

## ***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. YAPRAKLARINDA GUS VE GFP RAPORTÖR GENLERİ KULLANILARAK SENESENS İLE İLİŞKİLİ GENLERİN ANALİZİ**

Nihal GÖREN SAĞLAM

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, 34134, İstanbul.  
e-mail: [gorenn@istanbul.edu.tr](mailto:gorenn@istanbul.edu.tr)

Alınış (Received): 5 Haziran 2017, Kabul (Accepted): 28 Kasım 2017, Erken Görünüm (Online First): 1 Aralık 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

**Özet:** Yaprak senesensinin düzenlenme ve işleyiş yapısı birçok biyokimyasal ve düzenleyici yolağın aktivasyonunu içeren kompleks bir olaydır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda, yaprak senesensinin moleküler mekanizmasını anlamak için senesens ile ilişkili bazı genler (SAGs=Senescence Associated Genes) belirlenmiştir. Bu çalışma ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 genlerinin senesens ile ilişkili olabileceğini araştırmak için planlanmıştır. Bu amaçla GUS ( $\beta$ -glukuronidaz) ve GFP (Yeşil Fluoresans Protein) işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 promotör genlerini içeren *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ekotip Columbia) bitkisi kullanılmıştır. GUS ve GFP analizinde promotörün ne zaman ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Karanlığın teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopisi ile genlerin aktif olduğu zaman ve hücre tipleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 genlerinin senesens sırasında, epidermis, epidermal hücrelerin nükleusları, mezofil ve stoma hücrelerinde aktif oldukları belirlenerek bu genlerin yaprak senesensinde rol oynadıkları ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Arabidopsis thaliana*, GUS, GFP, senesens.

### **Analysis of Senescence-Related Genes Expressions Using Gus and Gfp Reporter Genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Leaves**

**Özet:** The regulation and functional steps of leaf senescence is a complex phenomenon involving the activation of many biochemical and regulatory pathways. As a result of previous studies, some genes related to senescence (SAGs = Senescence Associated Genes) have been identified to understand the molecular mechanism of leaf senescence. This study was designed to investigate the association potential of ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) and MYB2 genes with senescence. For this purpose, GUS ( $\beta$ -glucuronidase) and GFP (Green Fluorescent Protein) markers and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ecotype Columbia) plants containing ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 promoter genes were used. GUS and GFP analyses were used to determine when the promoter is active in which cells or cell types. Dark-induced senescence model was designed and the time and the cell types where the genes were active were determined by using GUS staining and confocal microscopy. The results showed that ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) and MYB2 genes were active in epidermis, nucleus of epidermal cells, mesophyll and stomata cells during senescence and these genes were found to play a role in leaf senescence.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, GUS, GFP, senescence.

#### **Giriş**

Senesens bitkilerde görülen, yaprak gelişiminin son safhası olan önemli bir gelişimsel süreçtir (Woo ve ark. 2010). Senesens temel olarak bitki yaşı tarafından kontrol edilen son derece kompleks ancak düzenli bir olaydır. Normal şartlarda bir yaprak hücresi belli bir gelişimsel yaşa ulaştığı zaman senesense maruz kalır. Ancak, yaprak senesensini içsel (bitki büyüme düzenleyicileri, üreme durumu, hücresel farklılaşma vb.) ve biyotik/abiyotik (karanlık, kuraklık, yüksek ısı, tuzluluk) stresler gibi dışsal faktörlerden etkilenir (Lim ve ark. 2007, Woo ve ark. 2010, Zhang ve Zhou 2013). Gelişimsel senesensde olduğu gibi stresin teşvik ettiği yaprak

senesensinde de ilk süreç kloroplastların yıkımı ile başlamaktadır (Sobieszczyk-Nowicka ve ark. 2015). Yaprak senesensini, kloroplastların bozulması ve makromoleküllerin hidrolizi ve taşınması ile başlayıp, mitokondri ve nükleusun dejenerasyonu ile devam ederek düzenli bir şekilde meydana gelir (Lim ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2015).

Gen anlatımının transkripsiyonel düzenlenmesi çevresel uyarılara karşı oluşan bitki cevaplarında ve bitki gelişiminde kilit rol oynamaktadır (Neguyen ve ark., 2016). Yaprak senesensinin moleküler mekanizmasını

anlamak için senesens ile ilişkili genler (SAGs=Senescence Associated Genes) belirlenmiştir (Martins ve ark. 2016). SAG'ların senesens sırasında anlatımlarının arttığı ve nukleazlar, proteazlar ve hücre duvarı hidrolazlarını içeren kodladıkları proteinlerin hücrel yapıların yıkımında rol oynadıkları bulunmuştur (Lim ve ark. 2007). Bu genler sıklıkla senesens işaretleyici (marker) genler olarak kullanılırlar ve gen anlatımları senesensin başlamasıyla birlikte hızla artmaktadır (Sakuraba ve ark. 2014, Rauf ve ark. 2013, Li ve ark. 2013). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ATH1 genom dizilimi kullanılarak yapılan transkriptom çalışmaları doğal ve karanlığın teşvik ettiği senesens sürecinde anlatımı artan ve azalan binlerce geni meydana çıkarmıştır (Buchanan-Wollaston ve ark. 2005, Van der Graff ve ark. 2006). Ayrıca, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin senesensin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları bulunmuştur (Zhang ve ark. 2015). Bunların arasında, 96 transkripsiyon faktörü geninin transkript seviyelerinin gelişimsel senesens sırasında en az 3 kat arttığı, karanlığın teşvik ettiği senesens sırasında ise 303 transkripsiyon faktör geninin transkript seviyesinin arttığı 81 transkripsiyon faktör geninin transkript seviyesinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Lin ve Wu 2004, Buchanan-Wollaston ve ark. 2005). *Arabidopsis*'te senesensi düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin büyük bölümünü NAC, WRKY ve MYB ailesi transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu rapor edilmiştir (Balazadeh ve ark. 2008, Huang ve ark. 2015, Zhao ve ark. 2016). Bu nedenle, yaprak senesensinin düzenlenme ve işleyiş yapısı birçok biyokimyasal ve düzenleyici yolağın aktivasyonunu içeren kompleks bir süreçtir.

NAC proteinler *Arabidopsis* genomunda 100 den fazla üyesi ile bitki-spesifik transkripsiyon faktörü süperalesinin en büyük grubu içindedirler (Puranik ve ark. 2012). NAC orijinal olarak benzer bir DNA-binding proteini içeren üç protein isminden oluşmaktadır, NAM (No Apical Meristem=Apikal meristemi olmayan), ATAF1-2, ve CUC2 (cup-shaped cotyledon=Küp-şekilli kotiledon) (Aida ve ark. 1997). NAC transkripsiyon faktörleri bitki yaşam döngüsünün pek çok safhasında oynadıkları çeşitli roller ile çok fonksiyonlu proteinlerdir (Nuruzzaman ve ark. 2010). Geniş çaplı transkriptom profiline bakıldığında, *Arabidopsis*'te 30 dan fazla NAC geninin anlatımının yaprak senesensisi sırasında arttığı görülmektedir (Breeze ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda 3 NAC geninin, ANAC019, ANAC055 ve ANAC072, kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık ile teşvik olduğu *Arabidopsis thaliana*'da Yeast-one-hybrid (Y1H) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Tran ve ark. 2004, Hickman ve ark. 2013).

MYB proteinler bitkilerde savunma cevaplarında ve gelişimsel süreçlerde rol oynayan, bir süperail (super family) transkripsiyon faktörleridirler (Yanhui ve ark. 2006). MYB süperalesi, *Arabidopsis* gen ailesi içerisinde en geniş sayıda üyeye sahiptir (Riechmann ve Ratcliffe 2000). MYB ve MYB-benzeri transkripsiyon faktörleri toplamda 212 gen tarafından kodlanmaktadır ve

bunların 12 tanesi senesens sırasında tespit edilmişlerdir. MYB2 geninin fazla ekspresyonu ABA tepkisini artırır ve kuraklık toleransının artmasına neden olur (Ding ve ark. 2009). MYB75 ve MYB90 genleri, senesens esnasında oksidatif strese karşı koruma sağlayan antosiyanin biyosentezine katılırlar (Jung ve ark. 2010). Genel olarak, senesens sırasındaki MYB transkripsiyon faktörlerinin rolü şu ana kadar ikincil metabolizmalar ve ABA sinyali ile ilişkili görünmektedir (Huang ve ark. 2015). MYB transkripsiyon faktörlerinin yaprak senesensinin düzenlenmesine karıştığını gösteren yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır (Guo ve Gan 2011, Zhang ve ark. 2011, Jaradat ve ark. 2013).

Bir raportör gen ilgilendiğimiz bir genin transkripsiyonel aktivitesinin rapor edilmesinde kullanılan ve aktivitesi kolaylıkla analiz edilebilen bir enzimi kodlar. Raportör genler, gen ürünü bilinmeyen ya da kolaylıkla tanımlanamayan bir genin anlatımının çalışılmasına izin vermektedir (Karcher 2002). Raportör olarak kullanılan genler arasında en yaygın olanı *E. coli* ye ait GUS ( $\beta$ -glukuronidaz) geni olup,  $\beta$ -glukuronidaz enzimini kodlamaktadır. Son yıllarda GUS geni füzyon sistemi bitkilerde ve tarımsal moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun nedeni bitkiler arasında yaygın endojen aktiviteye sahip olmayışı ve gen ifadesi sonucu oluşan ürünlerin spektrofotometrik, histokimyasal ve florimetrik olarak kolaylıkla saptanabilmesidir. Jefferson ve ark. (1987) tarafından rapor edilmesinden bu yana GUS ( $\beta$ -glukuronidaz) geni füzyon sistemi bitkilerde ve tarımsal moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Jefferson 1987, 1989, Gallagher 1992, Cote ve Rutledge 2003). GUS'ın yanısıra GFP (Green Fluorescent Protein = Yeşil floresans protein) de bitkilerde gen anlatımının gözlemlenmesinde genetik işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Denizanasından izole edilmiş bir protein olan GFP 395nm dalga boyunda en üst emilme oranına sahiptir. Diğer raportör genlerden farklı olarak GFP geninin transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği canlı doku veya hücrelerde yeşil renk vermesiyle anlaşılabilen ve dokuların canlılığı korunmaktadır.

Yapılan transkriptomik çalışmalar bazı NAC ve MYB genlerinin senesens sırasında anlatımının arttığını göstermekte ancak lokalizasyonu hakkında bilgi vermemektedir. Bu çalışmada GUS ve GFP analizi ile ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2 genlerinin ne zaman (senesens başlamadan önce ya da senesens sırasında) ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Bu amaçla karanlığın-teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopi incelemesi ile genlerin aktif olduğu zaman ve hücre tipleri belirlenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Karanlığın-teşvik Ettiği Senesensin Oluşturulması

Bu çalışmada GUS ve GFP işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2

promotör genlerini içeren, Warwick HRI (İngiltere)'dan temin edilen *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohumları kullanılmıştır. Seçilen promotör genler ile ilgili bilgiler aşağıya çıkarılmıştır (<http://www.arabidopsis.org>).

**ANAC018 (At1g52880):** Bir NAC domain transkripsiyon faktörüdür.

**ANAC019 (At1g52890):** NAC transkripsiyon faktörünü kodlar. Anlatımını kuraklık, tuzluluk ve ABA teşvik eder.

**PAP1/MYB75 (At1g56650):** MYB domain içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Antosiyanin metabolizmasına karışır.

**MYB2 (At2g47190):** Bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlar. Tuz ve dehidratasyon cevapları ile ilgili genlerin anlatımını düzenlediği bilinmektedir.

GUS ve GFP raportör genleri ile birlikte yukarıda belirtilen promotör genleri içeren *Arabidopsis thaliana* tohumları %0,1 lik agaroz içeren tüplerde iki gece 4°C de tohum dormansisinin kırılması için bekletildikten sonra *A. thaliana* toprak karışımı içeren (6 kısım Levingtons F2: 1 kısım kurutulmuş silika kumu: 1 kısım vermikülit) saksılara ekildi. Bitkiler 22°C de 16/8 saat ışık/karanlık periyodunda %70 nem ve 250µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık altında yetiştirildi. 50 günlük bitkiler içerisinde 3 ml distile su ve Whatman filtre kağıdı bulunan petrilere transfer edildi. Petrilere karanlığın-teşvik ettiği senesensi oluşturmak için karanlığa konuldu. Bitkiler 5. günde GUS ve GFP analizi için deneye alındı.

#### GUS boyama

Karanlığın-teşvik ettiği senesensi belirlemek için karanlığa konulan bitkilerin 5. günde fotoğraf stüdyosunda dijital kamera (Nikon Coolpix) ile fotoğrafları çekildi. Daha sonra bitkilerin yaprakları derin kuyucuklu plakalardaki 100mM Sodyum fosfat tamponu (pH 7,2), 10mM EDTA, Triton X-100 (%0,1), 25mM potasyum ferrosiyaniid, 25mM potasyum ferrisiyaniid ve 1mg/ml X-Gluc içeren GUS boya solüsyonuna konuldu ve 2 defa 10'ar dakika vakum uygulaması ile boyanın dokulara girmesi sağlandı. Daha sonra dokular bir gece 37°C de inkübe edildi ve 80°C ye ısıtılmış %80 etanol ile klorofil uzaklaşmıncaya kadar yıkandı. Yıkama işleminden

sonra her yaprağın fotoğrafları çekildi. GUS aktivitesi yapraklarda mavi renk oluşumu ile tespit edildi.

#### GFP analizi

5 günlük karanlık uygulamasından sonra dijital kamera (Nikon Coolpix) ile bitkilerin fotoğrafları çekildi. Farklı senesens aşamalarındaki 3 rozet yapraktaki GFP floresans Konfokal mikroskop (Zeiss LSM 710) ve ZEN 2009 yazılımı kullanılarak gözlemlendi. Aynı zamanda kullanılan promotör genleri içeren bitkilere ait yeşil yapraklar da (kontrol grubu) GFP varlığını belirlemek için konfokal mikroskop altında incelendi.

#### **Bulgular**

##### GUS Analizi

Bu çalışmada da promotör genlerin yaprağın hangi kısımlarında ve ne zaman aktif olduğunu görebilmek için histokimyasal inceleme yapılmış ve elde edilen GUS boyama görüntüleri Şekil 1 ve Şekil 2 de verilmiştir. Şekil 1 de senesens teşvik edilmemiş (kontrol grubu) *A. thaliana* bitkilerinin yapraklarında GUS boyama sonucunun negatif olduğu görülmektedir.

ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2 genlerinin yaprağın senesense uğramış olan kısımlarında anlatımlarının olduğu, GUS boyama sonucunda mavi renk oluşumu ile saptanmıştır (Şekil 2).

##### GFP Analizi

Yaptığımız çalışmada ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75) ve MYB2 genlerinin nerede ve ne zaman (senesens başlamadan önce ya da senesens sırasında) anlatımının olduğu konfokal mikroskop altında GFP'nin varlığının gösterilmesi ile saptanmıştır. ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75) ve MYB2 genleri ile ilgili kontrol ve karanlığın-teşvik ettiği senesense uğramış bitkilerin konfokal görüntüleme verileri Şekil 3, 4, 5 ve 6 de sırasıyla verilmiştir.

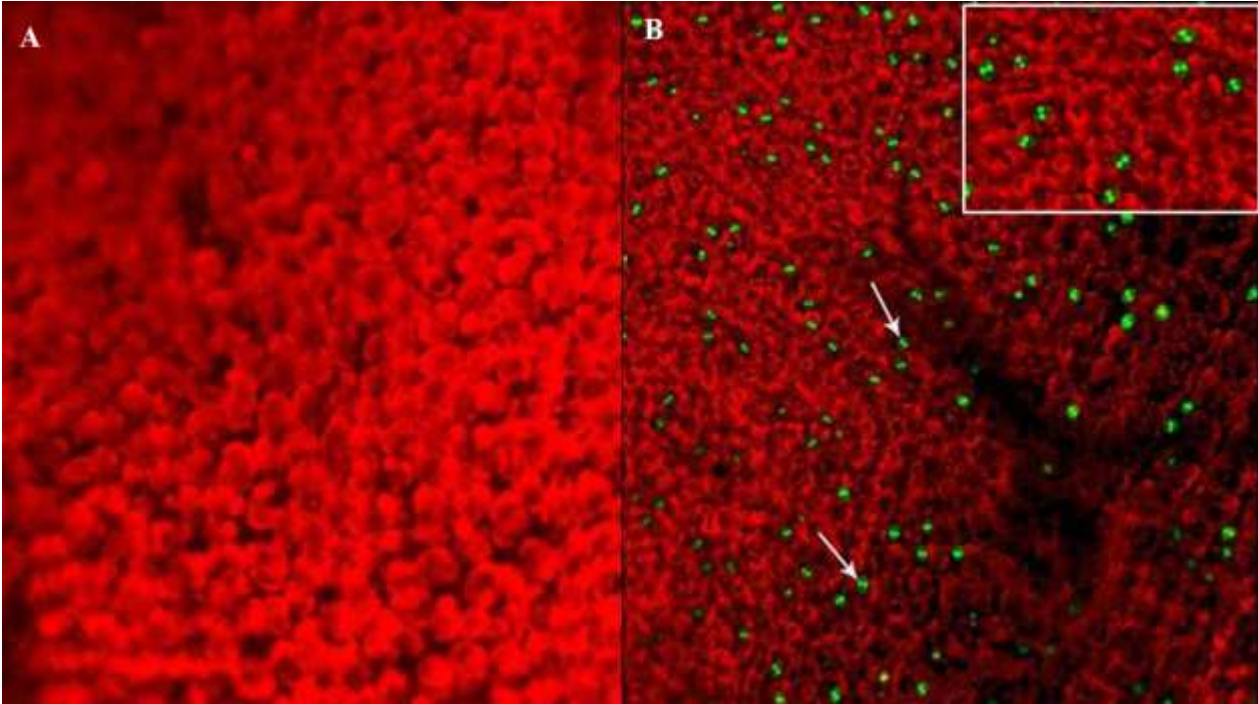
ANAC018 geninin *A. thaliana* bitkisinin yeşil yapraklarında anlatımı olmazken, senesense uğramış yaprağın stoma bekçi hücrelerinde anlatımının olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 3B). Bu durum ANAC018 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.



**Şekil 1.** Kontrol bitkilerinin yapraklarındaki GUS boyama sonucunun görüntüsü.



**Şekil 2.** Kullanılan transgenik hatlarda promotör genlerin aktif olduğu bölgeleri gösteren GUS boyama görüntüleri. Yapraklarda oluşan mavi renk GUS aktivitesinin olduğu kısımları göstermektedir. A-B. ANAC018 geni: A. boyama öncesi, B. boyama sonrası yaprak görüntüleri; C-D. ANAC019 geni: C. boyama öncesi, D. boyama sonrası yaprak görüntüleri; E-F. PAP1 (MYB75) geni: E. boyama öncesi, F. boyama sonrası yaprak görüntüleri; G-H. MYB2 geni: G. boyama öncesi, H. boyama sonrası yaprak görüntüleri.



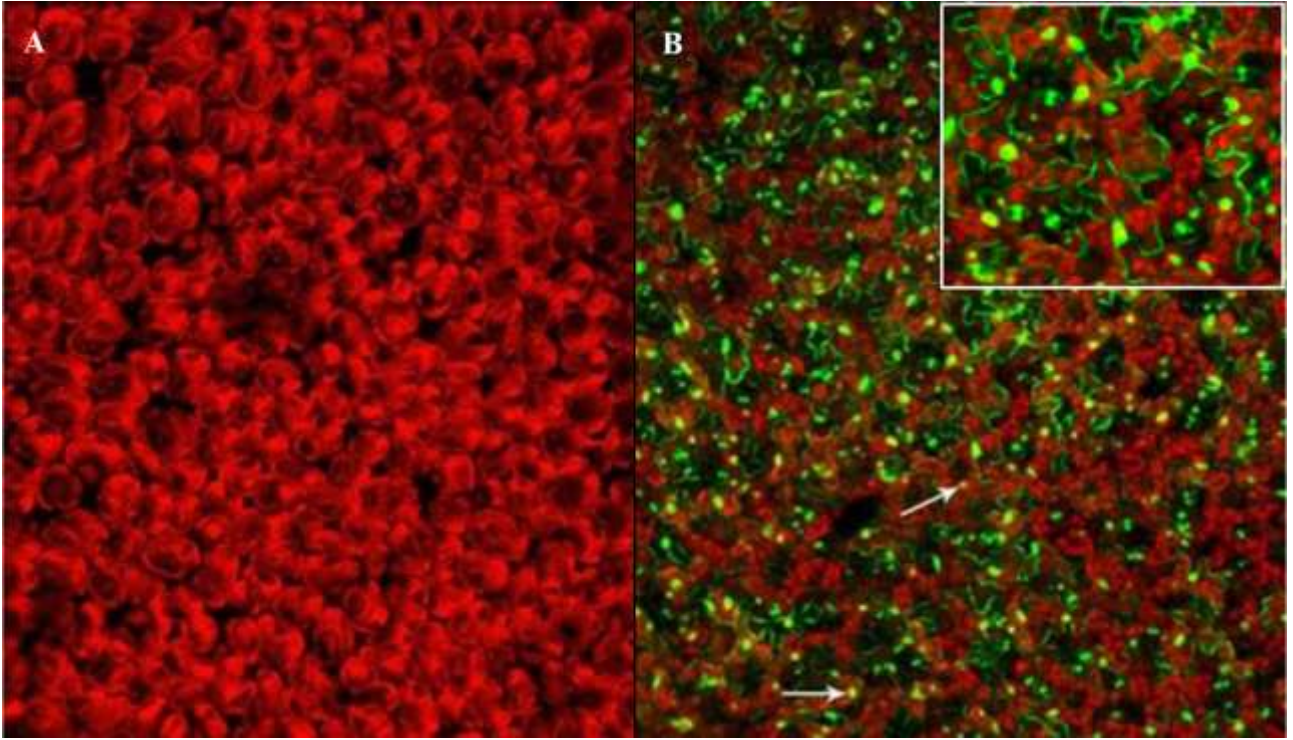
**Şekil 3.** ANAC018 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar stomaların bekçi hücrelerini göstermektedir. Küçük resim bekçi hücrelerinin büyütülmüş halini göstermektedir.

Şekil 4 de görüldüğü gibi ANAC019 genini taşıyan *A. thaliana* bitkilerinde gen anlatımı senesense uğramış yaprakta artmış ve bu genin anlatımının epidermal hücrelerin nükleusunda ve stomaların bekçi hücrelerinde olduğu GFP varlığı ile tayin edilmiştir (Şekil 4B).

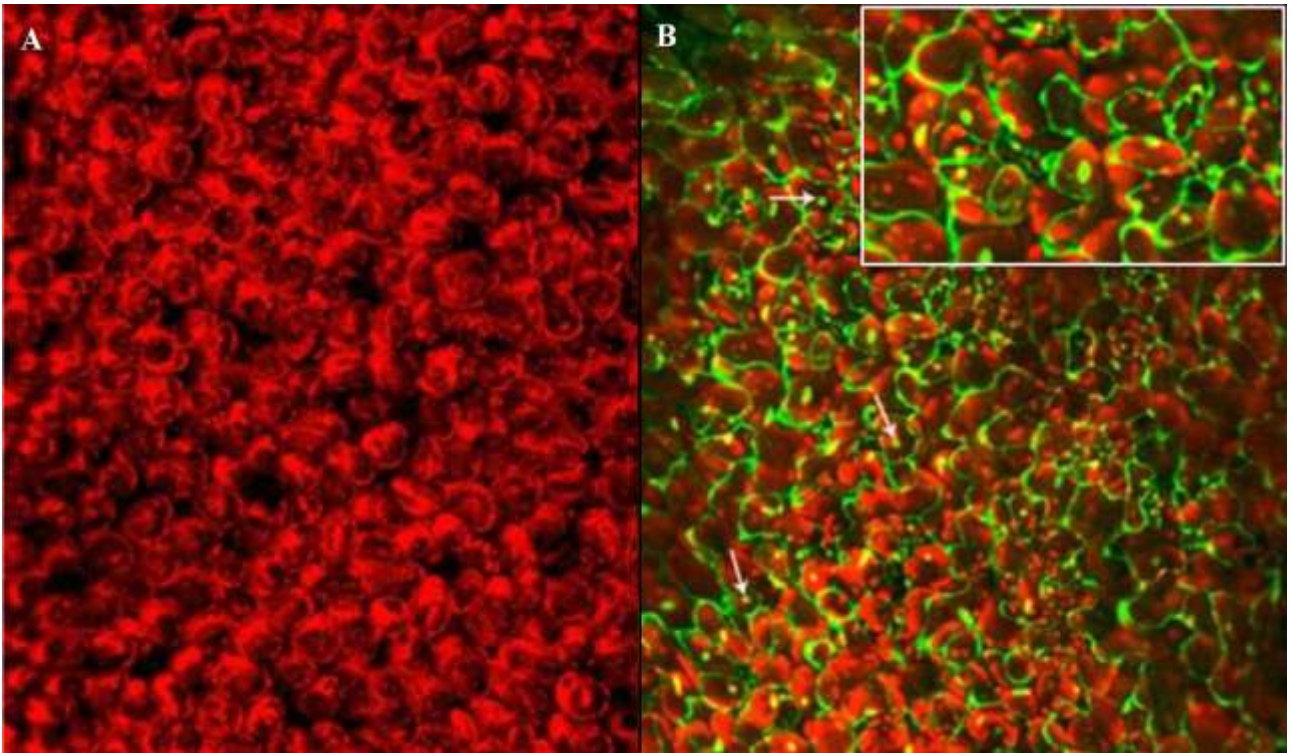
PAP1 (MYB75) genini taşıyan *A. thaliana* bitkisinin yeşil ve senesense uğramış yaprakları incelendiğinde yeşil yapraklarda gen anlatımının gözlenmediği, senesense

uğramış yapraklarda ise epidermiste ve epidermal hücrelerin nükleusunda gen anlatımının olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 5).

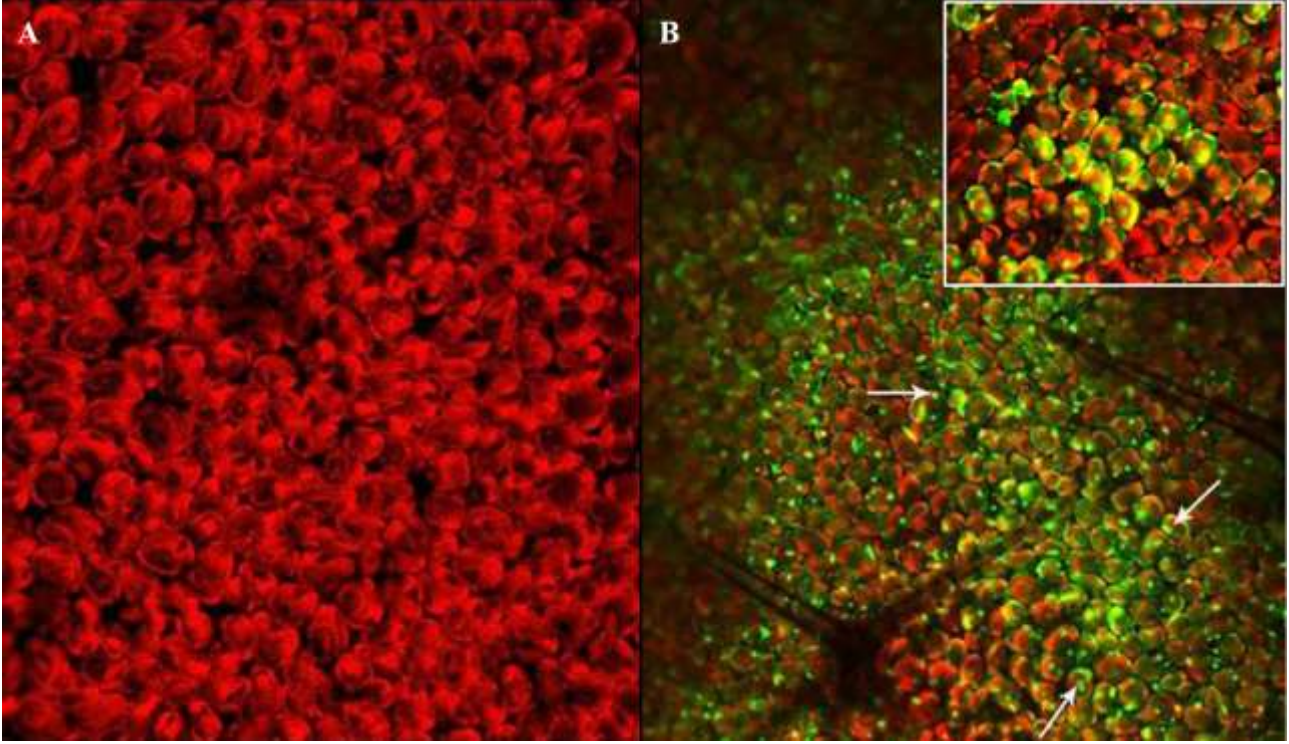
Şekil 6'da MYB2 geni aktarılmış *A. thaliana*'nın yeşil yapraklarında anlatım olmazken senesense uğramış yaprakta mezofil, epidermis hücreleri ve epidermal hücrelerin nükleuslarında gen anlatımının olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.** ANAC019 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim nükleusların ve epidermislerin büyütülmüş halini göstermektedir.



**Şekil 5.** PAPI (MYB75) genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim nükleusların ve epidermislerin büyütülmüş halini göstermektedir.



**Şekil 6.** MYB2 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim mezofil hücreleri ve nükleusların büyütülmüş halini göstermektedir.

### Tartışma

Senesens doku, organ ve tüm bitkinin ölümü ile sonuçlanan bitki gelişiminin son safhasıdır. Yaprak senesensi optimal büyüme koşulları altında normal organ ontogenezinin bir parçası olmasının yanı sıra biyotik ve abiyotik stresler tarafından da teşvik edilebilmektedir (Kucharewicz ve ark. 2017). Senesens sendromunu kontrol eden iç faktörler; yaş, bitki hormonlarındaki değişimler ve reproduktif büyümeyi içermektedir (Guo ve Gan 2012). Yaprak senesensinin oluşumunun anlaşılmasında, transkripsiyon faktörlerini kodlayan ve senesens sırasında anlatımı artan genler ilgi çekmektedir. NAC, MYB ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin, senesens sırasındaki transkripsiyonel değişiklikleri ayarlayan temel unsurlar olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark. 2016).

ANAC018 (At1g52880) bir NAC alanı transkripsiyon faktörüdür. Sürgün gelişimi için gerekli olan petunya geni NAM (No Apical Meristem) ile homologdur. ANAC018 geninin senesens sırasında anlatımının olduğu rapor edilmiştir (<http://www.arabidopsis.org>). Ancak bu konu ile ilgili detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz GUS boyama sonuçları ANAC018 geninin yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 2B). Konfokal mikroskop sonuçları da GUS sonuçlarını teyit eder niteliktedir. ANAC018 geninin yeşil yaprakta anlatımı olmazken senesense uğramış yaprakta stomaların bekçi hücrelerinde anlatımı olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 3B). Bu durum ANAC018 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.

ANAC019 (At1g52890) kuraklık, yüksek tuz ve ABA tarafından anlatımı artan, bir NAC transkripsiyon faktörüdür (<http://www.arabidopsis.org>). ABA ile ilişkili stres sinyallerinin pozitif düzenleyicisidir ve kuraklık toleransında aşırı anlatımı olduğu bildirilmiştir (Hickman ve ark. 2013). ANAC019/055/072'nin klorofil yıkım genlerinin (Chlorophyll Catabolic Genes=CCGs) anlatımlarını düzenledikleri bildirilmiştir (Bu ve ark. 2008, Zheng ve ark. 2012, Zhu ve ark. 2015). ANAC019'dan literatürde stres ile ilişkili ya da senesens ile ilişkili NAC lardan biri olarak söz edilmektedir (Hickman ve ark. 2013, Lindemose ve ark. 2014, Kim ve ark. 2016). GUS boyama sonuçlarına bakıldığında zaman, yaptığımız çalışmada ANAC019'un yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının arttığı GUS raportör geninin verdiği mavi renkli reaksiyon ile görülmektedir (Şekil 2D). GFP raportör geninin anlatımının olup olmadığını gösteren konfokal mikroskop verileri de yeşil yaprakta anlatımının olmadığını, senesense uğramış yaprakta ise epidermal hücrelerin nükleuslarında ve stomaların bekçi hücrelerinde gen anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 4). Elde ettiğimiz sonuçlar ANAC019 geninin epidermis hücrelerinde anlatımı olduğunu göstermekte ve senesens ile ilişkili olduğunu teyit etmektedir.

MYB75 (PAP1=Production of Anthocyanin Pigment1) bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlar ve *Arabidopsis*, tütün, domates ve kanolada etkili bir şekilde antosiyanin birikimini indüklediği gösterilmiştir (Qiu ve ark. 2014). MYB75 (PAP1), bu genin aşırı anlatımının olduğu fideelerde antosiyaninlerin kuvvetli birikimine

dayanarak, *Arabidopsis*'te antosiyanin biyosentezinin pozitif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. MYB75 (PAP1)'in aşırı anlatımının antosiyanin üretimi üzerindeki bu etkisine ilaveten, bu genin aktivitesinin *A. thaliana*'da lignin birikimi, sükröz sinyali ve senesens üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Bhargava ve ark. 2010). Araştırmacılar iki MYB transkripsiyon faktörünü, PAP1 ve PAP2, glukoz tarafından indüklenen-senesens ile ilişkili genler olarak tanımlamışlardır (Pourtau ve ark. 2006). Elde ettiğimiz GUS boyama sonuçları MYB75 geninin yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 2F). Konfokal mikroskop sonuçları da GUS sonuçlarını teyit eder niteliktedir. MYB75 geninin yeşil yaprakta anlatımı olmazken senesense uğramış yaprakta epidermis hücrelerinde ve epidermal hücrelerin nükleuslarında anlatımı olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 5B). Bu durum MYB75 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.

MYB2 proteini hücre farklılaşmasının kontrolü, hormon ve çevresel streslere cevaplar gibi süreçlerin düzenlenmesinden sorumludurlar. Bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlarlar ve bitkilerde gen anlatımında düzenleyici bir rol oynarlar (Yu ve ark. 2012). MYB2 aynı zamanda oksin sinyali ve apikal dominansi mekanizması arasındaki karşılıklı etkileşime de karışarak sitokinin biyosentezini düzenlemektedir (Baek ve ark. 2013). Yapılan çalışmalar MYB2 proteininin kuraklık ve tuz stresi altında ABA (absisik asid) tarafından düzenlenen gen anlatımında transkripsiyon faktörü olarak önemli bir rol oynadığını, ayrıca kuraklık ve ABA uygulaması ile aktive olduğunu

## Kaynaklar

1. Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1): 63-78.
2. Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. & Tasaka, M. 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cupshaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, 9: 841-857.
3. Baek, D., Park, H.C., Kim, M.C. & Yun, D.J. 2013. The role of *Arabidopsis* MYB2 in miR399f-mediated phosphate-starvation response. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3): 362-73.
4. Balazadeh, S., Riaño-Pachón, D.M. & Mueller-Roeber, B. 2008. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology (Stuttgart)*, 10 (S1): 63-75.
5. Bhargava, A., Mansfield, S.D., Hall, H.C., Douglas, C.J. & Ellis, B.E. 2010. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Physiology*, 154(3): 1428-1438.
6. Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y., Penfold, C., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S.,

göstermiştir (Abe ve ark. 2003, Zheng ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda bu genin *Arabidopsis* senesens cDNA kütüphanesinde yüksek oranda temsil edildiği bulunmuş, RNA jel-blotlama ve RT-PCR analizleride MYB2 geninin yaprak senesensi sırasında anlatımının yüksek olduğu gösterilmiştir (Guo ve ark. 2004, Guo ve Gan 2011). Şekil 2'de de görüldüğü gibi GUS boyama sonuçlarında senesense uğrayan yaprak kısımlarında mavi renk oluşumunun yoğun olduğu yani MYB2 geninin aktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 2H). Konfokal mikroskopi sonuçları da GUS boyama sonuçları ile paralellik göstermekte ve MYB2 geninin senesense uğrayan kısımlardaki mezofil ve epidermis hücrelerinde anlatımı olduğu görülmektedir (Şekil 6B).

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada GUS ve GFP işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 promotör genlerini içeren *A. thaliana* bitkisinde GUS ve GFP analizi ile promotör genlerin hangi gelişim dönemi ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Bu amaçla karanlığın teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopi ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 senesens sırasında, epidermis, epidermal hücrelerin nükleusları, mezofil hücreleri ve stomaların bekçi hücrelerinde aktif oldukları belirlenerek bu genlerin senesens sırasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur.

## Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2219-Yurt Dışı Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

- Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. & Buchanan-Wollaston, V. 2011. High resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*, 23: 873-894.
7. Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q. & Li, C. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research*, 18: 756-767.
8. Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J. & Ishizaki, K. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42: 567-585.
9. Cote, C. & Rutledge, R.G. 2003. An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants. *Plant Cell Reports*, 21: 619-624.
10. Ding, Z., Li, S. & An, X. 2009. Transgenic expression of Myb15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and

- improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*, 36: 17-29.
11. Gallagher, S.R. 1992. *GUS Protocols: Using The GUS Gene As A Reporter Of Gene Expression*. Academic Press, San Diego, 215 s.
  12. Guo, Y. & Gan, S.S. 2012. Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell and Environment*, 35: 644-655.
  13. Guo, Y., Cai, Z. & Gan, S. 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27: 521-549.
  14. Guo, Y. & Gan, S. 2011. AtMYB2 regulates whole plant senescence by inhibiting cytokinin-mediated branching at late stages of development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(3): 1612-1619.
  15. Hickman, R., Hill, C., Penfold, C.A., Breeze, E., Bowden, L., Moore, J.D. & Mead, A. 2013. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 75(1): 26-39.
  16. <http://www.arabidopsis.org> (Erişim tarihi: Nisan 2017).
  17. Huang, C.K., Lo, P.C., Huang, L.F., Wu, S.J., Yeh, C.H. & Lu, C.A. 2015. A single-repeat MYB transcription repressor, MYBH, participates in regulation of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 88(3): 269-286.
  18. Jaradat, M.R., Feurtado, J.A., Huang, D., Lu, Y. & Cutler, A.J. 2013. Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. *BMC Plant Biology*, 13: 192.
  19. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, 5: 387-405.
  20. Jefferson, R.A. 1989. The GUS reporter gene system. *Nature*, 342: 837-838.
  21. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
  22. Jung, C., Shim, J.S. & Seo, J.S. 2010. Non-specific phytohormonal induction of atMYB44 and suppression of jasmonate-responsive gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and Cells*, 29:71-76.
  23. Karcher, S.J. 2002. Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene. Pages 29-42. In: Tested studies for laboratory teaching, Volume 23 (M. A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 392 s.
  24. Kim, H.J., Nam, H.G. & Lim, P.O. 2016. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*, 33: 48-56.
  25. Kucharewicz, W., Distelfeld, A., Bilger, W., Müller, M., Munné-Bosch, S., Hensel, G. & Krupinska, K. 2017. Acceleration of leaf senescence is slowed down in transgenic barley plants deficient in the DNA/RNA-binding protein WHIRLY1. *Journal of Experimental Botany*, 68(5): 983-996.
  26. Li, Z., Peng, J., Wen, X. & Guo, H. 2013. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing *miR164* transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 3311-3328.
  27. Lim, P.O., Kim, H.J. & Nam, H.G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-136.
  28. Lin, J.F. & Wu, S.H. 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 39: 612-628.
  29. Lindemose, S., Jensen, M.K., de Velde, J.V., O'Shea, C., Heyndrickx, K.S., Workman, C.T., Vandepoele, K., Skriver, K. & Masi, F.D. 2014. A DNA-binding-site landscape and regulatory network analysis for NAC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 42: 7681-7693.
  30. Martins, M.T.B., de Souza, W.R., Cunha, B.A.D.B., Basso, M.F., Oliveira, N.G., Vinecky, F. & Buckeridge, M.S. 2016. Characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaf senescence: implications for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1): 153-157.
  31. Nguyen H.T.K., Kim S.Y., Cho K-M., Hong J.V., Shin J.S. & Kim H.J. 2016. A Transcription Factor  $\gamma$ MYB1 Binds to the P1BS cis -Element and Activates PLA 2 - $\gamma$  Expression with its Co-Activator  $\gamma$ MYB2. *Plant Cell Physiology*, 57(4): 784-797.
  32. Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H. & Kikuchi, S. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465(1): 30-44.
  33. Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. & Wingler, A. 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, 224(3): 556-568.
  34. Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S. & Prasad, M. 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Science*, 17: 369-381.
  35. Qiu, J., Sun, S., Luo, S., Zhang, J., Xiao, X., Zhang, L., Wang, F. & Liu, S. 2014. *Arabidopsis* AtPAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic *Taraxacum brevicorniculatum*. *Plant Cell Reports*, 33(4): 669-680.
  36. Rauf M., Arif M., Dortay H., Matallana-Ramirez L.P., Waters M.T., Gil Nam H., Lim P.O., Mueller-Roeber, M. & Balazadeh, S. 2013. ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Reports*, 14: 382-388.
  37. Riechmann, J.L. & Ratcliffe, O.J. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5): 423-434.
  38. Sakuraba, Y., Jeong, J., Kang, M.Y., Kim, J., Paek, N.C. & Choi, G. 2014. Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 5: 4636.
  39. Sobieszczuk-Nowicka, E., Zmienko, A., Samelak-Czajka, A., Luczak, M., Pietrowska-Borek, M., Iorio, R., Del Duca,



- S., Figlerowicz, M. & Legocka, J. 2015. Dark-induced senescence of barley leaves involves activation of plastid transglutaminases. *Aminoacids*, 47: 825-838.
40. Tran, L.S.P., Nakashima, K. & Sakuma, Y. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481-2498.
41. Van der Graff, E., Schwake, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. & Kunze, R. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 141: 776-792.
42. Woo, H.R., Kim, J.H. & Kim, J. 2010. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3947-3957.
43. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G. & Yunping, S. 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60(1): 107-124.
44. Yu, L., Chen, H., Guan, Q., Ma, X., Zheng, X., Zou, C. & Li, Q. 2012. AtMYB2 transcription factor can interact with the CMO promoter and regulate its downstream gene expression. *Biotechnological Letter*, 34 (9): 1749-1755.
45. Zhang, H. & Zhou, C. 2013. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 82: 539-545.
46. Zhang, X., Ju, H.W., Chung, M.S., Huang, P., Ahn, S.J. & Kim, C.S. 2011. The R-R-type MYB-like transcription factor, AtMYBL, is involved in promoting leaf senescence and modulates an abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 52: 138-148
47. Zhang Y., Liu Z., Chen Y., He J-X. & Bi Y. 2015. Phytochrome-Interacting Factor 5 (PIF5) positively regulates dark-induced senescence and chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 237: 57-68.
48. Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C. & Gong, Y. 2016. ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7): 1949-1954.
49. Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y. & Dong, X. 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe*, 11: 587-596.
50. Zheng, Z.L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D.N., Chary, S.N. & Yang, Z. 2002. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(11): 2787-2797.
51. Zhu, X., Chen, J., Xie, Z., Gao, J., Ren, G., Gao, S. & Kuai, B. 2015. Jasmonic acid promotes degreening via MYC2/3/4-and ANAC019/055/072-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes. *The Plant Journal*, 84(3): 597-610.

