



Arabidopsis thaliana Plants Overexpressing the Barley Nicotinamine Synthase1 (HvNAS1) Gene Show Tolerance to Iron Deficiency[#]

Emre Aksoy^{1,a,*}, Amir Maqbool^{1,b}, Buasimuhan Abudureyimu^{1,c}

¹Department of Agricultural Genetic Engineering, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240 Niğde, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented as an oral presentation at the 5th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Tokat, TARGID 2020)</p> <p>Research Article</p> <p>Received : 10/10/2020 Accepted : 15/11/2020</p> <p>Keywords: Arabidopsis thaliana Bbarley Iron deficiency Nicotinamine synthase Tolerance</p>	<p>Iron (Fe) is an important trace mineral for plant development, and plants grown in Fe deficiency experience yield losses due to the leaf chlorosis. In addition to agronomic measures that can be taken to minimize these losses, new plant genotypes can be developed effectively through genetic engineering. While dicots such as <i>Arabidopsis thaliana</i> use a reduction-based strategy to uptake high amounts of iron from the rhizosphere, the chelation strategy has evolved in Gramineous plants including barley (<i>Hordeum vulgare</i>). In this study, barley <i>NICOTIANAMINE SYNTHASE1 (HvNAS1)</i> gene, which is responsible for the production of nicotinamine that can complex with iron, was cloned and expressed at a constitutive high level in <i>Arabidopsis</i> plants. The expression levels of <i>Arabidopsis</i> genes encoding for the proteins involved in iron uptake increased together with <i>HvNAS1</i> in the T₃ <i>Arabidopsis</i> plants. Moreover, the root lengths, root and stem fresh weights, ferric chelate reductase enzyme activities of the plants also increased in the transgenic <i>Arabidopsis</i> plants under Fe deficiency. In addition, significant increases in iron and zinc levels were determined in the roots and shoots of transgenic <i>Arabidopsis</i> plants. As a result, transgenic <i>Arabidopsis</i> plants overexpressing the barley <i>HvNAS1</i> gene can take up more iron from the rhizosphere and carry this iron to the shoots. This study demonstrates the power of genetic engineering to develop <i>Arabidopsis</i> plants overexpressing the <i>HvNAS1</i> gene and therefore tolerate iron deficiency.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(sp1): 70-79, 2020

Arpa Nikotinamin Sentaz1 (HvNAS1) Genini Yüksek Seviyede İfade Eden Arabidopsis thaliana Bitkileri Demir Eksikliğine Dayanıklılık Gösterir

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 10/10/2020 Kabul : 15/11/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Arabidopsis thaliana Arpa Dayanıklılık Demir eksikliği Nikotinamin sentaz</p>	<p>Demir (Fe) bitki gelişimi için önemli bir eser element olup, Fe eksikliğinde yetişen bitkilerde gelişen kloroza bağlı olarak verim kayıpları yaşanır. Bu kayıpların en aza indirilebilmesi için alınabilecek agronomik önlemlere ilaveten genetik mühendisliği aracılığıyla bitkilerin özellikleri etkin bir şekilde geliştirilebilir. Rizosferde yüksek miktarda bulunan demiri köklerine alabilmek için <i>Arabidopsis thaliana</i> gibi dikotlar indirgenme temelli bir stratejiyi kullanırlarken, arpanın (<i>Hordeum vulgare</i>) da yer aldığı graminelerde şelasyon stratejisi evrimleşmiştir. Bu çalışmada, arpada bulunan ve demir ile kompleks oluşturabildiği bilinen nikotinaminin üretiminden sorumlu <i>NİKOTİNAMİN SENTAZ1 (HvNAS1)</i> geni klonlanarak, <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde konstitütif olarak yüksek seviyede ifade edilmiştir. Elde edilen T₃ <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde <i>HvNAS1</i> ile birlikte demir alımından sorumlu yolakta yer alan <i>Arabidopsis</i> genlerinin de ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, bitkilerin kök uzunluklarının, kök ve gövde yaş ağırlıklarının, ferrik şelat redüktaz enzim aktivitelerinin de arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, transgenik <i>Arabidopsis</i> bitkilerinin kök ve gövdelerinde biriken demir ve çinko seviyelerinde önemli artışlar belirlenmiştir. Sonuç olarak, arpa <i>HvNAS1</i> genini yüksek seviyede ifade eden transgenik <i>Arabidopsis</i> bitkilerinin rizosferden daha fazla demir alabildiği ve bu demiri daha fazla gövdeye taşıyabildiği gösterilmiştir. Bu sayede genetik mühendisliği kullanılarak <i>HvNAS1</i> genini yüksek seviyede ifade eden ve demir eksikliğine dayanıklı <i>Arabidopsis</i> bitkileri geliştirilmiştir.</p>

^a emreaksoy@ohu.edu.tr
^c esma151190@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-9410-2715>
^d <https://orcid.org/0000-0002-4441-8981>

^e amirmaqbool767@gmail.com ^f <https://orcid.org/0000-0002-0420-3214>



Giriş

Demir (Fe), bitkiler için temel mikro-besin maddelerinden bir tanesi olup, demir eksikliği en yaygın besinsel yetersizlikler arasında yer alır. Bitkilerde metalloproteinlerin kofaktörü olan demir hem fotosentez, hem de solunumda görev alan demir-sülfür proteinlerinin aktif bölgelerinde bulunur. Demir ayrıca DNA ve hormon biyosentezi, azot bağlanması, sülfat asimilasyonu ve klorofil biyosentezinde görev yapar (Hell ve Stephan, 2003). Demir, toprakta en çok bulunan elementlerden bir tanesi olmasına karşın özellikle aerobik ortamlarda çözünemeyen ferrik (Fe^{3+}) formda bulunmaktadır (Palmer ve Guerinot, 2009). Çözünür demir formu olan Fe^{2+} 'in havalandırılmış topraktaki çözünürlüğü bitkilerin yaşaması için gerekli olan demir yoğunluğundan oldukça düşüktür (Marschner ve Marschner, 2012). Çözünemeyen demir formu Fe^{3+} 'in çözünür demir formu Fe^{2+} 'e indirgenbilmesi için toprağın pH'sının düşük olması gerekir. Özellikle iyi havalandırılmış kireçli toprakların asiditesinin düşük olmasından dolayı, bu tür topraklarda büyüyen bitkilerde demir yetersizliği çok sık gözlenmektedir. Ne yazık ki dünyada kullanılabilen tarım alanlarının 1/3'i ve Türkiye topraklarının %70'i kireçli topraklarla kaplı olduğundan tarımsal öneme sahip bitkiler sürekli demir eksikliğine maruz kalırlar (White ve Brown, 2010). Demir yetersizliği bitkilerde klorofil biyosentezinin azalmasına bağlı olarak yaprak damarları arasında oluşan ve "demir eksikliği klorozu" (DEK) olarak adlandırılan bir kloroza neden olur. DEK'in en önemli etkilerinden birisi bodur büyümedir. Bu da doğrudan bitki verimini olumsuz yönde etkiler.

Toprakta çözünemeyen Fe^{3+} , *Arabidopsis thaliana* gibi çift çenekli bitkilerde redüksiyon (indirgenme) stratejisi ile topraktan kök hücrelerine alınır (Thomine ve Vert, 2011). Literatürde "Strateji 1" olarak isimlendirilmiş olan bu stratejide demir epidermal hücre zarında bulunan ve birbirini takip eden üç aktivite sayesinde kök içerisine taşınır (White, 2012). Üç aktiviteden birincisi, rizosferin hücre zarında bulunan H^+ -ATPase (AHA) tarafından taşınan protonlar aracılığıyla asidifikasyonudur (Li ve ark., 2007). Rizosferin asidifikasyonunu takiben ferrik demir, FERRIC CHELATE REDUCTASE (FRO) isimli oksidoredüktaz aracılığıyla çözülebilen Fe^{2+} 'ye indirgenir (Robinson ve ark., 1999; Connolly ve ark., 2003; Jeong ve Connolly, 2009). Son olarak da Fe^{2+} iyonları ZINC (Zn)-Fe-REGULATED TRANSPORTER (ZIP) ailesinden IRON-REGULATED TRANSPORTER1 (IRT1) isimli bir metal taşıyıcısı aracılığıyla kök hücrelerinin içine taşınır (Eide ve ark., 1996; Vert ve ark., 2002; Connolly ve ark., 2002). FRO enzim aktivitesi ve gen anlatım seviyesi demir eksikliği altındaki bitki köklerinde artış gösterirken (Blair ve ark., 2010), bezelyede yapılan çalışmalarda FRO'nun demir alınımındaki ana basamak olduğu bulunmuştur (Grusak ve ark., 1990). *Arabidopsis thaliana*'da ferrik redüktaz enzimini kodlayan bir genin (*AtFRO2*) soyada konstitütif olarak ifade edilmesi yüksek FRO enzim aktivitesine bağlı DEK toleransına neden olur (Vasconcelos ve ark., 2006).

Çift çeneklilerdeki indirgenme stratejisine alternatif olarak, buğday (*Triticum aestivum*), arpa (*Hordeum vulgare*) ve çeltik (*Oryza sativa*) gibi tek çeneklilerde is selasyon stratejisi evrimleşmiş olup, bu demir alım yöntemi

"Strateji 2" olarak bilinmektedir. Bu bitkilerin köklerinden rizosfere salınan fitosidereförler (PSs) toprakta çözünemeyen Fe^{3+} 'e bağlanarak bir kompleks oluştururlar. Fe^{3+} -PS kompleksi ilk olarak mısırdaki keşfedilen YELLOW STRIPE (YS) taşıyıcısı ailesinden ZmYS1 yardımıyla kök hücrelerinin içine alınır. (Takagi, 1976; Takagi ve ark., 1984; Curie ve ark., 2001; Kim ve Guerinot, 2007; Curie ve ark., 2009; Kobayashi ve Nishizawa, 2012). Mugineik asitler (MAs) gibi fitosidereförler dört sıralı enzimatik reaksiyonlarda L-metiyoninden sentezlenir (Mori ve Nishizawa, 1987; Shojima ve ark., 1990; Ma ve ark., 1999; Bashir ve ark., 2006; Ueno ve ark., 2007). L- metiyonin sülfür asimilasyon yolunun son ürünü olarak üretilir (Ravanel ve ark., 1995; Amir ve ark., 2002; Anjum ve ark., 2008). L-metiyonin SAM sentetaz tarafından S-adenozil-L-metionin (SAM)'e dönüştürülür. SAM'in 3 molekülü öncelikle NICOTIANAMINE SYNTHASE (NAS) olarak isimlendirilen enzim tarafından nikotinamine dönüştürülür, ondan sonra NICOTIANAMINE AMINOTRANSFERASE (NAAT) tarafından 3'-keto aside ve ardından DEOXYMUGINEIC ACID SYNTHASE (DMAS) tarafından 2'-deoksimugineik aside (DMA) dönüştürülür (Higuchi ve ark., 1999; Takahashi ve ark., 1999; Bashir ve ark., 2006). DMA bugüne kadar karakterize edilmiş dokuz MA tipinin öncüsü olarak kullanılır. Arpa ve çavdarda IRON DEFICIENCY-SPECIFIC CLONE2 (IDS2) ve IDS3 olarak isimlendirilen iki farklı deoksigenaz mugineik asitleri meydana getirmek için DMA'ya başka hidroksil grupları ekler (Nakanishi ve ark., 2000; Kobayashi ve ark., 2001). Demir eksikliği altında NAS (Higuchi ve ark., 2001; Inoue ve ark., 2003; Mizuno ve ark., 2003), NAAT (Cheng ve ark., 2007), IDS2 ve IDS3 (Nakanishi ve ark., 2000; Kobayashi ve ark., 2001) genlerinin ifade seviyeleri ile PS üretimi artar. PS biyosentez yolağında bulunan arpa genlerinden *HvSAMS* (Takizawa ve ark., 1996), *HvNAS1-7* (Higuchi ve ark., 1999), *HvNAAT-A*, *HvNAAT-B* (Takahashi ve ark., 1999), *HvDMAS1* (Bashir ve ark., 2006), *HvIDS2* (Okumura ve ark., 1994), ve *HvIDS3* (Nakanishi ve ark., 1993) daha önce izole edilmişlerdir. Arpa NAAT genini içeren transgenik çeltik bitkileri DMA üretimini artırarak demir eksikliğine dayanıklılık göstermiştir (Takahashi ve ark., 2001). Arpa IDS3 genini içeren transgenik çeltik bitkileri daha fazla DMA ve MA salgılayarak demir eksikliğine dayanıklılık göstermiştir (Kobayashi ve ark., 2001). Arpa NAS1 genini içeren transgenik çeltik bitkileri demir eksikliği altında köklerinde daha fazla NAS aktivitesi göstermişlerdir (Higuchi ve ark., 2001). Arpa NAS1 ve NAAT genlerinin transgenik çeltikte birlikte ifade edilmesi sonucunda pirinç danelerinde daha fazla demir birikimi gözlenmiştir (Suzuki ve ark., 2008).

Demir, toprakta en çok bulunan elementlerden bir tanesi olmasına karşın kireçli topraklarda çözünemediğinden dolayı bitkiler tarafından rahatlıkla alınamamaktadır. Bu yüzden de bu tür topraklarda yetişen bitkilerde demir yetersizliği ve buna bağlı olarak verim kaybı çok sık gözlenmektedir. Demirin topraktan bitki köklerine alımında tek ve çift çenekli bitkiler birbirinden farklı mekanizmaları kullanırlar. Tek çenekli arpa köklerinden toprağa salgıladığı fitosidereförler sayesinde çözünemeyen demiri şelatlayarak özel taşıyıcılar sayesinde köklerine alabilmektedir. Ancak, benzer bir demir alım stratejisi çift çenekli olan model bitki

Arabidopsis thaliana'da bulunmamaktadır. Bunun yerine *Arabidopsis* köklerinde demirin indirgenmesini baz alan bir demir alım mekanizması kullanılmaktadır. Arpa, Gramineler içerisinde demir eksikliğine dayanıklılığı bilinen en yüksek bitkidir. Dolayısıyla, arpanın topraktan köklerine demir alımında kullandığı bilinen mekanizmaların (genlerin) *Arabidopsis* gibi çift çenekli bir bitkiye aktararak, bu mekanizmaların doğal olarak evrimleşmediği bir bitki türünde çalışması durumunda bitkinin demir eksikliğine dayanıklılığının nasıl etkileneceği incelenmesi gereken bir konudur.

Bu nedenle, bu çalışmada *NİKOTİNAMİN SENTAZİ* (*HvNASI*) geni arkadan izole edilerek *Arabidopsis thaliana*'da yüksek seviyede ifade edilmiş ve elde edilen T3 homozigot transgenik hatların demir eksikliğine karşı göstermiş oldukları tepkiler incelenmiştir. Elde edilen bitkilerde *HvNASI* ile birlikte demir alımından sorumlu yolakta yer alan *Arabidopsis* genlerinin de ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, bitkilerin kök uzunluklarının, kök ve gövde yaş ağırlıklarının, ferrik şelat redüktaz enzim aktivitelerinin de arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin kök ve gövdelerinde biriken demir ve çinko seviyelerinde önemli artışlar belirlenmiştir. Sonuç olarak, arpa *HvNASI* genini yüksek seviyede ifade eden transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin rizosferden daha fazla demir alabildiği ve bu demiri gövdeye daha etkin taşıyabildiği gösterilmiştir.

Materyal ve Metot

Tohum Yüzey Sterilizasyonu, Çimlenme ve Hidroponik Kültür

Çalışmada kullanılan Tarm-92 arpa (*Hordeum vulgare*) çeşidinin tohumları Bahri Dağdaş Uluslar Arası Tarımsal Araştırma Enstitüsünden elde edilmiştir. Arpa tohumlarının yüzey sterilizasyonu %3 sodyum hipoklorit ve %0,05 tween-20 içeren solüsyonda 20 dk. karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. 5 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra tohumlar steril filtre kâğıtları içeren plastik petri kaplarına yerleştirilerek, 5 mL yarı-mukavemetli (1/2) Hoagland besin solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) ile nemlendirilmiş ve petri kapları, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de, %70 nispi nem ile karanlıkta, büyüme odasında çimlenme için 2 gün süreyle bekletilmiştir. Çimlenen tohumlar, arpa için yeterli olan $50 \mu\text{M}$ Na-Fe(III)-EDTA ile takviye edilmiş 1/2 Hoagland besin solüsyonu ile dolu plastik pipet uçlu kaplara yerleştirilmiştir. Bitkiler büyüme odasında 7 gün boyunca $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de, %70 bağıl nem ve 16 saat ışık ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ve 8 saat karanlık döngüde yetiştirilmiştir. Kapların şeffaf kapakları fideleri kurutmaktan korumak için 2 gün kapalı tutulmuştur. Besin solüsyonu her 24 saatte bir düzenli olarak yenilenmiştir. Stres uygulaması ekimden sonraki 9 günün sonunda (2 + 7) gerçekleştirilmiştir. Demir yetersizliği için 1/2 Hoagland besin solüsyonunun içerisine Na-Fe(III)-EDTA eklenmemiş, yerine $300 \mu\text{M}$ FerroZine (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate) eklenmiştir. Stres uygulamasını takiben beşinci günde arpa fidelerinin kök dokuları, RNA'yı izole etmek için bitki materyali olarak toplanmış ve sıvı azot yardımıyla dondurularak -80°C 'de saklanmıştır.

Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

100-150 mg arpa kökü dokularından RNA izolasyonu, TRIzol reaktifi (Thermo Scientific) kullanılarak tek aşamalı bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. RNA numunelerindeki genomik DNA kirlenmesi, üreticinin talimatlarına göre RapidOut DNA Temizleme Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak giderilmiştir. Elde edilen toplam RNA konsantrasyonu mikrospektrofotometre ile belirlenmiş; referans olarak büyük rRNA türlerini temel alınarak örneklerin kalitesi ve sağlamlığı %1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir (veriler gösterilmemiştir). RNA örneklerinden cDNA sentezi, üreticinin talimatlarına göre RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0,5 mikrogram toplam RNA ve rasgele heksamer ve oligo (dT) 18 primerlerinden (1:5 molar oran) oluşan $1,2 \mu\text{L}$ primer karışımı, toplam $12 \mu\text{L}$ hacimde nükleaz içermeyen su kullanılarak karıştırılmış ve 65°C 'de 5 dk. inkübe edilmiştir. Karışım buz üzerinde soğutulduktan sonra $4 \mu\text{L}$ 5X reaksiyon tamponu, $1 \mu\text{L}$ RiboLock™ Ribonükleaz İnhibitörü (20 U / μL), $2 \mu\text{L}$ dNTP karışımı (10 mM) ve $1 \mu\text{L}$ M-MuLV RT (200 U / μL) ilave edilmiş ve $20 \mu\text{L}$ 'lik bir karışım elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı bir termal PCR içinde 25°C 'de 5 dk., ardından 42°C 'de 60 dk. inkübe edildikten sonra reaksiyon 70°C 'de 5 dk. inkübe edilerek sona erdirilmiştir.

PCR Yoluyla HvNASI Geninin Çoğaltılması ve Klonlanması

HvNASI geni Gateway klonlama sistemi (Thermo Scientific) kullanılarak elde edilen cDNA havuzundan klonlanmıştır. Bu çoğaltma işlemi *HvNASI*'e özgü ileri (5' - GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTA TGGATGCCAGAACAAGGAG - 3') ve ters (5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCA AAAGGCCAGCTCTTTGG - 3') primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çoğaltım işleminde kullanılmak üzere $50 \mu\text{L}$ son hacmine sahip PCR karışımında takip eden bileşenler yer almıştır: $5 \mu\text{L}$ cDNA havuzu ($180 \text{ ng} / \mu\text{L}$), $5 \mu\text{L}$ Taq tamponu (10X) (25°C 'de pH 8,8 olan 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), $2 \mu\text{L}$ dNTP (her birinden 10 mM), $4 \mu\text{L}$ MgCl_2 (25 mM), $1 \mu\text{L}$ Taq DNA polimeraz ($5 \text{ U} / \mu\text{L}$), 2'şer μL ileri ve ters primerler ($10 \mu\text{M}$) ve $50 \mu\text{L}$ 'ye kadar steril saf su. PCR döngü koşulları, başlangıç denatürasyon adımı olarak 3 dk. için 95°C , 95°C 'de 1 dk., 1 dk. boyunca 63°C 'de bağlanma ve 72°C 'de 1 dk. boyunca uzatma olmak üzere 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünü %2'lik agaroz jel üzerine yüklenerek çoğaltımın gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir.

Çoğaltılan PCR ürünü üreticinin protokolüne uygun olarak Qquick gel izolasyon kiti (Qiagen) yardımı ile jelden saflaştırılmış ve sonra BP reaksiyonu için kullanılmıştır. *pDONR221* içine aktarılan reaksiyon ürünü *E.coli DH5a* kompetan hücrelerinde çoğaltılmış, gerekli koloni PCR ve restriksiyon enzim kesimleri ile doğrulandıktan sonra plasmit izole edilmiştir. Genin elde edilen giriş klonundan hedef *pMDC43* vektörüne aktarılmasında LR klonase kullanılmıştır (Thermo Scientific). $1 \mu\text{L}$ LR reaksiyonu $50 \mu\text{L}$ *E.coli DH5a* kompetan hücrelere aktarılmış ve gerekli koloni PCR ve restriksiyon enzim kesimleri ile doğrulandıktan sonra plasmit izole edilmiştir. Elde edilen plazmit dizileme ile

doğrulanmıştır. Bu sayede, *pCaM35S::GFP::HvNAS1* içeren *pMDC43* plazmidini elde edilmiştir.

***HvNAS1*'in *Arabidopsis thaliana*'ya Transformasyonu ve Transgenik Bitkilerin Seçimi**

Elde edilen *pMDC43* plazmidini elektroporasyon yöntemiyle *Agrobacterium tumefaciens* *GV3101* suşuna aktarılmış ve gerekli koloni PCR ve restriksiyon enzim kesimleri ile doğrulanmıştır. Hedef vektörler ile transforme edilen *Agrobacterium* hücreleri 28 saat boyunca 250 rpm'de 5 mL LB'de (Kanamisin 100 µg / ml, Karbenisilin 200 µg / ml) büyütülmüştür. 5 mL kültür, 1L'lik şişe içerisinde 200 mL'lik LB'ye ilave edilmiş ve kültür, OD600 ölçümü 0,6'ya ulaşmaya kadar 28°C'de, 250 rpm'de çalkalanmıştır. 15 dakikalık sentrifüjün ardından hücreler 50 mL'lik falkonlarda toplanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler, 300 mL'lik %5 sükröz ve %0,1 Silwet içeren çözelti yardımıyla yeniden süspanse edilmiştir. Uygun büyütme kabini koşullarında büyütülen 6 haftalık *Arabidopsis Col-0* ekotip çiçekleri süspanse edilmiş hücreler ile 45 saniye süreyle ıslatılmıştır. Bitkiler 10 dakika süreyle yan yatırılmış ve üzerleri plastik kubbe ile kapalı bir şekilde plastik kutuya yerleştirilmiştir. Bitkiler 23°C'de uzun gün fotoperiyodu (16 saat ışık, 8 saat karanlık) altında, %70 nisbi nemde yetiştirilerek tohumları toplanmıştır. Toplanan *Arabidopsis* tohumlarının yüzey sterilizasyonu için 1 dk. %70 etanol ile muamele edilip, steril saf su ile 5 kez durulanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış en az 200-300 tohum, 75 µg / mL higromisin içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamına yerleştirilmiştir (Murashige ve Skoog, 1962). Petri önce 2 gün boyunca 4°C'de bekletilerek stratifikasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra petri uzun gün koşullarındaki doku kültür odasına nakledilerek büyümeye bırakılmıştır. 3-4 gün bu koşullarda bekletilen petrielerde uzayan ve çenekleri gelişen bitkiler steril kabin koşullarında içerisinde antibiyotik bulunmayan MS besiyerine (kurtarma besiyeri) aktarılmıştır. Bu koşullarda bir hafta kadar yetiştirilen fideler daha sonra toprağa aktarılmış ve uygun koşullardaki büyütme kabininde transgenik bitkilerden tohumlar elde edilmiştir. Toplanan tohumlar (T_2) yüzey sterilizasyonunu takiben tekrar 75 µg / mL higromisin içeren MS ortamına yerleştirilmiş, seçim yapılarak 1:3 oranındaki dağılıma bakılmış ve bu sayede homozigot olanlar belirlenmiştir. Daha sonra homozigot olduğu bulunan T_2 bitkileri toprağa aktararak T_3 tohumları elde edilmiştir.

Transgenik Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Demir Eksikliği Uygulanması

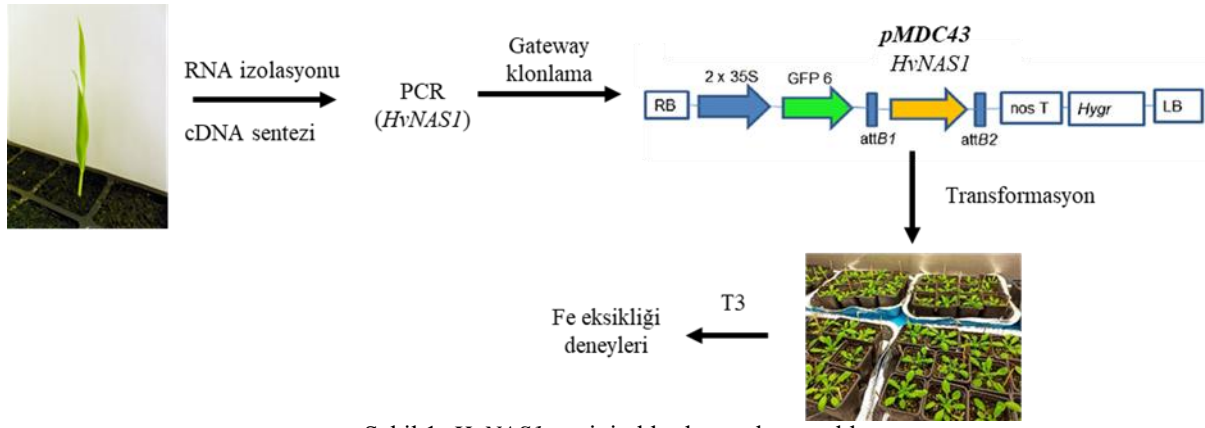
Bütün deneylerde steril besiyeri ortamında petrieler içerisinde büyütülen bitkiler kullanılmıştır. Bitkilerin büyütülmesinde çeyrek Murashige ve Skoog (1/4 X MS) besiyeri kullanılmış olup, besiyerine takviye olarak %0,5 (w/v) sakaroz ve %1,5 (w/v) agar ilave edilmiştir (Bu besiyeri bazal besiyeridir). 4°C'de 2 gün stratifiye edildikten sonra petrieler uzun gün fotoperiyodunda (16 saat ışık/8 saat karanlık) 23°C'de kontrollü bir bitki büyütme kabininde 4 gün büyütülmüştür. Fe-yetersiz besiyeri (FZN besiyeri) Aksoy ve ark., (2013)'a uygun olarak hazırlanmıştır. Demir eksikliği uygulanması için bir grup bitki FZN besiyerine transfer edilirken, diğer kısmı bazal besiyerinde büyütülmeye devam edilmiştir. FZN besiyeri, Na-Fe(III)-EDTA içermeyecek (1/4 MS + 0µM Fe(III) Na-EDTA), onun yerine FerroZine (300µM, [3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine sulfonate]) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu şartlarda, transferden sonra bitkilere 6 gün stres uygulanmıştır.

Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Fe-yetersizliği altında demir alımında görevli proteinleri kodlayan genlerin ifade seviyelerinin araştırılması için Fe eksikliği uygulamasının ardından transgenik T_3 ve transforme edilmemiş *Col-0* bitkilerinin kök dokularından toplam RNA izole edilmiştir. Farklı transformasyon olgularının benzer sonuçları verip vermediğini anlayabilmek ve elde edilen olan etkilerin aktarılan genden kaynaklandığını ispatlayabilmek için bütün çalışmalarda 2 transgenik T_3 hattı kullanılmıştır. Gen ifade analizleri için toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yukarıda anlatıldığı gibi bitkilerin köklerinden gerçekleştirilmiştir. Çizelge 1'de verilen genlerin ifade analizleri için kullanılacak olan primerlerin dizaynı 100-150 bp uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltacak şekilde Primer3 programı (Untergasser ve ark., 2012) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 500 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş cDNA örneğinin 1 µl'si 0,8 µM özgün primerler kullanılarak toplam 20 µl hacim içerisinde SYBR Green PCR kiti (Roche) ile gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) makinesinde çoğaltılmıştır. Gen anlatımlarının analizinde Muller ve ark., (2002) ve Pfaffl (2001) tarafından geliştirilen yaklaşım kullanılmıştır. İfade analizleri 3 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrar olarak değerlendirilmiştir. Gen anlatımlarındaki değişimlerin doğrulanması sırasında RT-qPCR çalışmalarında referans gen olarak *UBQ10* (AT4G05320) kullanılmıştır (Czechowski ve ark., 2005).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan primerler
Table 1. Primers used in the study

AGI kodu	Gen ismi	İleri primer	Ters primer
AT4G19690	IRON-REGULATED TRANSPORTER1 (IRT1)	ACCCGTGCGTCAACAA AGCTAAAG	TCCCGGAGGCGAAACA CTTAATGA
AT1G01580	FERRIC REDUCTION OXIDASE2 (FRO2)	TGTGGCTCTTCTTCTCT GGTGCTT	TGCCACAAAGATTTCGTC ATGTGCG
AT2G28160	FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT)	ACCTCTTCGACGAATTG CCTGACT	TTCATCTTCTTCACCAC CGGCTCT
At4g05320	UBIQUITIN10 (UBQ10)	CGTTAAGACGTTGACTG GGAAACT	GCTTTCACGTTATCAAT GGTGTC



Şekil 1. *HvNAS1* geninin klonlanma basamakları.

Demir eksikliğinde yetiştirilen Tarm-92 arpa bitkilerinin köklerinden izole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezlenmiş ve bu cDNA havuzu kullanılarak *HvNAS1* geni çoğaltılmıştır. Gateway klonlama yöntemiyle *HvNAS1* geni *pMDC43* hedef vektörüne aktarılmıştır. *pMDC43* vektörü Arabidopsis Col-0 bitkilerine aktarıldıktan sonra bitkiler uygun antibiyotik ile seçilmiştir. Elde edilen T₃ bitkileri Fe eksikliği deneylerinde kullanılmıştır.

Figure 1. Cloning steps of the *HvNAS1* gene.

cDNA was synthesized from the total RNA isolated from the roots of Tarm-92 barley plants grown in iron deficiency and the *HvNAS1* gene was amplified using this cDNA pool. The *HvNAS1* gene was integrated into the target vector *pMDC43* by the Gateway cloning method. After the *pMDC43* vector was transformed to Arabidopsis Col-0 plants, the plants were selected with the appropriate antibiotics. The T₃ plants were used in Fe deficiency experiments.

Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler

FZN ortamına aktarılan bitkiler 6 gün strese uğradıktan sonra fotoğraflanmış ve Aksoy ve ark. (2013)'da anlatıldığı gibi kök uzunlukları ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Her birinde 10 bitki olacak şekilde, deney 3 petri şeklinde kurgulanmıştır. 6 günlük stres uygulamasının sonucunda bitkilerin kök ve gövdeleri ayrılıp, Aksoy ve ark. (2013)'da anlatıldığı gibi yaş ağırlıkları tartılmıştır. Daha sonra bitkiler 65°C fırında 24 saat kurutularak, kuru ağırlıkları tartılmıştır.

Toplam klorofil tayini için tartılan yapraklar önce %80 (v/v) aseton içerisinde parçalanmış ve plastik tüplere aktarılan bu çözelti 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Sonra bu çözelti 4°C'de 13.000 g hızında 5 dk. sentrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Vakit kaybetmeden süpernatantın 470, 646,8 ve 663,2 nm'deki absorbans okumaları %80 asetona göre belirlenmiştir. Toplam klorofil miktarı (chl_a + chl_b) (7,15 A_{663.2} + 18,71 A_{646.8})/1000/taze yaprak ağırlığı formülüne göre hesaplanmıştır.

Aksoy ve ark. (2013)'daki yöntem takip edilerek köklerden ferrik şelat redüktaz (FCR) enzim aktivitesi analiz edilmiştir. Bunun için bitki kökleri tartıldıktan sonra FCR aktivite solüsyonunun (0,1 mM Fe(III)-EDTA ve 0,3 mM ferrozine) içerisinde karanlıkta 45 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra solüsyonun absorbansı 562 nm'de içerisinde bitki koyulmamış solüsyona karşı okunmuştur.

Köklerde Biriken Fe ve Zn Miktarlarının Tayini

6 gün süresince FZN ortamında demir eksikliğine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdeleri ayrılarak, yaş ağırlıkları tartılmış ve Aksoy ve ark., (2013)'de belirtilen yöntem takip edilerek kök ve gövdelerinde biriken demir ve çinko miktarı ICP-MS yardımıyla belirlenmiştir. Elde edilen veriler kuru ağırlıktaki milyonda bir birim olacak metal seviyesine çevrilerek hesaplanmıştır (µg/g kuru ağırlık).

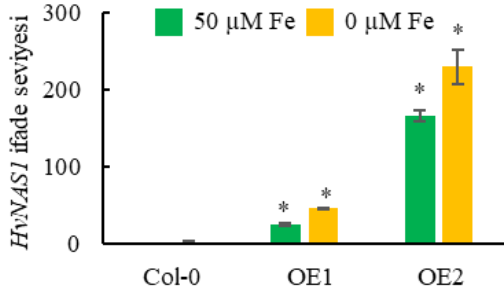
İstatistiksel Analizler

Çalışmada iki farklı transgenik T₃ bitkisi kullanılmış, gen ifade analizleri, mineral seviye tayini, FCR aktivitesi ve klorofil ölçümlerinde 3 biyolojik tekrar; diğer analizlerde ise 30 biyolojik tekrar kullanılmıştır. Elde edilen bütün veriler transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla grafik haline getirilerek Minitab 19 paket programında *t*-testi kullanılarak %5 önem seviyesinde analiz edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

HvNAS1'i Yüksek Seviyede İfade Eden Transgenik Arabidopsis thaliana Bitkilerinin Elde Edilmesi

Arpa, Gramineler içerisinde demir eksikliğine dayanıklılığı bilinen en yüksek bitkidir. Dolayısıyla, arpanın topraktan köklerine demir alımında kullandığı bilinen mekanizmaların (genlerin) *Arabidopsis* gibi çift çenekli bir bitkiye aktararak, bu mekanizmaların doğal olarak evrimleşmediği bir bitki türünde çalışması durumunda bitkinin demir eksikliğine dayanıklılığının nasıl etkileneceği incelenmesi gereken bir konudur. Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında arpa köklerinde fitosiderofor üretiminden sorumlu *NİKOTİNAMİN SENTAZİ* (*HvNAS1*) geni izole edilerek, klonlanmış ve *CaM35S* promotörü altında Arabidopsis'te yüksek seviyede ifade edilmiştir (Şekil 1). Transformasyon sonucunda *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden iki homozigot T₃ hattı (OE1 ve OE2) belirlenerek, bu hatların demir eksikliğine vermiş oldukları tepkiler incelenmiştir. Şekil 2'de gösterildiği üzere, *HvNAS1* genin ifade seviyeleri elde edilen transgenik hatlardan OE1 ve OE2'nin köklerinde normal Fe altında (50 µM Na-Fe(III)-EDTA) sırası ile 26 ve 166 olarak belirlenmişken, bu oranlar demir eksikliği uygulanan bitkilerde sırası ile 46 ve 230'a çıkmıştır. Bu sonuçlar, elde edilen transgenik Arabidopsis bitkilerinin *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade ettiklerini ve beklendiği gibi bu genin ifade seviyesinin demir eksikliği altından arttığını göstermektedir. *NAS* genlerinin demir eksikliği altında ifade seviyelerinin arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiş olup (Higuchi ve ark., 2001; Inoue ve ark., 2003; Mizuno ve ark., 2003), bu sonuçlar bizim çalışmamızda da doğrulanmıştır.

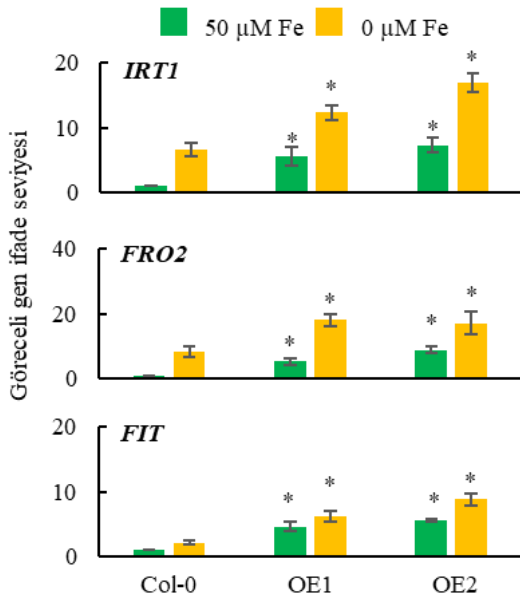


Şekil 2. *HvNAS1* geninin T₃ Arabidopsis köklerindeki ifade seviyesi.

İki adet (OE1 ve OE2) homozigot T₃ Arabidopsis bitkisi %0,5 sakaroz ve %1,5 agar ilave edilmiş ¼ x MS besiyerinde 4 gün yetiştirildikten sonra Fe-yetersiz ortama aktarılıp 6 gün stres uygulanmıştır. Gen ifade analizleri bitkilerin köklerinden yapılmıştır. Kontrol grubu: 50 μM Na-Fe(III)-EDTA; stres grubu: 0 μM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Aynı koşullarda yetiştirilen transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla istatistik farkı gösterir (P<0,05) (n = 3).

Figure 2. Expression level of the *HvNAS1* gene in T₃ Arabidopsis roots.

Two homozygous T₃ Arabidopsis plants (OE1 and OE2) were grown for 4 days in ¼ x MS medium supplemented with 0.5% sucrose and 1.5% agar, then transferred to Fe-deficient medium and grown for an additional 6 days. Gene expression levels were determined from the roots of the plants. Control group: 50 μM Na-Fe (III) -EDTA; stress group: 0 μM Na-Fe (III) -EDTA + FerroZine. * Shows statistical difference compared to non-transgenic Col-0 plant grown under the same conditions (P<0.05) (n = 3).



Şekil 3. *IRT1*, *FRO2* ve *FIT* genlerinin T₃ Arabidopsis köklerindeki ifade seviyeleri.

İki adet (OE1 ve OE2) homozigot T₃ Arabidopsis bitkisi %0,5 sakaroz ve %1,5 agar ilave edilmiş ¼ x MS besiyerinde 4 gün yetiştirildikten sonra Fe-yetersiz ortama aktarılıp 6 gün stres uygulanmıştır. Gen ifade analizleri bitkilerin köklerinden yapılmıştır. Kontrol grubu: 50 μM Na-Fe(III)-EDTA; stres grubu: 0 μM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Aynı koşullarda yetiştirilen transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla istatistik farkı gösterir (P<0,05) (n = 3).

Figure 3. Expression levels of the *IRT1*, *FRO2* and *FIT* gene in T₃ Arabidopsis roots.

Two homozygous T₃ Arabidopsis plants (OE1 and OE2) were grown for 4 days in ¼ x MS medium supplemented with 0.5% sucrose and 1.5% agar, then transferred to Fe-deficient medium and grown for an additional 6 days. Gene expression levels were determined from the roots of the plants. Control group: 50 μM Na-Fe (III) -EDTA; stress group: 0 μM Na-Fe (III) -EDTA + FerroZine. * Shows statistical difference compared to non-transgenic Col-0 plant grown under the same conditions (P<0.05) (n = 3).

Arabidopsis'in Doğal Demir Alım Mekanizmasında Sorumlu Genler *HvNAS1*'i Yüksek Seviyede İfade Eden Arabidopsis Bitkilerinde İndüklenir

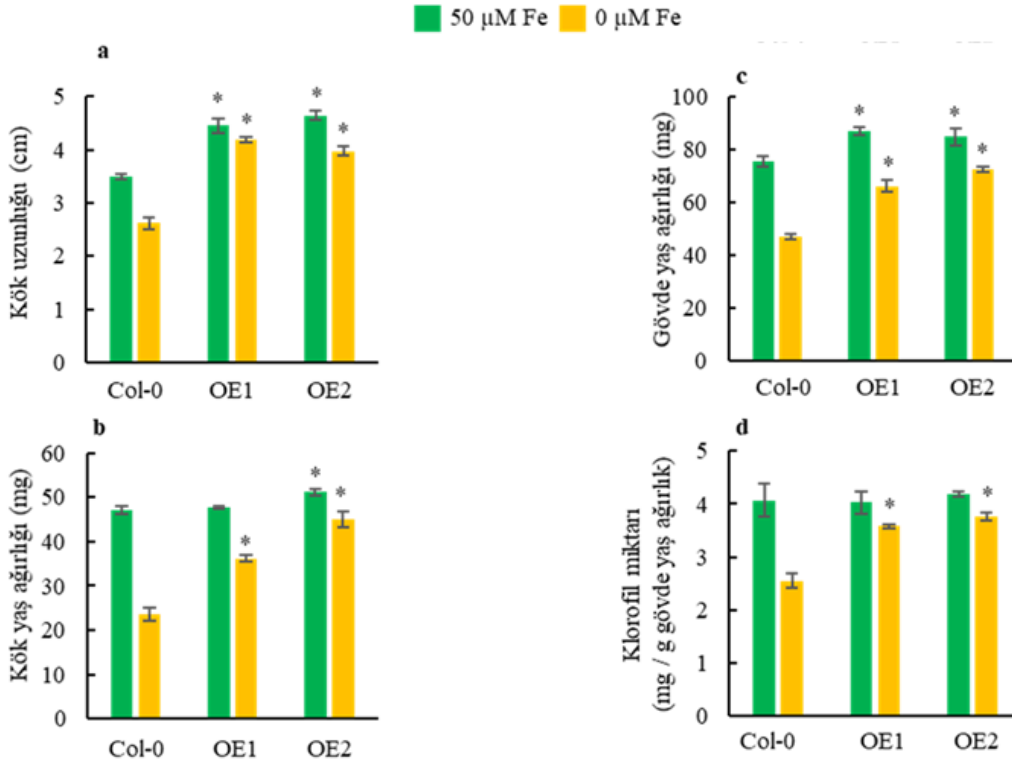
Elde edilen transgenik Arabidopsis bitkilerine 6 gün demir eksikliği uygulanması sonucunda Arabidopsis'in doğal demir alım mekanizmasında görev alan genlerin ifade seviyelerinin nasıl etkilendiğinin belirlenebilmesi için OE1, OE2 ve Col-0 bitkilerinin köklerindeki *IRT1*, *FRO2* ve *FIT* genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Buna göre, *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden bitkilerin köklerinde bahsi geçen genlerin ifade seviyeleri normal koşullarda transgenik olmayan Col-0 bitkilere kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olurken, bu genlerin ifade seviyelerinin özellikle Fe eksikliği altında daha da yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 3). Buradan da anlaşılacağı üzere, fitosiderfor üretiminden sorumlu *HvNAS1* geninin çift çenekli bir bitkide yüksek seviyede ifade edilmesiyle Arabidopsis'in doğal demir alım mekanizmasında sorumlu genlerin indüklenmektedir.

HvNAS1'i Yüksek Seviyede İfade Eden Arabidopsis Bitkileri Demir Eksikliğine Dayanıklardır

HvNAS1'in Arabidopsis'te yüksek seviyede ifade edilmesi sonucunda Arabidopsis'in doğal demir alım mekanizmasında sorumlu genlerin indüklenmesinden dolayı bu transgenik bitkilerin demir eksikliğine dayanıklı olmaları da beklenir. Bu nedenle, *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkilerinin demir eksikliğine dayanıklılıklarının belirlenebilmesi için 6 gün demir eksikliğine maruz bırakılan OE1, OE2 ve Col-0 bitkilerinin kök uzunluğu, kök ve gövde yaş ağırlıkları ile klorofil miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4). Buna göre, demir eksikliği altında transgenik Arabidopsis bitkilerinin kök ve gövdelerinin demir eksikliğinden Col-0 bitkilerine kıyasla daha az etkilendikleri belirlenmiştir. Demir eksikliği uygulanan Col-0 bitkilerinin kökleri normal koşullardaki bitki köklerine kıyasla %25 kısa kalırken, OE1 bitkilerinin kökleri sadece %6, OE2 bitkilerinin kökleri ise %15 oranında kısa kalmıştır (Şekil 4a). Benzer sonuçlar kök ve gövde yaş ağırlıkları için de elde edilmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak, demir eksikliği uygulanan Col-0 bitkilerinin klorofil miktarları normal koşullardaki bitkilere kıyasla %38 azalırken, OE1 bitkilerinde bu oran sadece %11, OE2 bitkilerinde ise %10 olarak dikkati çekmektedir (Şekil 4d).

Benzer sonuçlar arpa *NAAT* genini içeren transgenik çeltik bitkilerinde de gözlenmiştir (Takahashi ve ark., 2001). Bu bitkiler DMA üretimini artırarak demir eksikliğine dayanıklılık göstermiştir. Ayrıca, arpa *IDS3* genini içeren transgenik çeltik bitkileri daha fazla DMA ve MA salgılayarak demir eksikliğine dayanıklılık göstermiştir (Kobayashi ve ark., 2001). Arpa *NAS1* genini içeren transgenik çeltik bitkileri demir eksikliği altında köklerinde daha fazla NAS aktivitesi göstermişlerdir (Higuchi ve ark., 2001). Başka bir çalışmada ise arpa *NAS1* ve *NAAT* genlerinin transgenik çeltikte birlikte ifade edilmesi sonucunda bitkilerin klorofil miktarlarının demir eksikliğinden daha az etkilendikleri gösterilmiştir (Suzuki ve ark., 2008).

Ferrik şelat redüktaz (FCR) dikotların demir alımını kontrol eden ana belirleyici olduğundan demir eksikliğine dayanıklı olan bitkilerin köklerinde FCR aktivitesinin hassas bitkilere kıyasla daha yüksek olması beklenir (Satbhai ve ark., 2017).

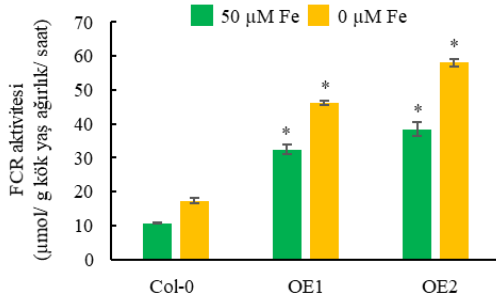


Şekil 4. *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkileri Fe eksikliğinden daha az etkilenirler.

İki adet (OE1 ve OE2) homozigot T_3 Arabidopsis bitkisi %0,5 sakaroz ve %1,5 agar ilave edilmiş $\frac{1}{4}$ x MS besiyerinde 4 gün yetiştirildikten sonra Fe-yetersiz ortama aktarılıp 6 gün stres uygulanmıştır. a. Kök uzunluğu (cm). b. Kök yaş ağırlığı (mg). c. Gövde yaş ağırlığı (mg). d. Toplam klorofil miktarı (mg / g gövde yaş ağırlık). Kontrol grubu: 50 µM Na-Fe(III)-EDTA; stres grubu: 0 µM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Aynı koşullarda yetiştirilen transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla istatistik farkı gösterir (P<0,05). (a, b ve c için n = 30; d için n = 3)

Figure 4. Arabidopsis plant overexpressing *HvNAS1* are affected less from the Fe deficiency.

Two homozygous T_3 Arabidopsis plants (OE1 and OE2) were grown for 4 days in $\frac{1}{4}$ x MS medium supplemented with 0.5% sucrose and 1.5% agar, then transferred to Fe-deficient medium and grown for an additional 6 days. a. Root length (cm). b. Root fresh weight (mg). c. Shoot fresh weight (mg). d. Total chlorophyll content (mg / g shoot FW). Control group: 50 µM Na-Fe (III) -EDTA; stress group: 0 µM Na-Fe (III) -EDTA + FerroZine. * Shows statistical difference compared to non-transgenic Col-0 plant grown under the same conditions (P < 0.05) (n = 30 for a, b and c; n = 3 for d)



Şekil 5. *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkileri Fe eksikliğinden daha az etkilenirler.

İki adet (OE1 ve OE2) homozigot T_3 Arabidopsis bitkisi %0,5 sakaroz ve %1,5 agar ilave edilmiş $\frac{1}{4}$ x MS besiyerinde 4 gün yetiştirildikten sonra Fe-yetersiz ortama aktarılıp 6 gün stres uygulanmıştır. a. Kök uzunluğu (cm). b. Kök yaş ağırlığı (mg). c. Gövde yaş ağırlığı (mg). d. Toplam klorofil miktarı (mg / g gövde yaş ağırlık). Kontrol grubu: 50 µM Na-Fe(III)-EDTA; stres grubu: 0 µM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Aynı koşullarda yetiştirilen transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla istatistik farkı gösterir (P<0,05). (a, b ve c için n=30; d için n = 3).

Figure 5. Arabidopsis plant overexpressing *HvNAS1* are affected less from the Fe deficiency.

Two homozygous T_3 Arabidopsis plants (OE1 and OE2) were grown for 4 days in $\frac{1}{4}$ x MS medium supplemented with 0.5% sucrose and 1.5% agar, then transferred to Fe-deficient medium and grown for an additional 6 days. a. Root length (cm). b. Root fresh weight (mg). c. Shoot fresh weight (mg). d. Total chlorophyll content (mg / g shoot FW). Control group: 50 µM Na-Fe (III) -EDTA; stress group: 0 µM Na-Fe (III) -EDTA + FerroZine. * Shows statistical difference compared to non-transgenic Col-0 plant grown under the same conditions (P < 0.05) (n = 30 for a, b and c; n = 3 for d).

HvNAS1'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkilerinin demir eksikliğine dayanıklılıklarının doğrulanabilmesi için 6 gün demir eksikliğine maruz bırakılan OE1, OE2 ve Col-0 bitkilerinin köklerindeki FCR aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre, normal koşullarda yetişen OE1 ve OE2 bitkilerinin köklerindeki FCR aktivitesi Col-0'a kıyasla sırasıyla 3,0 ve 3,6 kat yüksekken, demir eksikliği uygulanan bitkilerde bu oran 4,3 ve 5,5 kata ulaşmıştır (Şekil 5). Demir eksikliği uygulanan Col-0 bitkilerinde ise FCR aktivitesi sadece 1,6 kat artış göstermiştir. Dolayısıyla, *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkilerinin köklerinde FCR'nın daha etkin çalışmasından dolayı transgenik bitkilerin Col-0'a kıyasla demir eksikliğine daha dayanıklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar soyada gerçekleştirilen bir çalışmayı destekler niteliktedir (Vasconcelos ve ark., 2006). Buna göre, *Arabidopsis thaliana*'da ferrik redüktaz enzimini kodlayan bir genin (*AtFRO2*) soyada konstitütif olarak ifade edilmesi sonucunda yüksek FRO enzim aktivitesine bağlı DEK toleransı gözlenmiştir.

HvNAS1'i Yüksek Seviyede İfade Eden Arabidopsis Bitkileri Kök Ve Gövdelerinde Yüksek Miktarda Fe Ve Zn Biriktirir

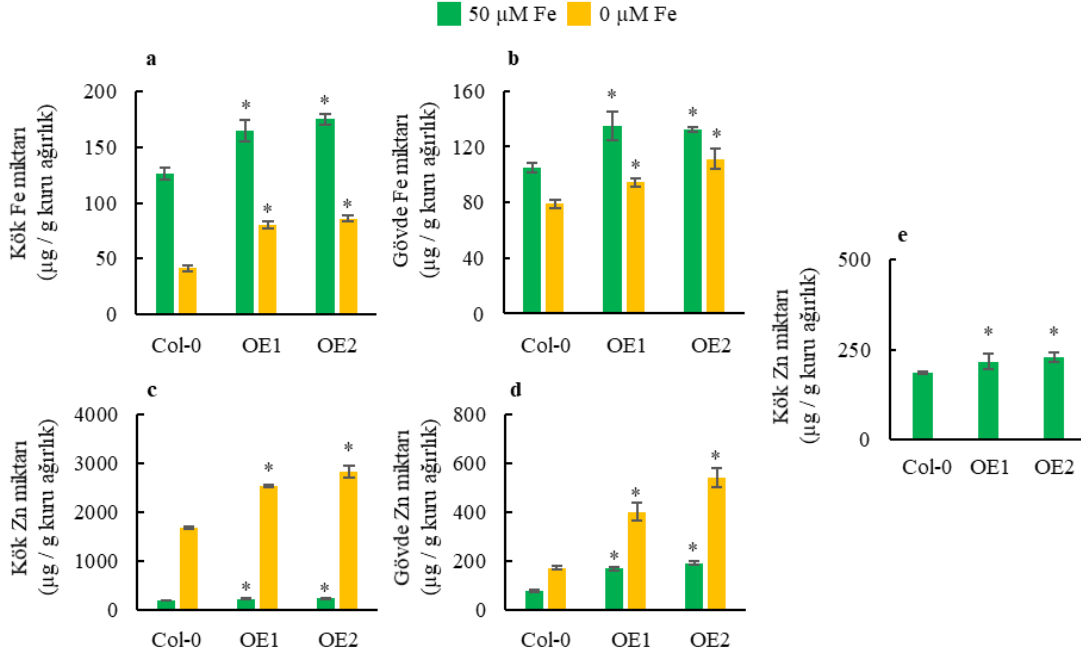
Fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizlerden elde edilen sonuçlar birleştirildiğinde, *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkilerinin demir

eksikliğinde rizosferden demiri daha etkin alabildikleri tahmin edilmektedir. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için 6 gün demir eksikliğine maruz bırakılan OE1, OE2 ve Col-0 bitkilerinin kök ve gövdelerinde biriken Fe ve Zn miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4). Buna göre, *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkileri kök ve gövdelerinde transgenik olmayan Col-0'a kıyasla daha fazla Fe ve Zn biriktirmişlerdir (Şekil 6). Benzer bir sonuç arpa *NAS1* ve *NAAT* genlerini yüksek seviyede ifade eden transgenik çeltikte gözlenmiştir (Suzuki ve ark., 2008). Bu yolla transgenik pirinç danelerinde daha fazla demir birikimi gözlenmiştir. Demir eksikliği altında bitkilerin kök ve gövdelerinde biriken Fe

miktarı azalırken, Zn miktarının arttığı gösterilmiştir (Long ve ark., 2010).

Benzer bir durum transgenik olmayan Col-0 bitkilerinde de gözlenirken, demir eksikliği altında demir alımından sorumlu *IRT1* ve *FRO2*'nin indüklendiği OE1 ve OE2 bitkilerinde biriken Zn miktarları Col-0'dan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olmuştur.

Bütün sonuçlar dikkate alındığında, *HvNAS1* geninin Arabidopsis'te yüksek seviyede ifade edilmesi sonucunda transgenik bitkilerin kök ve gövdelerinde demir ve çinkonun daha fazla birikmesinden dolayı bitkiler demir eksikliğine daha dayanıklı hale gelmişlerdir.



Şekil 6. *HvNAS1*'i yüksek seviyede ifade eden Arabidopsis bitkileri kök ve gövdelerinde daha fazla Fe ve Zn biriktirirler.

İki adet (OE1 ve OE2) homozigot T₃ Arabidopsis bitkisi %0,5 sakaroz ve %1,5 agar ilave edilmiş ¼ x MS besiyerinde 4 gün yetiştirildikten sonra Fe-yetersiz ortama aktarılıp 6 gün stres uygulanmıştır. a. Kök Fe miktarı (μg / g kuru ağırlık). b. Gövde Fe miktarı (μg / g kuru ağırlık). c. Kök Zn miktarı (μg / g kuru ağırlık). d. Gövde Zn miktarı (μg / g kuru ağırlık). e. 50 μM Na-Fe(III)-EDTA altında kök Zn miktarı (μg / g kuru ağırlık). Kontrol grubu: 50 μM Na-Fe(III)-EDTA; stres grubu: 0 μM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Aynı koşullarda yetiştirilen transgenik olmayan Col-0 bitkisine kıyasla istatistik farkı gösterir (P<0,05). (n = 3).

Figure 6. Arabidopsis plant overexpressing *HvNAS1* accumulate more Fe and Zn in their roots and shoots.

Two homozygous T₃ Arabidopsis plants (OE1 and OE2) were grown for 4 days in ¼ x MS medium supplemented with 0.5% sucrose and 1.5% agar, then transferred to Fe-deficient medium and grown for an additional 6 days. a. Root Fe level (μg / g DW). b. Shoot Fe level (μg / g DW). c. Root Zn level (μg / g DW). d. Shoot Zn level (μg / g DW). e. Root Zn level (μg / g DW) under 50 μM Na-Fe(III)-EDTA. Control group: 50 μM Na-Fe(III)-EDTA; stress group: 0 μM Na-Fe(III)-EDTA + FerroZine. * Shows statistical difference compared to non-transgenic Col-0 plant grown under the same conditions (P<0.05) (n = 3).

Sonuç

Bu çalışma kapsamında çift çenekli bitkilerde evrimleşmemiş bir demir alım mekanizmasında önemli bir rolü bulunan ve arpa köklerinde fitosidrefer üretiminden sorumlu *NİKOTİNAMİN SENTAZİ* (*HvNAS1*) geninin Arabidopsis *thaliana*'da yüksek seviyede ifade edilmesi sonucunda Arabidopsis'in doğal demir alım mekanizmasının indüklendiği gösterilmiştir. Arabidopsis'in doğal demir alım mekanizmasının daha etkin çalışmasına bağlı olarak bu transgenik bitkilerin rizosferden demir ve çinkoyu daha rahat aldıkları, köklere alınan minerallerin yeşil aksamda daha yüksek seviyelerde birikebildiği ve bu nedenlerden dolayı bitkilerin demir eksikliğine daha dayanıklı oldukları gösterilmiştir.

Teşekkür

Bu araştırma Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenmiştir. Proje no: GTB 2017/01-BAGEP.

Kaynaklar

Aksoy E, Jeong IS, Koiwa H. 2013. Loss of function of Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like1 activates iron deficiency responses at the transcriptional level. Plant Physiol. 161: 330-345. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.112.207043>.

- Amir R, Hacham Y, Galili G. 2002. Cystathionine γ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. *Trends Plant Sci* 7: 153-156. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02227-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02227-6).
- Anjum NA, Umar S, Singh S, Nazar R, Khan NA. 2008. Sulfur assimilation and cadmium tolerance in plants. (Khan, Singh and Umar) Sulfur assimilation and abiotic stress in plants. Springer. Netherlands. ss: 271-302. 978-3-540-76326-0
- Bashir K, Inoue H, Nagasaka S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2006. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry* 281: 32395-32402.
- Blair MW, Knewton SJB, Astudillo C, Li C-M, Fernandez AC, Grusak MA. 2010. Variation and inheritance of iron reductase activity in the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and association with seed iron accumulation QTL. *BMC Plant Biol.* 10: 215. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-215>.
- Cheng L, Wang F, Shou H, Huang F, Zheng L, He F, Li J, Zhao F-J, Ueno D, Ma JF. 2007. Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe (II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiol.* 145: 1647-1657. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.107912>.
- Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, Prichard CL, Guerinot ML. 2003. Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol.* 133(3): 1102-1110. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.103.025122>.
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML. 2002 Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell.* 14: 1347-1357. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.001263>.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* 103: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Brait JF, Walker EL. 2001. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe³⁺ uptake. *Nature.* 409: 346-349. DOI: <https://doi.org/10.1038/35053080>.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5-17. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(11): 5624-5628. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5624>.
- Grusak MA, Welch RM, Kochian LV. 1990. Does iron deficiency in *Pisum sativum* enhance the activity of the root plasmalemma iron transport protein. *Plant Physiol.* 94: 1353-1357. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1353>.
- Hell R, Stephan UW. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta.* 216: 541-551. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0920-4>.
- Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa N-K, Mori S. 1999. Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.* 119: 471-480. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.119.2.471>.
- Higuchi K, Watanabe S, Takahashi M, Kawasaki S, Nakanishi H, Nishizawa NK, Mori S. 2001. Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant J.* 25: 159-167. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2001.00951.x>.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347 (2. edition).
- Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2003. Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J.* 36(3): 366-381. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01878.x>.
- Jeong J, Connolly EL. 2009. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Sci.* 176: 709-714. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.011>.
- Kim SA, Guerinot ML. 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Febs Lett.* 581: 2273-2280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.043>.
- Kobayashi T, Nakanishi H, Takahashi M, Kawasaki S, Nishizawa N-K, Mori S. 2001. In vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta.* 212: 864-871. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250000453>.
- Kobayashi T, Nishizawa NK. 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 131-152. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>.
- Li W, Santi S, Tan C, WS. 2007. Dissecting P-type H⁺-ATPase-mediated proton extrusion in Arabidopsis. In 18th International Conference on Arabidopsis Research, Beijing, China.
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN. 2010. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* 22(7): 2219-2236. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074096>.
- Ma JF, Taketa S, Chang YC, Iwashita T, Matsumoto H, Takeda K, Nomoto K. 1999. Genes controlling hydroxylations of phytosiderophores are located on different chromosomes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta.* 207(4): 590-596. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250050522>.
- Marschner H, Marschner P. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic Press. London, Waltham, MA. ISBN: 978-0-12-384905-2.
- Mizuno D, Higuchi K, Sakamoto T, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2003. Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. *Plant Physiol.* 132(4): 1989-1997. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.102.019869>.
- Mori S, Nishizawa N. 1987. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. *Plant Cell Physiol.* 28:1081-92. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077388>.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. 2002. Short technical report processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques.* 32: 1372-1379.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakanishi H, Okumura N, Umehara Y, Nishizawa NK, Chino M, Mori S. 1993. Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol.* 34: 401-410. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078434>.
- Nakanishi H, Yamaguchi H, Sasakuma T, Nishizawa NK, Mori S. 2000. Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Mol. Biol.* 44: 199-207. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006491521586>.
- Okumura N, Nishizawa NK, Umehara Y, Ohata T, Nakanishi H, Yamaguchi T, Chino M, Mori S. 1994. A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.* 25: 705-719.
- Palmer CM, Guerinot ML. 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5: 333-340. DOI:10.1038/nchembio.166.

- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-e45. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Ravanel S, Droux M, Douce R. 1995. Methionine Biosynthesis in Higher-Plants. 1. Purification and Characterization of Cystathionine γ -Synthase from Spinach Chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 572-584. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1077>.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697. DOI: <https://doi.org/10.1038/17800>.
- Satbhai SB, Setzer C, Freynschlag F, Slovak R, Kerdaffrec E, Busch W. 2017. Natural allelic variation of FRO2 modulates Arabidopsis root growth under iron deficiency. *Nat. Commun.* 8(1): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms15603>.
- Shojima S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Irifune T, Mori S. 1990. Biosynthesis of phytosiderophores: in vitro biosynthesis of 2-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiol.* 93:1497-503. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.93.4.1497>.
- Suzuki M, Morikawa KC, Nakanishi H, Takahashi M, Saigusa M, Mori S, Nishizawa NK. 2008. Transgenic rice lines that include barley genes have increased tolerance to low iron availability in a calcareous paddy soil. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 54: 77-85. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00205.x>.
- Takagi S. 1976. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat-and rice-root washings: I. Activity Measurement and Preliminary Characterization. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 22: 423-433. DOI: <https://doi.org/10.1080/00380768.1976.10433004>.
- Takagi S., Nomoto K, Takemoto T. 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant. Nutr.* 7: 469-477. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904168409363213>.
- Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S. 2001. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnol.* 19: 466-469. DOI: <https://doi.org/10.1038/88143>.
- Takahashi M, Yamaguchi H, Nakanishi H, Shioiri T, Nishizawa N-K, Mori S. 1999. Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol.* 121: 947-956. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.947>.
- Takizawa R, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S. 1996. Effect of iron deficiency on S-adenosyl-methionine synthetase in barley roots. *J. Plant. Nutr.* 19: 1189-1200. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904169609365190>.
- Thomine S, Vert G. 2011. Iron transport and signaling in plants. (Geisler, Venema) *Transporters and pumps in plant signaling*. Berlin Heidelberg. Springer. ss: 99-131. ISBN: 978-3-642-14368-7.
- Ueno D, Rombola AD, Iwashita T, Nomoto K, Ma JF. 2007. Identification of two new phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytol.* 174:304-310. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02056.x>.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15): e115-e115. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Vasconcelos M, Eckert H, Arahana V, Graef G, Grusak MA, Clemente T. 2006. Molecular and phenotypic characterization of transgenic soybean expressing the Arabidopsis ferric chelate reductase gene, *FRO2*. *Planta* 224: 1116-1128. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0293-1>.
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell.* 14: 1223-1233. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.001388>.
- White JP. 2012. Ion Uptake Mechanisms of Individual Cells and Roots: Short-distance Transport (Marschner, Marschner) In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd. Ed) Academic Press. London, Waltham, MA. ss: 7-47. ISBN: 978-0-12-384905-2.
- White PJ, Brown PH. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals Bot.* 105: 1073-1080. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>.