Gene (*Cnhx1*) in Citrus Fruit, Plant Science, 162, 6, 957-963.
- Qiao, W., H., Zhao, X., Y., Li, W., Luo, Y. ve Zhang, X., S., 2007. Overexpression of *Aenhx1*, a Root-Specific Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter from *Agropyron Elongatum*, Confers Salt Tolerance to *Arabidopsis* and *Festuca* Plants, Plant Cell Rep., 26, 9, 1663-1672.
- Qin, H., Gu, Q., Kuppu, S., Sun, L., Zhu, X., Mishra, N., Hu, R., Shen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, X., Burow, M., Payton, P. ve Zhang, H., 2013. Expression of the *Arabidopsis* Vacuolar H^+ -Pyrophosphatase Gene *Avp1* in Peanut to Improve Drought and Salt Tolerance, Plant Biotechnology Reports, 7, 3, 345-355.
- Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y., Burow, M., Payton, P., Blumwald, E. ve Zhang, H., 2011. Regulated Expression of an Isopentenyltransferase Gene (*Ipt*) in Peanut Significantly Improves Drought Tolerance and Increases Yield under Field Conditions, Plant Cell Physiol., 52, 11, 1904-1914.
- Qiu, Q., S., Guo, Y., Dietrich, M., A., Schumaker, K., S. ve Zhu, J., K., 2002. Regulation of *Sos1*, a Plasma Membrane Na^+/H^+ Exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *Sos2* and *Sos3*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 12, 8436-8441.

- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M., C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A., M., Nielsen, H., B. ve Mundy, J., 2013. Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*, Plant Physiol., 161, 4, 1783-1794.
- Reguera, M., Peleg, Z. ve Blumwald, E., 2012. Targeting Metabolic Pathways for Genetic Engineering Abiotic Stress-Tolerance in Crops, Biochim. Biophys. Acta., 1819, 2, 186-194.
- Rita, B. ve Frederick, L., C., 2005. Inhibition or Inactivation of Higher-Plant Chloroplast Electron Transport. Handbook of Photosynthesis, Second Edition, M. Pessarakli, Ed., CRC Press. 952 s.
- Rivero, R., M., Mestre, T., C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F. ve Martinez, V., 2014. The Combined Effect of Salinity and Heat Reveals a Specific Physiological, Biochemical and Molecular Response in Tomato Plants, Plant Cell Environ., 37, 5, 1059-1073.
- Rodríguez-Rosales, M., P., Gálvez, F., J., Huertas, R., Aranda, M., N., Baghour, M., Cagnac, O. ve Venema, K., 2009. Plant Nhx Cation/Proton Antiporters, Plant Signaling & Behavior, 4, 4, 265-276.
- Rukavtsova, E., B., Lebedeva, A., A., Zakharchenko, N., S. ve Buryanov, Y., I., 2013. The Ways to Produce Biologically Safe Marker-Free Transgenic Plants, Russian Journal of Plant Physiology, 60, 1, 14-26.
- Saidi, Y., Finka, A. ve Goloubinoff, P., 2011. Heat Perception and Signalling in Plants: A Tortuous Path to Thermotolerance, New Phytol., 190, 3, 556-565.
- Sanchez-Diaz, M., Perez de Juan, J. ve Irigoyen, J., J., 1993. The Effect of Chilling on Stomatal Behavior, Transpiration, Water Absorption and Carbon Dioxide Exchange Rate in Drought-Hardened and Non Hardened Maize (*Zea mays L*). Crop Adaptation to Cool, Wet, Climates. D. Wilson, H. Thomas and K. Pithan. Brussels, Office for Official Publications of the European Communities: 245-250.
- Schmidt, M., A., LaFayette, P., R., Artelt, B., A. ve Parrott, W., A., 2008. A Comparison of Strategies for Transformation with Multiple Genes Via Microprojectile-Mediated Bombardment, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 44, 3, 162-168.
- Setimela, P., S., Andrews, D., J., Partridge, J. ve Eskridge, K., M., 2005. Screening Sorghum Seedlings for Heat Tolerance Using a Laboratory Method, European Journal of Agronomy, 23, 2, 103-107.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. ve Zhu, J., K., 2000. The *Arabidopsis* Thaliana Salt Tolerance Gene *Sos1* Encodes a Putative Na⁺/H⁺ Antiporter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 12, 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F., J., Pardo, J., M. ve Zhu, J., K., 2002. The Putative Plasma Membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ Antiporter *Sos1* Controls Long-Distance Na⁽⁺⁾ Transport in Plants, Plant Cell, 14, 2, 465-477.
- Singh, S., C., Sinha, R., P. ve Hader, D., P., 2002. Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria, Acta protozoologica, 41, 4, 297-308.
- Sinhamahapatra, S., P., Raman, R., B., Roy, S., Roy, U., S., Raut, N., M. ve Ashok, K., V., 2010. Breeding for an Ideal Plant Type in Yellow Sarson (*Brassica Rapa L*. Yellow Sarson), Electronic Journal of Plant Breeding, 1, 4, 689-694.

- Tester, M. ve Bacic, A., 2005. Abiotic Stress Tolerance in Grasses. From Model Plants to Crop Plants, Plant Physiology, 137, 3, 791-793.
- Turan, S., Cornish, K. ve Kumar, S., 2012. Salinity Tolerance in Plants: Breeding and Genetic Engineering, Australian J. Crop Sci., 1337-1348.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, Methods Enzymol., 428, 419-438.
- Uchida, A., Jagendorf, A., T., Hibino, T., Takabe, T. ve Takabe, T., 2002. Effects of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide on Both Salt and Heat Stress Tolerance in Rice, Plant Science, 163, 3, 515-523.
- URL-1. www.Snapgene.Com/Resources/Plasmid_Files/Plant_Vectors/Pbi121/. 23 Temmuz 2015.
- URL-2. www.Proteome.Wayne.Edu/Vectorsandstrains/Pjg4-5.Jpg. 23 Temmuz 2015.
- Waditee, R., Tanaka, Y. ve Takabe, T., 2006. Na⁺/H⁺ Antiporters in Plants and Cyanobacteria. Abiotic Stress Tolerance in Plants. A. Rai and T. Takabe, Eds., Springer Netherlands: 163-175.
- Wang, J., Zuo, K., Wu, W., Song, J., Sun, X., Lin, J., Li, X. ve Tang, K., 2004. Expression of a Novel Antiporter Gene from Brassica Napus Resulted in Enhanced Salt Tolerance in Transgenic Tobacco Plants, Biologia Plantarum, 48, 4, 509-515.
- Wang, Y. ve Nii, N., 2000. Changes in Chlorophyll, Ribulose Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase, Glycine Betaine Content, Photosynthesis and Transpiration in Amaranthus Tricolor Leaves During Salt Stress, J. Hort. Sci. Biotech., 75, 623-627.
- Wei, A., He, C., Li, B., Li, N. ve Zhang, J., 2011. The Pyramid of Transgenes Tsvp and Beta Effectively Enhances the Drought Tolerance of Maize Plants, Plant Biotechnol. J., 9, 2, 216-229.
- Witcombe, J., R., Hollington, P., A., Howarth, C., J., Reader, S. ve Steele, K., A., 2008. Breeding for Abiotic Stresses for Sustainable Agriculture, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 363, 1492, 703-716.
- Xu, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J., M. ve Cui, D., 2008. Functional Characterization of a Wheat Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter in Yeast, Arch. Biochem. Biophys., 473, 1, 8-15.
- Xue, Z., Y., Zhi, D., Y., Xue, G., P., Zhang, H., Zhao, Y., X. ve Xia, G., M., 2004. Enhanced Salt Tolerance of Transgenic Wheat (*Triticum aestivum* L.) Expressing a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene with Improved Grain Yields in Saline Soils in the Field and a Reduced Level of Leaf Na⁺, Plant Science, 167, 4, 849-859.
- Yang, Q., Chen, Z., Z., Zhou, X., F., Yin, H., B., Li, X., Xin, X., F., Hong, X. H., Zhu, J. K. ve Gong, Z., 2009. Overexpression of Sos (Salt Overly Sensitive) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*, Mol. Plant, 2, 1, 22-31.
- Yin, X., Y., Yang, A., F., Zhang, K., W. ve Zhang, J., R., 2004. Production and Analysis of Transgenic Maize with Improved Salt Tolerance by the Introduction of Athx1 Gene, Acta Botanica Sinica English Edition, 46, 7, 854-861.
- Yue, Y., Zhang, M., Zhang, J., Duan, L. ve Li, Z., 2012. Sos1 Gene Overexpression Increased Salt Tolerance in Transgenic Tobacco by Maintaining a Higher K⁽⁺⁾/Na⁽⁺⁾ Ratio, J. Plant Physiol., 169, 3, 255-261.

- Zhang, H., X. ve Blumwald, E., 2001. Transgenic Salt-Tolerant Tomato Plants Accumulate Salt in Foliage but Not in Fruit, Nat. Biotechnol., 19, 8, 765-768.
- Zhang, H., X., Hodson, J., N., Williams, J., P. ve Blumwald, E., 2001. Engineering Salt-Tolerant Brassica Plants: Characterization of Yield and Seed Oil Quality in Transgenic Plants with Increased Vacuolar Sodium Accumulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 22, 12832-12836.
- Zhang, J., L. ve Shi, H., 2013. Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Salt Tolerance, Photosynthesis Research, 115, 1, 1-22.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J. ve Ismail, A., M., 2006. Role of Aba in Integrating Plant Responses to Drought and Salt Stresses, Field Crops Research, 97, 1, 111-119.
- Zhang, Y., M., Liu, Z., H., Wen, Z., Y., Zhang, H., M., Yang, F. ve Guo, X., L., 2012. The Vacuolar Na^+-H^+ Antiport Gene *Tanhx2* Confers Salt Tolerance on Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa*), Functional Plant Biology, 39, 8, 708-716.
- Zhao, F., Y., Zhang, X., J., Li, P., H., Zhao, Y., X. ve Zhang, H., 2006. Co-expression of the *Suaeda salsa* *Ssnhx1* and *Arabidopsis* *Avp1* Confer Greater Salt Tolerance to Transgenic Rice Than the Single *Ssnhx1*, Molecular Breeding, 17, 4, 341-353.
- Zhou, S., Zhang, Z., Tang, Q., Lan, H., Li, Y. ve Luo, P., 2011. Enhanced V-ATPase Activity Contributes to the Improved Salt Tolerance of Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter *Atnhx1*, Biotechnol. Lett., 33, 2, 375-380.
- Zhu, J., K., Liu, J. ve Xiong, L., 1998. Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition, Plant Cell, 10, 7, 1181-1191.
- Zuluaga, D., L., Gonzali, S., Loreti, E., Pucciariello, C., Degl'Innocenti, E., D., Guidi, L., Alpi, A. ve Perata, P., 2008. *Arabidopsis thaliana* Myb75/Pap1 Transcription Factor Induces Anthocyanin Production in Transgenic Tomato Plants, Functional Plant Biology, 35, 7, 606-618.

8. EKLER

Çalışmada kullanılan vektör, ilgili genler ve restriksiyon endonükleazlar.

TGAGCGTCGCAAAGCGCCTCGGTCTTGCCCTTGCTCGTCGGTGATGTACTTCA
CCAGCTCCGCGAAGTCGCTCTTCTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGC
AATCACGCGCACCCCCCGCCGTTTTAGCGGCTAAAAAAGTCATGGCTCTGC
CCTCGGGCGGACCACGCCATCATGACCTTGCCAAGCTCGTCCTGCTTCTCTT
CGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGCATCACCGAACCGCCCGTGC
GCGGGTCGTCGGTGAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCGCCAGGCCGCCAGGT
CGCCATTGATGCGGGCCAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCCCGT
GATTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAGCAGGTAGGCCGACAGGCTCATGCCG
GCCGCCGCCGCTTTTCTCAATCGCTCTTCGTTCTGCTGGAAGGCAGTACAC
CTTGATAGGTGGGCTGCCCTTCCGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCCGCT
TGCCCTCATCTGTTACGCCGGCGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATT
CCCCTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAAGGAACACCC
GCTCGCGGGTGGGCCACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGGATA
CACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCGA
AAAAGGATGGATATACCGAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGCAGGGTT
ATGCAGCGGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG
GAAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA
GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCGCTTTTGTGGCCTTTTGTACAT
GTTCTTTCGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTG
AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG
TGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAGAAGGCCGCCAGAGAGGCCGAGCGC
GGCCGTGAGGCTTGGACGCTAGGGCAGGGCATGAAAAAGCCGTAGCGGGC
TGCTACGGGCGTCTGACGCGGTGGAAGGGGGAGGGGATGTTGTCTACATG
GCTCTGCTGTAGTAGTGGGTTGCGCTCCGGCAGCGGTCCTGATCAATCGTC
ACCCTTTCGCGTCTTCAACGTTCTGACAACGAGCCTCCTTTTCGCCAATC
CATCGACAATACCGCGAGTCCCTGCTCGAACGCTGCGTCCGGACCGGCTTC
GTCGAAGGCGTCTATCGGGCCCGCAACAGCGGCAGAGCGGAGCCTGTTC
AACGGTGCCGCCGCGCTCGCCGGCATCGTGTGCGCGCCTGCTCCTCAAGC
ACGGCCCCAACAGTGAAGTAGCTGATTGTCATCAGCGCATTGACGGCGTCCC
CGGCCAAAAACCGCCTCGCAGAGGAAGCGAAGCTGCGCGTCGGCCGTTT
CCATCTGCGGTGCGCCGGTCCGCTGCGGCGCATGGATGCGCGCGCCATCGCG
GTAGGCGAGCAGCGCCTGCTGAAAGCTGCGGGCATTCCCGATCAGAAATGA

Açıklama [N1]: pBl1.21 sekansı bağlantısı

GCGCCAGTCGTCGTCGGCTCTCGGCACCGAATGCGTATGATTCTCCGCCAGC
 ATGGCTTCGGCCAGTGCCTCGAGCAGCGCCCGCTTGTTCC TGAAGTGCCAGT
 AAAGCGCCGGCTGCTGAACCCCAACCGTTCGCCAGTTTGCGTGTGTCAG
 ACCGCTACGCCGACCTCGTTCAACAGGTCCAGGGCGGCACGGATCACTGTA
 TTCGGCTGCAACTTTGTCATGCTTGACACTTTATCACTGATAAACATAATATG
 TCCACCAACTTATCAGTGATAAAGAATCCGCGCGTTCAATCGGACCAGCGGA
 GGCTGGTCCGGAGGCCAGACGTGAAACCCAACATAACCCCTGATCGTAATTCT
 GAGCACGTGTCGCGCTCGACGCTGTCGGCATCGGCCCTGATTAIGCCGGTGTG
 CCGGGCTCCTGCGCGATCTGGTTCAC TCGAACGACGTCACCGCCACTATG
 GCATTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGGTGCAATTTGCC TGCACCTGTGCTG
 GCGCGCTGTGGATCGTTTCGGGCGGCGCCAATCTTGC TCGTCTCGCTGG
 CCGGCCAGATCTGGGGAACCCGTGTGTTGGCATGCACATACAAATGGAC
 GAACGGATAAACCTTTTACGCCC TTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACG
 CTC TTTCTCTTAGGTTTACCCGCAATATATCCTGTCAAACTGATAGTT
 AAAC TGAAGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGAG
 TCACGTTATGACCCCGCCGATGACGCGGACAAGCCGTTT TACGTTTGAA
 CTGACAGAACC GCAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTT
 TAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAGTCGC
 CTAAGTCACTATCAGCTAGCAAATATTTCTGTCAAAAATGCTCCACTGAC
 GTTCCATAAAATTTCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATC
 CAAATAATCTGCACCGATCTGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGAT
 TGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTG
 GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCCGGCTGTCAGCG
 CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTC
 CTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAC TGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCT
 ATTGGCGAAGTGCCGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCC
 GAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGATC
 CGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
 GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC
 ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAC TGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCC
 CGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGCCGAATATC
 ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA TCGACTGTGGCCGGCTGGGTG
 TGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGA
 GCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTCGTTTACGGTATCGCCGCT
 CCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGC
 GGGACTCTGGGGTTGCAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCA

Açıklama [N2]: T-DNA'nın sağ sınırı 25 bp

CGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCG
 TTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGA
 GTTCTTCGCCACGGGATCTCTGCGGAACAGGCGGTGCAAGGTGCCGATATC
 ATTACGACAGCAACGGCCGACAAGCACAACGCCACGATCCTGAGCGACAAT
 ATGATCGGGCCCGGCTCCACATCAACGGCGTCGGCGGCGACTGCCAGGC
 AAGACCGAGATGCACCGCGATATCTTGTGCGTTCCGATATTTTCGTGGAGT
 TCCCGCCACAGACCCGGATGATCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG
 TTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTC
 TGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTT
 ATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAATACGCGA
 TAGAAAAAAAATATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGT
 CATCTATGTTACTAGATCGGGCCTCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTG
 GTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
 GGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGAT
 TTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAAT
 GCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAAGGCAAAC TTGATTCTGTGCG
 C TACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTT
 GCTAATGGTAATGGTGTACTGGTGATTTTGTGCGCTCTAATTCCAAATGGC
 TCAAGTCGGTGACGGTGATAATCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCATATT
 TACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCCCAATA
 CGCAAACCGCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCTGGCACG
 ACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
 GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
 ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG
 ACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCGTCAGGTCCCCAGATTAGCCTTTTC
 AATTTAGAAAAGAAATGCTAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCA
 GGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACC
 TTCCAAGAAGGTTAAAAGATGCAGTCAAAAAGATTCAGGACTAACTGCATCA
 AGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATG
 GACGATTCAAGGCTTGCTTCCAAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGT
 CTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAA
 ATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAG
 AGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGC
 ACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
 AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGA
 TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAG
 GTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGA

Açıklama [N3]: Gyp Upstream Primer

Açıklama [N4]: HindIII

Açıklama [N5]: 355-415RW

TGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
 GTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGT
 GATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACATCCTTCGCAAG
 ACCCTTCCCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACCGGGGAC
 TCTAGAGGATCCCGCTCGAAGGTCGACATGTTGGATTCTCTAGTGTCCAAACT
 GCCTTCGTTATCGACATCTGATCACGCTTCGTGGTTGCGTTGAATCTCTTG
 TTGCATTCCTTTGTGCTTGATTGTTCTTGGTCATCTTTTGGAAAGAGAATAGA
 TGGATGAACGAATCCATCACCGCCTTGTGATTGGGCTAGGCACTGGTGTA
 CCATTTTGTGATTAGTAAAGGAAAAAGCTCGCATCTTCTCGCTTTAGTGAA
 GATCTTTTCTCATATATCTTTTGGCACCCATTATATTCAATGCAGGGTTTCA
 AGTAAAAAGAAGCAGTTTTTCCGCAATTTCTGACATTATGCTTTTTGGTG
 CTGTTGGGACTATTATTCTTGCACAATCATATCTCTAGGTGTAACACAGTTC
 TTTAAGAAGTTGGACATTGGAACCCTTGACTTGGGTGATTATCTTGCTATTGG
 TGCCATATTTGCTGCAACAGATTCAGTATGTACACTGCAGGTTCTGAATCAA
 GACGAGACACCTTTGCTTTACAGTCTTGTATTGCGAGAGGGTGTGTGAATG
 ATGCAACGTCAGTTGTGGTCTTCAACGCGATTACAGAGCTTTGATCTCACCTCAC
 CTAACCACGAAGCTGCTTTTTCATCTTCTTGGAAACTTCTTGTATTTGTTTCTC
 CTAAGTACCTTGCTTGGTGC TGAACCGGTC TGAATAAGTGCATGTTATCA
 AGAAGCTATACTTTGGAAGGCAC TCAACTGACCGAGAGGTTGCCCTTATGAT
 GCTTATGGCGTATCTTCTTATATGCTTGTGAGCTTTTCTGACTTGAGCGGTA
 TCCTCTACTGTGTTTTCTGTGGTATTGTGATGTCCATTACACATGGCACAAT
 GTAACGGAAGAGCTCAAGAATAACAACAAGCATACTTTGCAACTTGTGAT
 TTCTTGC GGAGACATTTATTTCTTGTATGTTGGAATGGATGCCCTGGACATT
 GACAAGTGGAGATCCGTGAGTGACACACCGGAACATCGATCGCAGTGAGC
 TCAATCCTAATGGGCTGGTCATGGTTGGAAGAGCAGCGTTCGCTTTCCGTT
 ATCGTTCTATCTAACTTAGCCAAGAAGAATCAAAGCGAGAAAATCAACTTT
 AACATGCAGGTTGTGATTTGGTGGTCTGGTCTCATGAGAGGTGCTGTATCTA
 TGGCTCTTGCATAACAAGTTTACAAGGGCCGGGCACACAGATGTACGCGG
 GAATGCAATCATGATCACGAGTACGATAACTGTCTGTCTTTTTAGCACAGTG
 GTGTTTGGTATGCTGACCAAACCACTCATAAGCTACCTATTACCACACCAGA
 ACGCCACCACGAGCATGTTATCTGATGACAACACCCCAAAATCCATACATAT
 CCCTTTGTGGACCAAGACTCGTTCATTGAGCCTCAGGGAACCACAATGTG
 CCTCGGCCTGACAGTATACGTGGCTTCTTGACACGGCCACTCGAACCGTGC
 ATTACTACGAGACAATTTGATGACTCCTTCATGCGACCCGCTTTGGAGGT
 CGTGGCTTTGTACCCTTTGTTCCAGGTTCTCCAACCTGAGAGAAACCCCTCTGA
 TCTTAGTAAGGCTTGAAGGTAACGTGGAGAAAGAGCTCGAATTTCCCGATC
 GTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT

Açıklama [N6]: 35S promotor

Açıklama [N7]: XbaI

Açıklama [N8]: BamHI

Açıklama [N9]: XhoI

Açıklama [N10]: Sall

Açıklama [N11]: *ArNHX1* geni başlangıcı

Açıklama [N12]: NHX1 FW

Açıklama [N13]: NHX4 RW

Açıklama [N14]: NHX2 FW

Açıklama [N15]: NHX5 RW

Açıklama [N16]: NHX3 FW

Açıklama [N17]: SacI

Açıklama [N18]: SacI

Açıklama [N19]: NHX6 RW

Açıklama [N20]: NHX7 RW

Açıklama [N21]: *ArNHX1* geni bitimi

Açıklama [N22]: HindIII ile küt yapılabilmek için SacI ile ligasyon yapılan bölge

GCGATGATTATCATATAAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAA
 CATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCC GC
 AATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAGG
 AATAATTATCGCGCGGGTGCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTCGGCCG
 A[CTCGAC]AGCTTGCATGCCTGCAGGTCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTCA
 GAAAGAATGCTAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCA
 TCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTCCCAA
 GAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTCAAGACTAAGTGCATCAAGAACAC
 AGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATT
 CAAGGCTTGCTTACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAA
 AAGGTAGTCCCAC TGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAG
 GACCTAACAGAACTCGCCGTAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCT
 TACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACA
 CACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC AAAAGGC
 AATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAAACCCTCCGGATTCCAT
 TGCCCAGCTATCTGTCAC TTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCT
 CCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC TC
 TGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGG A
 AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTC TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATC
 TCCACTGACGTAAGGATGACGCACAATCCCACTATCTTCGCAAGACCCTT
 CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGAC[TCTAGA]
 ATGACGACTGTAATCGACGCGACGATGGCGTATAGATTTCTGGAGGAAGCG
 ACCGATTCGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCAAACTAGAATCTAGCCCTGTCGA
 C]GCCGTTCTCTTCGTCGGAATGCTCTCGGTACTCGGTATTGCTTCTAGGCACT
 TGCTTCGTGGAAC TAGGGTTCCCTACAC TGTCGCTCTTCTCGTTATCGGAATT
 GCTCTTGGATCTCTCGAATATGGAGCTAAACATAACCTTGAAAGATCGGCC
 ATGGAATTCGTATCTGGAATGAGATCGATCCAGAAC TCTTTTAGCTGTTTTT
 CTCCGGCTCTTCTTTTCGAGAGTTCGTTTTCAATGGAAGTTCACCAAATTA
 GAGGTGCTGGGACAAATGGTGTACTTTGCTGTCCC TGGAGTCTTATTTCAA
 CAGCTTGTCTTGGATCGCTTGTGAAGGTCACGTTTTCCGTATGAATGGGACTG
 GAAAACGCTCTTGTGCTTGGGGGACTTTTAAGTGTACTGATCCGGTTGCTG
 TTGTTGCTTTGCTAAAGGAGCTTGGTGTAGTAAGAAGCTAAGCACCATAAT
 TGAAGGGGAATCCC TGATGAATGATGGGACGGCGATTGTTGTTTTCCAGTTA
 TTCTTAAAGATGGCTATGGGGCAAACCTCGACTGGAGTTCATAATCAAAT
 TTCTGCTTAAAGTCGCAC TTGGAGCTGTAGGCATTGGCTGGCGTTTGGCATT
 GCATCAGTATTTGGCTCAAGTTCATATTCAATGACACTGTAATAGAGATTA
 CTCTTACAATTGCAGTGAGCTATTTCCGATACTACACTGCTCAAGAGTGGGC

Açıklama [N23]: EcoRI

Açıklama [N24]: XhoI

Açıklama [N25]: HindIII

Açıklama [N26]: 35S-415RW

Açıklama [N27]: 35S promotor

Açıklama [N28]: XbaI

Açıklama [N29]: 50S-1 geni başlangıcı

Açıklama [N30]: Sall

Açıklama [N31]: EcoRI

TGGGGCTTCGGTGTTTTGACGGTCATGACTTTGGGCATGTTTTATGCTGCAT
 TTGCAAGGACAGCCTTAAAGGTGACAGTCAAAA**AAGCTT**GCATCACTTCTG
 GGAAATGGTTGCATATATTGCAAACACTTTGATATTTATCCTCAGTGGTGTG
 TCATTGCTGAAGGCATTCTCGACAGTGATAAGATTGCCTACCAAGG**GAATTC**
 ATGGCGAATTTCTTTTTCGCTATACGTTTACATCCAACATCCGCTGTTGTTGT
 TGTGGAGTTCTATATCCACTTTTATGTCGTTTTGGCTATGGTTTGGATTGGA
 AAGAATCCATTATACTCGTATGGTCTGGTTTGGAGGGCGCAGTGGCTCTTGC
 ACTTCTTTATCCGTGAAGCAATCAAGCGGAAATTCACATATCAGCAAGGAG
 ACTGGAACATTGTTCTTTTCTCACGGGTGGAATTGTGTTCTAACTCTGAT
 AGTTAAAT**GGATCC**ACTACCCAAATTTGTTCTACGCCTTCTCGCATGGATATT
 TACCAGCCCCAAGAAACGAATATTGGAATATACAAAGTACGAAATGTTGA
 ATAAGGCCTTACGAGCGTTTCAAGATCTAGGAGACGATGAGGAGCTAGGAC
 CTGCTGACTGGCCACAGTTGAAAGTTATTTCAAGCCTAAAAGGTTCCAGA
 AGGGGAAC TAGTTCATCATCCTCACAAATGGCTCTAAAATTGGAAAGTCTTGAC
 CCTAAAAGTTTAAAGGACATACGTATGCGGTTCTTAAATGGTGTGCAAGCAA
 CTTACTGGGAGATGCTTGATGAGGGCAGAATATCTGAAGTTACTGCTAATAT
 TTTGATGCAGTCACTGGAATGAGGCGCTTGATCAGGTTTCTACAACTTTATGTG
 ATTGGAGAGGTTCAAACCACATGTCAATTTCCAAATTACTACAACTTCTT
 CATTCTAAAGTTGTCCACGCAAGTTGGTCCACATACTTTGCTGTGCGAAAGAC
 TAGAATCTGCTTGTACATTTCTGCTGCGTTTCTTCGCGCACATACAATTGCA
 CGACAGCAATTGTATGATTTTCTAGGGGAGAGTAATATTGGTTCCATTGTAA
 TCAATGAAAAGTGAAAAGGAAGGAGAGGAAGCAAAAAAGTTCTTGAAAAAA
 GTCCGATCTTCAATTTCCACAGGTTCTCCGTGTTGTGAAAACAAAACAAGTAA
 CATATTCAGTGTGAATCATTACCGGTTACATTGAAAA**CTCGAG**AAGGT
 TGGCTTGTGGAGGAAAAAGAAATCGCTCATCTTCATGATGCTGTCCAGACC
 GGCTTGAAA**AAGCTT**TTGAGAAACCCCTCCAATAGTTAAACTTCCAAAATTGA
 GCGACATGATCACCACATCCGTTATCGGTTGCTCTTCCCTCGCATTTTGT
 GAACCTTAAAACACTCGAAAAAAGAACC AATGAAACTGCGTGGTGTACG
 CTTTATAAAGAAGGTTCAAAGCCAAC TGGAGTCTGGCTTATTTTTGATGGCA
 TCGTTAAGTGGAAAAGTAAGATCTTAAGCAACAATCACTCGCTGCATCCAAC
 TTTTCTCACGGTAGTACATTGGGACTCTACGAAGTCC TACTGGGAAGCCA
 TATCTGTGCGACTTGATTACAGATTCTATGGTTCTTTGCTTTTTCATTGATAGC
 GAGAAAATCTATCACTACAATCAGATTCTACCATCGATGATTTC TTTGGCA
 GGAAAGTGCATTGGTTCTTCTCAAACCTTGGCTCCTCAGATATTGAAAGTG
 TGGCAATGCAAGAATTACGAGCCCTTGTTTCAACTGAAAGCTCGAAACTTAC
 AACATATGTGACGGGAGAATCAATCGAAATCGACTGCAACAGCATTGGTTTA
 TTATTAGAAGGATTCGTA AAAACCGGTTGGTATCAAAGAAGAGCTTATATCAT

Agklama [N32]:HindIII

Agklama [N33]:EcoRI

Agklama [N34]:BamHI

Agklama [N35]:XhoI

Agklama [N36]:HindIII

CTCCCGCCGATTATCACCTTCTAACGGGAATCA**AAGCTT**CCATAATTCATCA
 G**AAGCTT**CAGGTATCATGAGAGTCAGTTTCTACAACAAGCAACACAGTATA
 TTGTTGAGACGAGAGCAAGAGCAATCATCTTCAACATTGGAGCATTGGAGC
 TGATAGGACTCTACATCGAAGACCATCTTCGTTAACACCACCACGTAGCTCA
 AGCTCTGATCAGCTTCAGAGATCATTTCGTAAAGAACACAGAGGTCATGA
 GCTGGCCTGAAAATATTTACGCCAAACAACAACAAGAGATCAATAAACGA
 CATTAAAGTTTATCTGAACGAGCAATGCAACTCAGCATTTCGGCAGCATGGT
 TAAATGTGTACAGAAGGAGTGTAAAGTTTCGGTGGGATCTATAATAACAAGTTA
 CAAGATAACTTGTGTACAAAAAATTCCTACTAAACCCAGCTCAAGGTCTCG
 TTTCAGCCAAATCAGAAAGTTCAATTGTGACCAAGAAGCAGCTTGAAACCCG
 TAAACATGCGTGTACAGTTCCCTCTGAAAGGGGAAAGCAGCACAAAGGCAAAA
 TACGATGGTTGAATCAAGCGATGAAGAAGATGAAGATGAAGGAATCGTTGT
 GAGAATCGATTCTCCGAGT**AAAATCGTTTTCAGG**ACGATCTATGA**GAGCTC**
 GAATTTCCCCGATCGTTCAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATC
 CTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAG
 CATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTATGAGATGGGTTTTTAT
 GATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAG
 CGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGATC
 GG**GAATTC**ACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCG
 TTACCCAACCTAATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT
 AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
 GCGCCCGCTCCTT**TCGCTTCTCCCTTCCTTCT**CGCCACGTTCCGCCGGCTTT
 CCCCCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTT
 ACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG
 CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTT
 TAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGGC
 TATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGGAACCAACATCAAACAG
 GATTTTCGCCCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTC
 AGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACGGTGAAAA
 GAAAAACCAACCCAGTACATTAATAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
 TAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCTGCCACCAGCCAGCCAACA
 GCTCCCCGACCGGCA**GCTCGGCACAAAATCACCCTCGAT**ACAGGCAGCCC
 ATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTT
 GCTCATGTTACCGATGCTATTTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTG
 AAACACGGATGATCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGA
 GCGTTGCTGCTGTGATCAAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCGAATTATC
 AGCCTTCTTATTCAATTTCTCGCTTAACCGTGACAGGCTGTGATCTTGAGAAC

Açıklama [N37]:HindIII

Açıklama [N38]:HindIII

Açıklama [N39]:505-1 geni bitimi

Açıklama [N40]:SacI

Açıklama [N41]:EcoRI

Açıklama [N42]:Primer: Gyp Downstream

Açıklama [N43]:T-DNA'nın sol sınır 25 bp

TATGCCGACATAATAGGAAATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAAGCTGAGT
GGCGCTATTTCTTTAGAAAGTGAACGTTGACGATATCAACTCCCCTATCCATTG
CTCACCGAATGGTACAGGTCGGGGACCCGAAGTTCCGACTGTTCGGCCTGATG
CATCCCCGGCTGATCGACCCCAGATCTGGGGCTGAGAAAAGCCAGTAAGGA
AACAACTGTAGGTTTCGAGTCGCGAGATCCCCGGAACCAAAGGAAGTAGGT
TAAACCCGCTCCGATCAGGCCGAGCCACGCCAGGCCGAGAACATTGGTTCCCT
GTAGGCATCGGGATTGGCGGATCAAACACTAAAGCTACTGGAACGAGCAGA
AGTCTCCGGCCGCCAGTTGCCAGGCCGTAAAGGTGAGCAGAGGCACGGGA
GGTTGCCACTTGCGGGTCAGCACGGTTCCGAACGCCATGGAAACCGCCCCG
CCAGGCCCGCTGCGACGCCGACAGGATCTAGCGCTGCGTTTGGTGTCAACAC
CAACAGCGCCACGCCCGCAGTTCCGCAAATAGCCCCAGGACCGCCATCAAT
CGTATCGGGCTACCTAGCAGAGCGGCAGAGATGAACACGACCATCAGCGGC
TGCACAGCGCCTACCGTCGCCGCGACCCCGCCCGGCAGGCCGTAGACCGAA
ATAAACAACAAGCTCCAGAATAGCGAAATATTAAGTGCGCCGAGGATGAAG
ATGCGCATCCACCAGATTCCCGTTGGAATCTGTTCGGACGATCATCACGAGCA
ATAAACCCGCCGGCAACGCCCGCAGCAGCATAACGGCGACCCCTCGGCCTC
GCTGTTCCGGGCTCCACGAAAACGCCGGACAGATGCGCCTTGTGAGCGTCTT
GGGGCCGTCTCTGTTTGAAGACCGACAGCCCAATGATCTCGCCGTGATG
TAGGCGCCGAATGCCACGGCATCTCGCAACCGTTCAGCGAACGCCTCCATGG
GCTTTTTCTCCTCGTGCTCGTAAACGGACCCGAACATCTCTGGAGCTTCTTC
AGGGCCGACAATCGGATCTCGCGGAAATCTGCACGTGCGCCGCTCCAAGCC
GTCGAATCTGAGCCTTAATCACAATTGTCAATTTAATCTCTGTTTATCGGC
AGTTCGTAGAGCGCGCCGTGCGTCCCAGCGATACTGAGCGAAGCAAGTGC
GTGAGCAGTGCCCGCTTGTTCCTGAAATGCCAGTAAAGCGCTGGCTGCTGA
ACCCCCAGCCGAACTGACCCCAAGGCCCTAGCGTTTGCAATGCACCAGG
TCATCATTGACCCAGGCGTGTCCACCAGGCCGCTGCCTCGCAACTCTTCGC
AGGCTTCGCCGACCTGCTCGCGCCACTTCTTACGCGGGTGAATCCGATCC
GCACATGAGGCGGAAGGTTTCCAGCTTGAGCGGGTACGGCTCCCAGGTGCGA
GCTGAAATAGTCGAACATCCGTCGGGCCGTCGGCGACAGCTTGCGGTACTTC
TCCCATATGAATTTCTGTGTAGTGGTCGCCAGCAAACAGCACGACGATTTCT
CGTCGATCAGGACCTGGCAACGGGACGTTTTCTTGCCACGGTCCAGGACGCG
GAAGCGGTGCAGCAGCGACACCGATTCCAGGTGCCAACGCGGTTCGGACGT
GAAGCCATCGCCGTCGCTGTAGGCGCGACAGGCATTCCTCGGCCTTCGTG
TAATACCGCCATTGATCGACCAGCCAGGTCCTGGCAAAGCTCGTAGAACG
TGAAGGTGATCGGCTCGCCGATAGGGGTGCGCTTCGCGTACTCCAACACCTG
CTGCCACACCAGTTCGTCATCGTCGGCCCGCAGCTCGACGCCGGTGTAGGTG
ATCTTACGTCCTTGTGACGTGAAAATGACCTTGTTTTGCAGCGCCTCGCG

CGGGATTTTCTTGTTGCGCGTGGTGAACAGGGCAGAGCGGGCCGTGTCGTTT
GGCATCGCTCGCATCGTGTCCGGCCACGGCGCAATATCGAACAAGGAAAGC
TGCATTTCCCTTGATCTGCTGCTTCGTGTGTTTCAGCAACGCGGCCTGCTTGGC
CTCGCTGACCTGTTTTGCCAGGTCCTCGCCGGCGGTTTTTCGCTTCTTGGTCG
TCATAGTTCCCTCGCGTGTGTCGATGGTCATCGACTTCGCCAAACCTGCCGCCTCC
TGTTTCGAGACGACGCGAACGCTCCACGGCGGCCGATGGCGCGGGCAGGGCA
GGGGGAGCCAGTTGCACGCTGTCGCGCTCGATCTTGGCCGTAGCTTGCTGGA
CCATCGAGCCGACGGACTGGAAGGTTTTGCGGGGGCGCACGCATGACGGTGC
GGCTTGCGATGGTTTCGGCATCCTCGGCGGAAAACCCCGCGTCGATCAGTTC
TTGCCGTGATGCCTTCGGTCAAACGTCCGATTCATTCACCCTCCTTGCGGGA
TTGCCCCGACTCACGCCGGGGCAATGTGCCCTTATTCCTGATTTGACCCGCT
GGTGCTTGGTGTCCAGATAATCCACCTTATCGGCAATGAAGTCGGTCCCCT
AGACCGTCTGGCCGTCTTCTCGTACTTGGTATTCCGAATCTTGCCCTGCACG
AATACCAGCGACCCCTTGCCCAAATACTTGCCGTGGGCCTCGGCCTGAGAGC
CAAAACACTTGATGCGGAAGAAGTCGGTGCCTCCTGCTTGTCGCCGGC
GTTGCGCCACATCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAAATATAATATTT
TATTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACA
TACTGTTCTTCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAGAAGGCAATGT
CATACCACTTGTCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACT
TTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGCTCCTCCAGGTCGCCGTGGGAAAAGA
CAAGTTCCTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCGCGGA
TCTTTAAATGGAGTGTCTTCTTCCAGTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATC
GTTATTCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCGTAT
AGGGACAATCCGATATGTGTCGATGGAGTGAAGAGCCTGATGCACTCCGCAT
ACAGCTCGATAATCTTTTCAGGGCTTGTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAA
AGGACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTT
CAAAGTGCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCAT
GTCTTTTCCCGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTATAACCGGCTGTCCGTCA
TTTTTAAATATAGGTTTTTCATTTCTCCCACCAGCTTATATACCTTAGCAGGA
GACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGTTTTTTCAAT
TCCGGTGATATTCTCATTTTAGCCATTTATTATTTCTTCTCTTTTCTACAGT
ATTTAAAGATAACCCCAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACCTCAATTCAT
GTTCCCTGCATTCTAAAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTCAAAGTTGT
TTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCACA
ATTATGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAG
GTGCTCCAGTGGCTTCTGTGTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGAC
GGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTATCTCTGCT

CTCACTGCCGTAAAACATGGCAACTGCAGTTCAC TTACACCGCTTCTCAACC
 CGGTACGCACCAGAAAATCATTGATATGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGG
 GCAACAGCCCGCATTATGGGCGTTGGCCTCAACACGATTTTACGTCACCTAA
 AAAACTCAGGCCGCAGTCGGTAACCTCGCGCATAACAGCCGGGCAGTGACGT
 CATCGTCTGCGCGGAAATGGACGAACAGTGGGGCTATGTCGGGGCTAAATC
 GCGCCAGCGCTGGCTGTTTTACGCGTATGACAGTCTCCGGAAGACGGTTGTT
 GCGCACGTATTCGGTGAACGCAC TATGGCGACGCTGGGGCGTCTTATGAGCC
 TGCTGTCACCCTTTGACGTGGTGATATGGATGACGGATGGCTGGCCGCTGTA
 TGAATCCCGCCTGAAGGGAAAGCTGCACGTAATCAGCAAGCGATATACGCA
 GCGAATTGAGCGGCATAACCTGAATCTGAGGCAGCACCTGGCACGGCTGGG
 ACGGAAGTCGCTGTCGTTCTCAAAAATCGGTGGAGCTGCATGACAAAGTCATC
 GGGCATTATCTGAACATAAAACACTATCAATAAGTTGGAGTCATTACCCAAT
 TATGATAGAATTTACAAGCTATAAGGTTATTGTCCTGGGTTTCAAGCATTAGT
 CCATGCAAGTTTTTATGCTTTGCCATTCTATAGATATATTGATAAGCGCGCT
 GCCTATGCCTTGCCCCCTGAAATCCTTACATACGGCGATATCTTCTATATAAA
 AGATATATTATCTTATCAGTATTGTCAATATATTCAAGGCAATCTGCCTCCTC
 ATCCTCTTCATCCTCTTCGTC TTGGTAGCTTTTTAAATATGGCGCTTCATAGA
 GTAATTCTGTAAAGGTTCAATTC TCGTTTTCATACCTCGGTATAATCTTACCT
 ATCACCTCAAATGGTTTCGCTGGGTTTATCGCACCCCCGAACACGAGCACGGC
 ACCCGCGACCACTATGCCAAGAATGCCCAAGGTAAAAATTGCCGGCCCCGC
 CATGAAGTCCGTGAATGCCCCGACGGCCGAAGTGAAGGGCAGGCCGCCACC
 CAGGCCGCCGCCCTCACTGCCCCGGCACCTGGTCGCTGAATGTCGATGCCAGC
 ACCTGCGGCACGTCAATGCTTCCGGGCGTCGCGCTCGGGCTGATCGCCCATC
 CCGTTACTGCCCCGATCCCGCAATGGCAAGGACTGCCAGCGCTGCCATTTT
 TGGGGTGAGGCCGTTTCGCGGCCGAGGGGCGCAGCCCC TGGGGGGATGGGAG
 GCCCGCGTTAGCGGGCCGGGAGGGTTTCGAGAAGGGGGGGCACCCCCCTTCG
 GCGTGCGCGGTCACGCGCACAGGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGTTTA
 TAAATATTGGTTTTAAAGCAGGTTAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAA
 ACGGGCGGAAACCCTTGCAAATGCTGGATTTCTGCCTGTGGACAGCCCCCTC
 AAATGTCAATAGGTGCGCCCCCTCATCTGTCAGCACTCTGCCCTCAAGTGTC
 AAGGATCGCGCCCCTCATCTGTCAGTAGTCGCGCCCC TCAAGTGTC AATACC
 GCAGGGCACTTATCCCCAGGCTTGTCACATCATCTGTGGGAAACTCGCGTA
 AAATCAGGCGTTTTTCGCCGATTTGCGAGGCTGGCCAGCTCCACGTCGCCGGC
 CGAAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGCCGCGCCGGGTGAGTCGGCC
 CTCAAGTGTC AACGTCCGCCCTCATCTGTCAGTGAGGGCCAAGTTTTCCGC
 GAGGTATCCACAACGCCGGCGGCCGCGGTGTC TCGCACACGGCTTCGACGGC
 GTTTCTGGCGCGTTTGAGGGCCATAGACGGCCGCCAGCCAGCGGCGAGG
 GCAACCAGCCCGG

Açıklama [N44]: pB1121 sekansı bitimi

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. 2004 yılında K.T.Ü Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı Lisans öğreniminden, 2008 yılında Bölüm Birinciliği ile mezun oldu. 2004-2008 yılları arasında Türk Eğitim Vakfı Yüksek Onur Ödülü almaya hak kazandı. 2009 yılında Rize Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2010 yılında, STSM (Short Term Scientific Mission) kapsamında, 4 ay süreyle İtalya'da araştırmacı olarak çalıştı. 2011 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Fizyolojisi Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başlamış olup, 2012 yılından itibaren Tübitak 2211 kapsamında desteklenmektedir. 2013-2014 yılları arasında Yüksek Öğretim Kurumu üzerinden, Amerika Birleşik Devletleri'nde doktora çalışmaları üzerine araştırmalarda bulundu. 2014-2015 yılları arasında Texas Tech Üniversitesinde yardımcı araştırmacı olarak çalıştı. Halen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi'nde öğretim elemanı olarak görevine devam etmektedir.