2005_191
66464

TÜBİTAK

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

Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu
Agriculture, Forestry & Veterinary Research Grant Group

PATATESDE TUZ KURAKLIK STRESİNE TOLERANSLI TRANSGENİK BİTKİLERİN GELİŞTİRİLMESİ

PROJE NO: TOGTAG-3191

PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ ÖKTEM
PROF. DR. MERAL YÜCEL
YRD.DOÇ. DR. FÜSUN İNCİ EYİDOĞAN
DR. FEYZA SELÇUK
MÜGE SİMİN TANSI

KASIM 2005
ANKARA

ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TOGTAG-3191 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Raporla ilgili bütün deneyler ODTÜ Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Ar-Ge Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Projenin sonuçlandırılmasında emeği geçen tüm araştırmacılara, kritikleri ve katkılarından dolayı raportörlere teşekkür ederiz. *P5CS* ve *sto* genlerinin klonlanması esnasındaki katkılarından dolay Macaristan Biyolojik Araştırma Merkezinden Dr. Laszlo Szabados'a teşekkür ederiz.

TÜBİTAK-TOGTAG grubuna desteklerinden dolayı şükranlarımızı sunarız.

Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem
ODTÜ Biyoloji Bölümü
Proje Yöneticisi

Kasım 2005
Ankara

İÇİNDEKİLER

Tabloların Listesi	1
Şekillerin Listesi	2
Özet	2
Abstract	4
Proje Ana Metni	5
Giriş	5
Genel Bilgiler	5
Ozmotik Stres	6
Ozmokoruyucular ve Prolin	12
Ca^{+2} ve STO	18
Amaç	20
Gereç ve Yöntem	21
Patates Ana Kültürünün Kurulması	21
P5CS Geni İçin Yapılan Çalışmalar	21
STO Geni İçin Yapılan Çalışmalar	24
Bulgular ve Tartışma	25
Patates Ana Kültürünün Kurulması	25
P5CS Geni İçin Yapılan Çalışmalar	26
STO Geni İçin Yapılan Çalışmalar	37
Sonuç	41
Referanslar	42
Ek1	47
Ek2	48

TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 1. Ozmotik streste prolin akümülasyonu
Tablo 2. P5CS geni için PZR koşulları
Tablo 3. Eksplantlarda kallus oluşturma yüzdeleri
Tablo 4. Kalluslarda gövde oluşturma yüzdeleri
Tablo 5. Gövde oluşumu ve transformasyon verimi
Tablo 6. Eksplantlatda kallus oluşturma yüzdeleri

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1. Bitkilerin ozmotik strese tepkileri
Şekil 2. Ozmotik strese karşı moleküler tepkiler
Şekil 3. Bitkilerde prolin Biyosentezi
Şekil 4. Patates ana kültürünün kurulması
Şekil 5. Agrobacterium hücreleri ile yapılan PZR sonuçları
Şekil 6. Bitkilerde kallus oluşumu
Şekil 7. Kalluslarda gövde oluşumu
Şekil 8. Rejenere olan gövdelerde kök oluşumu
Şekil 9. Transgenik hatlarda prolin akümülasyonu
Şekil 10. Transgenik hatların PZR sonuçları
Şekil 11. Tuzlu ortamda büyütülmüş bitkiler
Şekil 12. Transgenik hatların farklı tuz içerem ortamlarda gövde uzunlukları
Şekil 13. Transgenik hatların farklı tuz içeren ortamlarda prolin akümülasyonu
Şekil 14. Transgenik hatların farklı tuz içeren ortamlarda MDA akümülasyonu
Şekil 15. Transgenik bitkilerin 200 mM NaCl içeren ortamlarda büyüme performansı
Şekil 16. Eksplantlarda kallus oluşumu
Şekil 17. Nekroz gözlenen eksplantlar
Şekil 18. Russet cinsi patatesler

ÖZET

Bitkiler üretimi ve büyümeyi engelleyen çeşitli çevresel faktörlere maruz kalırlar. Bu çevresel stresler içinde, kuraklık ve tuzluluktan kaynaklanan ozmotik stres en ciddi problemlerden biridir. Yürütülen çalışmanın amacı gen teknolojisi yöntemleri kullanılarak tuz ve kuraklık stresine toleranslı patates bitkilerinin geliştirilmesidir.

Bu amaçla bitkilerde sentezlenen ozmokoruyuculardan biri olan prolinin akümülasyonunu arttırmak için biyosentez yolundaki anahtar enzim olan P5CS'yi kodlayan genin patatese transferi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında transformasyon ve analiz çalışmalarında kullanılmak üzere Ausonia cinsi patateslerden ana kültür kurulmuştur. P5CS genini taşıyan iki farklı plasmid vektörü *E.coli* hücrelerinde amplifiye edilmiş, elektroporasyon ile *A.tumefaciens* hücrelerine aktarılmış, ve bu *A.tumefaciens* hücreleriyle transformasyon rejenerasyon çalışmalarına başlanmıştır. Elde edilen 88 hat transgenik bitkiden prolini en fazla akümüle eden 10 hat bitki seçilmiş, bu bitkiler ile moleküler ve biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonunda tüm bitkilerin kontrol bitkilere oranla tuz stressine daha toleranslı oldukları gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular, patatesde prolin biyosentezinin genetik manipülasyonlar yolu ile arttırılmasının, osmotik stres toleransı iyileştirilmiş bitkilerin geliştirilmesinde kullanılabileceği yönündedir.

Anahtar kelimeler: patates, ozmotik stres, tuz stresi, kuraklık, prolin, P5CS, STO

ABSTRACT

Plants are subjected to various environmental factors that limit productivity and inhibit growth. Among these environmental stresses osmotic stress resulting from drought and salinity is one of the most serious ones. The aim of this study is to develop transgenic potato plants tolerant to drought and salinity.

To achieve this aim the gene encoding P5CS, which is the rate limiting enzyme in proline biosynthesis, was transferred to potato plants to increase proline accumulation.

In the first period of the study potato mother culture was established from cultivar Ausonia to be used in transformation studies and biochemical analysis. Two plasmid vectors carrying P5CS gene were amplified in *E.coli*, transferred to *A.tumefaciens* via electroporation, and these *A.tumefaciens* cells were used for transformation regeneration studies. Of 88 transgenic lines obtained, 10 were selected to be highest proline accumulators, and those lines were used to perform physiological and biochemical analysis. Those analyses clearly demonstrated that those transgenic lines were significantly tolerant to salt stress compared to wild type plants.

Our results demonstrate that increased proline biosynthesis in potato via genetic manipulation might be an effective strategy to develop osmotic stress tolerant plants.

Key words: potato, osmotic stress, salt stress, drought stress, proline, P5CS, STO

GİRİŞ

Bitkiler üretimi ve büyümeyi engelleyen çeşitli çevresel faktörlere maruz kalırlar. Her çevresel faktör bitkinin dışında yaşayabileceği minimum ve maksimum değerlere sahiptir. Bu değişik çevre koşulları her yıl besin ve saklama kalitesinin düşmesinden sorumludur.

Bu çevresel stresler içinde, kuraklık ve tuzluluktan kaynaklanan ozmotik stres en ciddi problemlerden biridir. Bu koşullarda bitkilerin hücre içi su dengesi bozulmaktadır. Bitkilerdeki su yetersizliği kaybolan suyun topraktan sağlanamamasıdır. Uzun süreli su kayıplarından hücrenin bütün metabolik süreçleri etkilenir ve genellikle bitkinin üretiminde ve büyümesinde önemli sorunlara yol açar (Bohnert ve ark., 1995).

Yürütülen çalışmanın amacı gen teknolojisi yöntemleri kullanılarak tuz ve kuraklık stresine toleranslı patates bitkilerinin geliştirilmesidir.

GENEL BİLGİLER

Patates dünyada tarım ürünleri arasında, buğday, pirinç ve mısırdan sonra 327 milyon tonluk üretimle dördüncü sıradadır (FAO, 2004) ve dünya ülkelerinin % 80'inde üretilmektedir. Patatesin yıllık tüketimi gelişmiş ülkelerde kişibaşı ortalama 55 kg iken gelişmekte olan ülkelerde kişibaşı tüketim ortalama 11 kg olarak saptanmıştır (Fabeiro ve ark., 2001). Türkiye'de yıllık patates üretimi 4.8 milyon tondur (FAO, 2004).

Bitkiler sürekli olarak gelişmelerini, büyümelerini ve üretkenliklerini etkileyen çevresel uyarılara maruz kalırlar. Türlere has seviyelerde bu uyarılar strese sebep olabilirler. Bitkiler için stres büyüme ve gelişmeyi engelleyen, üretkenliği düşüren, ve artması halinde nekroza sebep olan faktörler olarak tanımlanır.

Çevresel stresler iki ana gruba ayrılabilir; biyotik stresler ve abiyotik (fizikokimyasal) stresler. Biyotik stresler arasında başka organizmalarla rekabet yada enfeksiyon durumları bulunur. Abiyotik stresler arasında ise ışık (yüksek yada düşük şiddetli), ısı (sıcaklık yada soğuk), su (kıtlık yada fazlası), radyasyon (UV, IR), kimyasallar (tuzlar, iyonlar, ağır metaller, herbisitler) ve mekanik faktörler bulunur.

Farklı bitkilerin stres toleransı için farklı eşik değerleri olsa da, bazı bitki türleri ciddi stres koşullarını başarıyla tolere ederken tarım bitkilerinin çoğu stres koşullarına hassastır ve özellikle uzun süreli stres koşullarında verim düşüklüğü gösterir yada ölürler. Önemli tarım ürünlerinin üçte ikisinin uygun olmayan büyüme şartlarından dolayı kaybedildiği tahmin edilmektedir (Bajaj ve ark., 1999).

Ozmotik Stres

Çevresel stres faktörlerinin pek çok çeşidi bulunmaktadır. Ancak sık rastlanan stres faktörlerinin ortak etkisi bitkinin su statüsü üzerindedir. Kuraklık, tuzluluk ve buzlanma koşullarından kaynaklanan dehidrasyon direk ozmotik strese sebep olurken, don ve hipoksiya su emilimi yada su kaybı üstündeki etkileriyle dolaylı olarak ozmotik strese neden olur. Ozmotik stres bitkinin normal büyümesi ve hayat döngüsünü tamamlayabilmesi için gereken suyun olmaması olarak tanımlanır (Cabuslay ve ark., 2002; Bohnert ve ark., 1995).

Kuraklık ve yüksek tuzluluk bitkilerin veriminde en ciddi hasarı oluşturan koşullardır (Ward ve ark., 2003).

Kültür bitkileri tuza çok hassastır; hayvan sıvılarında bulunan 0.15 M tuz konsantrasyonu pek çok kültür bitkisi için toksiktir. Günümüzde tuzlanma 20 milyon hektardan fazla alanda verimli tarımı kısıtlamaktadır. Bu nedenle stres koşullarına dirençli bitkilerin geliştirilmesi bitki

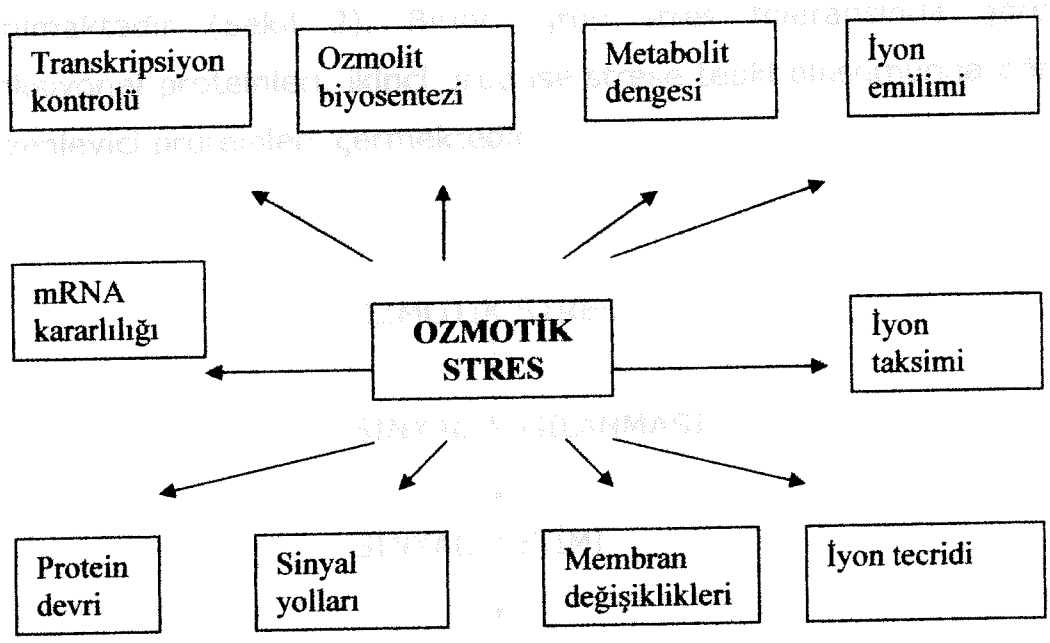
biyoteknolojisinin en çok çalışılmakta olan konularının arasında yer almaktadır (Yoshida, 2002;Mansour ve Salama, 2004).

Yüksek tuz koşulları çoğu bitki için köklerde düşen su potansiyeliyle hiperozmotik strese, yükselen Na^+ konsantrasyonuyla da hücresel işlevlere bozulmaya ve zorunlu iyon taşımasında değişikliklere neden olur. Na^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^+ gibi katyonların, Cl^-, $SO4^{-2}$, HCO_3^-, CO_3^{-2}, NO_3^{-2}, gibi anyonların ve B, Sr, Li, Rb, Mo, Al gibi iyonların dengesini bozar (Hu ve Schmidhalter, 1997).

Tuzlanma Türkiye'de özellikle kurak alanlarda ve sulamaya bağlı tarımın yapıldığı bölgelerde ciddi bir sorundur. Patates erken gelişme safhalarında, özellikle stolonlar gelişmeden önce tuza nispeten duyarlıdır (Mass ve Hoffman, 1977).

Dünyada ortalama yağışın 5 mm yada daha düşük olduğu yerler vardır. Su miktarı seneden seneye değişirken global ısınma nedeniyle gittikçe azalmaktadır. Bitkilerin kuraklık koşullarındaki verimi toplam mevcut su miktarına ve bitkilerin suyu kullanma verimine bağlıdır. Patates yaz aylarında sulanmaya ihtiyaç duyarken özellikle çiçeklenme aşamasında bu ihtiyaç artmaktadır.

Bitkilerin ozmotik strese hassasiyeti ve tepkisi farklılık gösterse de bütün bitkilerde stresin algılanması, iletilmesi ve strese karşı tepki oluşması için genetik kapasitenin bulunduğu kabul edilmektedir. Ozmotik strese karşı temel tepkiler tüm bitkilerde aynıdır. Bu tepkiler Şekil 1 de özetlenmiştir.

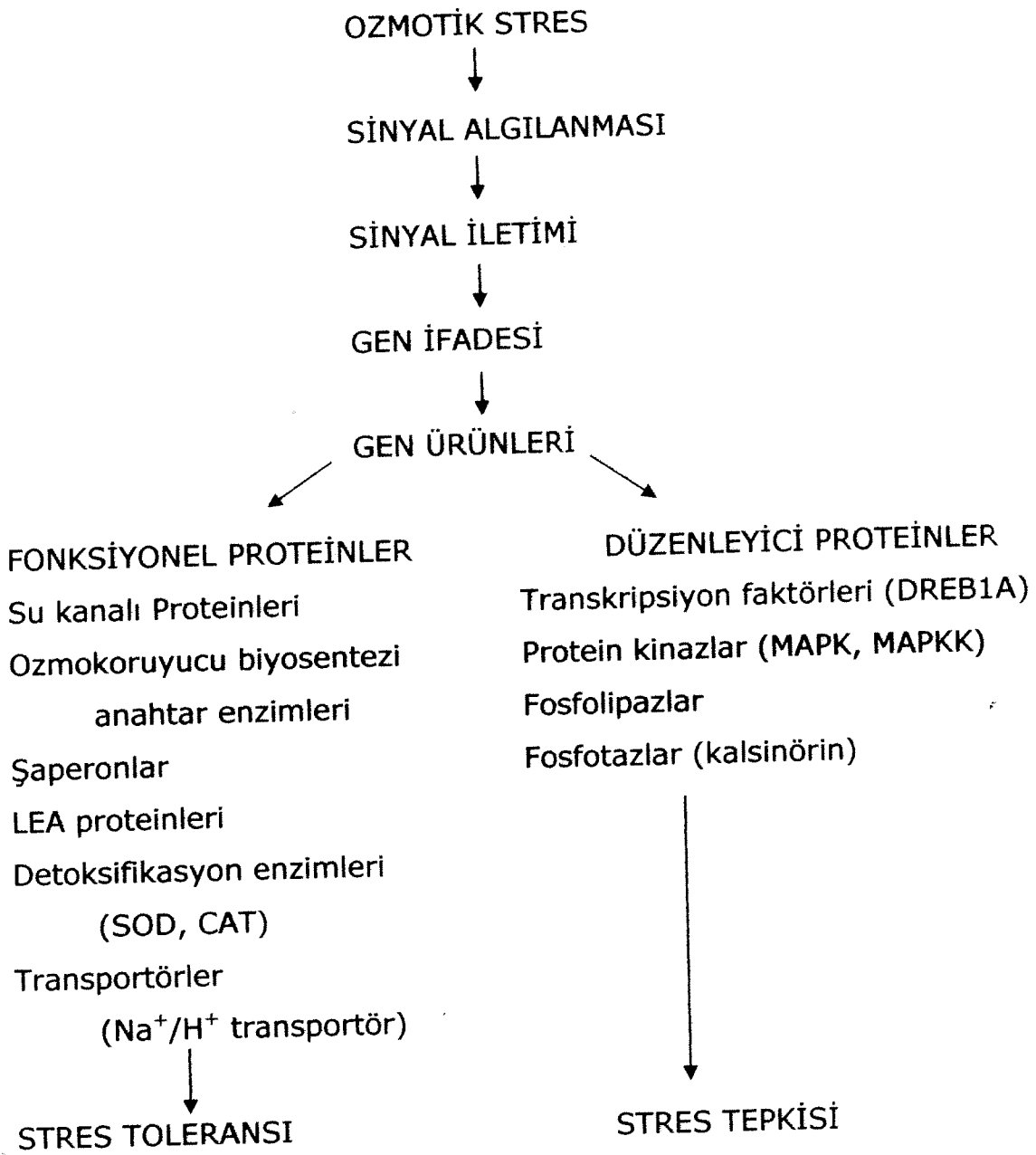


Şekil 1. Bitkilerin ozmotik strese tepkileri

Spesifik genlerin strese hassas ve strese toleranslı bitkiler arasında farklı ifade edilmesi toleransın genetik kodlanmış mekanizmalar tarafından sağlandığını göstermektedir. Bu genler önemli metabolik proteinlerin üretimiyle bitkileri tuz dirençliliğine karşı korurken strese tepki için sinyal iletimini de düzenler.

Hücresel su yetersizliği hücresel seviyede turgor basıncının düşmesine sebep olur. Su stresine moleküler düzeydeki tepkilerin esas tetikleyicisi plazma membranındaki ozmotik potansiyeldeki bir değişiklik olabilir. Hücresel su yetersizliğinin algılanması muhtemelen biyokimyasal, metabolik ve fizyolojik stres adaptasyonlarına sebep olmaktadır (Bajaj ve ark., 1999).

Ozmotik strese tepki olarak ifade edilen genlerin ürünleri iki ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 2). Birinci grup stres toleransında görev alan fonksiyonel proteinleri, ikinci grup ise strese tepki oluşumunda görev alan düzenleyici proteinleri içermektedir.



Şekil 2. Ozmotik strese karşı moleküler tepkiler

Birinci gruptaki genler ve ürünleri ozmotik stres toleransında görev alırlar ve şöyle özetlenebilirler:

a) Su kanalı proteinleri (akuaporinler) membrandan su geçişinde rol alırlar. Stresten korunmak için önemli mekanizmalardan biri su geçirgenliğinin düzenlenmesidir. Halofitik bitkilerden tuz stresinde ifade seviyesi değişen *Mip* genleri izole edilmiştir. MIP proteinleri bitki ve hayvan akuaporinlerine homologdur (Bohnert ve ark, 1995).
b) Prolin, şekerler, glisin-betain, sorbitol, gibi bazı ozmokoruyucuların anahtar enzimleri grup I genlerinden sentezlenir. Hassas ve toleranslı bitkileri birbirinden ayıran en açık fark, toleranslı bitkilerde osmoprotektanların yüksek akümülasyonudur. Hassas türlerde osmoprotektan akümülasyonu çok daha kısıtlıdır (Bohnert ve Jensen, 1996).
c) Makromolekülleri ve membranları koruyan proteinler arasında LEA proteinleri, ozmotin, dehidrinler, antifriz proteinleri, şaperonlar ve mRNAya bağlanan proteinler görev almaktadır. Su yetersizliği durumunda bu proteinlerin ifadesi sıklıkla artmaktadır (Bohnert ve Jensen, 1996).
d) Tiol proteaz ve Clp proteaz gibi proteazlar grup I genlerinden üretilmektedir. Bu proteazlar ozmotik stres sırasında protein devrinin sağlanmasında önemlidir.
e) SOD, katalaz, APX gibi detoksifikasyon enzimleri bitkinin hidroksil radikallerini temizlemesi için önemlidir. Bitkilerin kötü çevresel koşullardan zarar görmesinin sebeplerinden biri süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi toksik moleküllerdir. Çalışmalar çeşitli stres koşulları altında *Sod*, *Cat*, ve *Apx* mRNA düzeylerinde hızlı yükselişler olduğunu kanıtlamıştır (Inze ve Montagu, 1995).
f) İyon emilimi ve taksimi kurak ve tuzlu ortamlarda hayati rol oynamaktadır. Bunun sebebi her iki stres türünün de iyon homeostazında bozulmaya sebep olmasıdır (Bohnert ve ark., 1995).

İkinci grup genler strese tepkide ve sinyal iletimi ile gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alırlar. Bunlar şöyledir:

a) MAPK, MAPKK, MAPKKK, CDPK gibi protein kinazlar
b) DREB1A, DREB1B gibi transkripsiyon faktörleri
c) Fozfolipazlar; örneğin fozfolipaz C
d) Kalsinörin gibi fosfotaslar

Ozmotik strese toleranslı bitkilerin geliştirilmesi için mevcut yöntemler şunlardır:

1) Oksidatif stresle alakalı genler: Hidroksil radikallerinin temizlenmesi aracılığıyla protein komplekslerinin ve membran yapılarının stabile edilmesiyle hassas metabolik reaksiyonların korunması ozmotik stres toleransı için önemli bir stratejidir. Inze ve Montagu'ya göre (1995), bitkilerin kötü çevresel koşullardan zarar görme sebeplerinin başında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi bulunmaktadır. Reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonu yada protein ve nükleik asit modifikasyonları ile hasara neden olur.

2) Ozmokoruyucu biyosentezindeki anahtar enzimler: Pek çok bitki ozmotik strese karşı osmoprotektan akümüle ettiğinden transgenik bitkilerde metabolizma mühendisliği yoluyla ozmokoruyucu miktarının arttırılması tolerans için ümit vaat edici stratejilerden biridir. Mannitol, prolin, trehaloz, ve glisin-betain üretiminde rol alan anahtar enzimlerle transforme edilmiş bitkiler ozmotik strese tolerans göstermiştir (Bajaj ve ark., 1999).

3) LEA Proteinleri: LEA proteinleri normal şartlarda embryogenez sonunda sentezlenmektedir. Hidrofilik olduklarından dolayı bitki hücrelerini ozmotik stres sırasında hasardan korurlar.

4) Düzenleyici Genler: Bu genlerin ürünleri gen ifadesini ve sinyal iletimini düzenlediklerinden, transgenik bitkilerde bu genlerin ifadesi pek çok stres tolerans genini simultane aktive edebilir.

5) İyon Homeostas Proteinleri: Tuz stresi varlığında potasyum kanallarından sodyumun geçmesi nedeniyle iyon dengeleri bozulmaktadır. Sitozolde yüksek K^+/Na^+ oranının tutulabilmesi tuzlu ortamda bitkilerin büyüyebilmesi için zorunluluktur.

6) Hormon Düzenleyici Genler: Bitki hormonu ABA ozmotik stres varlığında sinyal iletiminde rol almaktadır.

Ozmokoruyucular ve Prolin

Ozmotik stresle mücadele etmek için pek çok organizmada ozmokoruyucu sentezi ve akümülasyonu gözlenmektedir. Bu, ozmotik basıncı arttırmak ve turgoru sabit tutup su emilimini sürdürebilmek için yapılan bütün tepkilerden biridir. Bazı amino asitler (prolin, alanin, vs), bazı karbonhidratlar (trehaloz, gliserol, mannitol vs) ve poliaminler (spermin) ozmokoruyucu olarak görev alır. Herhangi bir metabolitin akümülasyonunun taksonomik gruplara özgü olmaması, ozmokoruyucu akümülasyonunun evrimsel olarak eski bir özellik olduğunu göstermektedir (Bohnert ve ark., 1995).

Ozmokoruyucular nötral pH'da yüksüzdürler. Hidrofilikdirler, bu da protein, protein kompleksleri ve membranların yüzeylerinde su tutabileceklerini göstermektedir. Bu sebeple ozmokoruyucular membranların ve proteinlerin dağılmasını engeller ve onları stabilize eder. *İn vitro* deneylerde, ozmokoruyucuların yüksek konsantrasyonlarda iyonların enzim aktivitesini inhibe etmesini engellediği gösterilmiştir (Solomon ve ark., 1994). Buna ek olarak ozmokoruyucular enzimlerin termal

stabilitesini arttırmaktadır (Paleg ve ark., 1981). Ozmokoruyucular ayrıca oksijen radikallerinin temizlenmesinde de rol alır (Bohnert ve Shan, 1998).

Prolin, ozmotik strese maruz kalan bitkilerde, özellikle tuz ve kuraklık streslerinde, hayati bir rol oynar. Öbakteri, protozoa, algler ve deniz omurgasızları dahil olmak üzere pek çok organizmada ozmokoruyucu olarak görev alır. Ozmotik stres sırasında farklı organizmalarda prolin akümülasyonu Tablo 1 de özetlenmiştir. Bitkilerde prolinin rolü ozmokoruyucu olmakla sınırlı değildir. Prolin stres sonrası enerji ve azot kaynağı olarak da görev almaktadır. Mitokondride prolin degredasyonu direk olarak elecktron taşıma sistemi ve ATP üretimine bağlıdır (Samaras ve ark., 1995). Prolin ayrıca hidroksil radikallerini temizler (Smirnoff ve Cumbes, 1989), ve fosfolipidlerle etkileşerek membranları korur (Rudolph ve ark., 1986). Buna ek olarak prolin hücresel redoks potansiyelini tamponlar (Hare ve ark., 1998) ve stres sinyali olarak görev alır (Santarius, 1992).

Tablo 1. Ozmotik streste prolin akümülasyonu

Tür	Prolin artış misli	Stres koşulu
Algae		
Sticococcus bacillaris	140	1234 mosmol kg^{-1}
Çift çenekliler		
Mesembryanhemum nodiflorum hücre süspansiyon kültürü	7	400 mM NaCl
Nicotiana tabaccum hücre süspansiyon kültürü	4.4	428 mM NaCl
Nicotiana sylvestris hücre süspansiyon kültürü	46	150 mM NaCl
Nicotiana tabacum yaprakları	20	200 mM NaCl
Spinaca oleracea	11	-2 mPa
Solanum tuberosum hücre süspansiyon kültürü	9	10 % PEG
Lycopersicon esculentum hücre süspansiyon kültürü	319	25 % PEG
Heliantus tuberosum yumru dokusu	10.6	1.0 M sorbitol
Arabidopsis thaliana	8	120 mM NaCl
Medicago sativa kökü	8	150 mM NaCl
Vicia faba	9	2 gün kuraklık
Glycine max yaprağı	11	200 mM NaCl
Tek çenekliler		
Triticum aestivum apeks ve yaprakları	195.4	-3.6 mPa
Hordeum Vulgare	3	-1.5 mPa
Oryza sativa	4	50 mM KCl

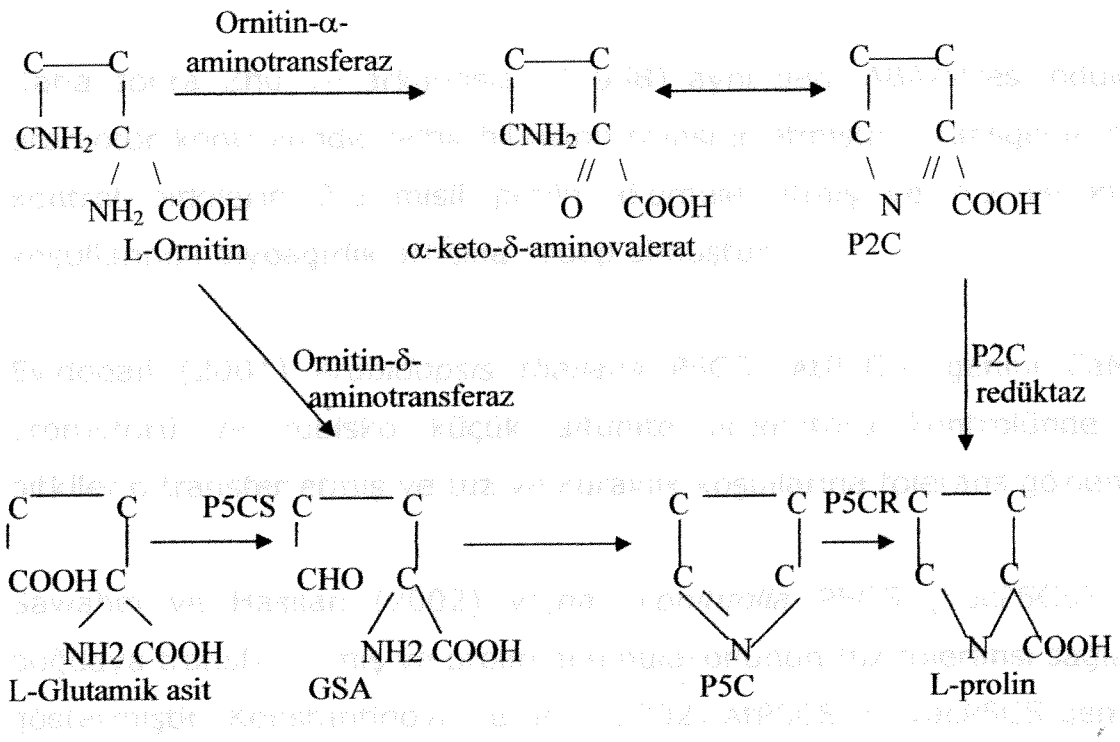
Bitkilerde prolinin rolü ozmokoruyucu olmakla sınırlı değildir. Prolin stres sonrası enerji ve azot kaynağı olarak da görev almaktadır. Mitokondride prolin degredasyonu direk olarak elecktron taşıma sistemi ve ATP üretimine bağlıdır (Samaras ve ark., 1995). Prolin ayrıca hidroksil radikallerini temizler (Smirnoff ve Cumbes, 1989), ve fosfolipidlerle etkileşerek membranları korur (Rudolph ve ark., 1986). Buna ek olarak prolin hücresel redoks potansiyelini tamponlar (Hare ve ark., 1998) ve stres sinyali olarak görev alır (Santarius, 1992).

Bitkilerde prolin glutamat yada ornitinden başlayan iki alternatif yol ile sentezlenir (Şekil 3). ^{14}C ile işaretlenmiş yapıtaşları kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* işaretleme deneyleri (Boggess ve ark., 1976; Morris ve ark., 1969), [^{13}C] ile işaretlenmiş glutamat (Heyser ve ark., 1989) ve $^{15}NH_4/^{15}NO_3^-$ (Rhodes ve Handa, 1989; Rhodes ve ark., 1986) ozmotik stres esnasındaki prolin akümülasyonunda glutamaltla başlayan biyosentez yolunun kullanıldığını ve ozmotik stresin prolin biyosentez hızında artışa sebep olduğunu göstermiştir (Rhodes ve ark., 1986). Glutamatla başlayan sentez yolunun ilk enzimi olan Δ^1-pirolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS), anahtar enzimdir. Prolin biyosentezi P5CS enziminin geribesleme inhibisyonu ile düzenlenmektedir (Zhang ve ark., 1995).

Stres koşullarındaki bitkilerde prolin konsantrasyonundaki artış temel olarak prolin biyosentezinin artmasına bağlıdır. Tuzla indüklenen prolin sentezi hızlı değildir, prolin sentezi sadece hücre hasarı oluşunca başlar (Hanson ve ark., 1977; Delauney ve Verma, 1993).

Ozmotik strese tepki olarak akümüle edilen prolinin biyosentezi glutamatla başlar. Ozmotik stres prolin biyosentez hızını arttırır (Boggess ve ark., 1976; Stewart, 1981; Rhodes ve ark., 1986; Rhodes ve Handa, 1989). P5CS enziminin geni bitkilerde su yetersizliği ile indüklenir (Yoshiba ve

ark., 1995), ve bu enzim prolin biyosentezindeki anahtar enzimdir (Delauney ve Verma, 1993). Buna ek olarak prolin akümülasyonu mitokondrial bir enzim olan prolin dehidrogenaz ile de kontrol edilmektedir. Bu enzimin aktivitesinin tuz stresi esnasında azaldığı gösterilmiştir (Stewart ve ark., 1977). Ozmotik stres koşullarında prolin akümülasyonu, prolinin protein biyosentezinde az kullanımına ve artan protein devrine de kısmen bağlı olabilir. (Boggess ve Stewart, 1981).



Şekil 3. Bitkilerde prolin biyosentezi

Prolin akümülasyonunun bitkilerde kuraklık ve tuz stresine bağlı olduğu ve temel olarak *de novo* sentezden kaynaklandığı gösterilmiştir (Delauney ve Verma, 1993). Prolin bir ozmokoruyucu olduğundan, genetik mühendisliği ile elde edilmiş prolini fazla üreten bitkilerin ozmotolerans kazanacağı düşünülmektedir (Kishor ve ark., 1995). Prolin akümülasyonunun artması

ile ozmotolerans sağlama denemeleri biyosentez anahtar enzimi P5CS ve degredasyon anahtar enzimi PDH üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Yapılan ilk çalışma mothbean P5CS geninin tütün bitkisine transferidir (Kishor ve ark., 1995). Transgenik bitkiler kontrol bitkilere göre daha fazla enzim üretmiş ve 10-18 kat daha çok prolin sentezlemiştir. Prolin fazla üretimi kuraklık koşullarında kök biyoağırlığını ve çiçek gelişimini arttırmıştır.

Daha sonra Zhu ve arkadaşları (1998) aynı geni ABA/stres indüklenen promotör kontrolünde çeltik bitkisine transfer etmiştir. Transgenik bitkiler kontrol bitkilerin 2.5 misli prolin akümüle etmiş ve tuz ve kuraklık koşullarında biyoağırlık artışına sebep olmuştur.

Eyidoğan (2001) *Arabidopsis thaliana* P5CS (AtP5CS) genini CaMV35S promotörü ve rubisko küçük altünite promotörü kontrolünde tütün bitkilerin transfer etmiş ve tuz ve kuraklık koşullarına tolerans gözlemiştir.

Sawahel ve Hassan (2002) *Vigna aconitifolia* P5CS (VacP5CS) genini buğdaya transfer etmiş ve prolin akümülayonunun tuz toleransı sağladığını göstermiştir. Konstantinova ve ark. (2002) AtP5CS ve VacP5CS genleri ile tütünü transforme etmiş ve soğuğa karşı tolerans gözlemiştir.

Alternatif bir yaklaşım olarak Nanjo ve arkadaşları (1999) antisens cDNA transformasyonu ile PDH ifadesini düşürmüştür. Transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde prolin değerleri kontrol bitkilerin normal koşullarda iki misli, tuz koşullarında ise üç misli olmuştur. Transgenik bitkiler yüksek tuz toleransı göstermiştir. Mani ve arkadaşları (2002) antisens AtPDH geni kullanarak *Arabidopsis* bitkilerini transforme etmiş ve %25 prolin artışı gözlemiştir.

Ca^{+2} ve STO

Stres sinyallerinin çeşitliliği göz önünde tutulduğunda pek çok farklı algılayıcı olduğu düşünülmektedir. Ancak böyle bir algılayıcı henüz belirlenememiştir. Bir stres koşulu farklı zamanlarda, farklı yerlerde, farklı sonuçlar doğuracak şekilde birden fazla mekanizmayı aktive edebilmektedir. Bu bilgiler ışığında sinyal iletim yollarının birbirleri ile etkiletişim halinde oldukları yada bağlantı kurdukları, aynı elemanları kullanarak bir ağ oluşturdukları kabul edilmektedir.

Düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz streslerine karşı erken tepkilerden biri sitoplazmik Ca^{+2} değerlerinde geçici bir artıştır (Knight, 2000; Sanders ve ark., 1999). Kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler kendi başına sinyal olarak görev alabilse de ek düzenleme kalsiyum bağlanan proteinler tarafından yapılır. Bu proteinler arasında kalmodülin, ve kalsiyum ile düzenlenen protein kinazlar ve fosfatazlar bulunmaktadır.

Kalsiyum ile düzenlenen protein kinazları bitkilere özgüdür ve kalsiyum sinyalinin iletilmesinde rol aldığı düşünülen en muhtemel adaylardır. Kalmodülin ökaryotlarda bulunan ve Ca^{+2} ye bağlanan bir proteindir. Kalsiyuma bağlanması halinde konformasyonel değişiklik geçirir ve enzimler, transkripsiyon faktörleri, iskelet proteinleri, ve membran transportörlerinin aktivitesini düzenler.

Kalsinörin Ca^{+2} ve kalmodüline bağlı bir protein fosfatazdır ve Na^{+}, K^{+}, ve Ca^{+2} homeostazını sağlar. Kalsinörinin olmadığı maya mutantları Na^{+} ve Li^{+} iyonlarına duyarlıdır. Bu da söz konusu katyonlara tolerans için kalsinörinin düzenleyici bir molekül olarak görev aldığının göstergesidir (Nakamura ve ark., 1993; Mendoza ve ark., 1994; Haro ve ark., 1991). Ayrıca kalsinörin Na^{+} ve Ca^{+2}-ATPazları ve hücre duvarı β-1,3, glucan sentaz geninin indüklenmesini sağlar (Matheos ve ark., 1997).

1996 yılında Lippuner'in araştırma grubu tuza duyarlı kalsinörin mutantı mayalar ve *Arabidopsis* cDNAlarından oluşan bir maya-*Escherichia coli* mekik vektörü kullanarak bu mayalarda tuz tolaransı sağlayan *Arabidopsis* cDNA klonlarını bulmuştur. Bu yöntem iki genin keşfedilmesini sağlamıştır; *sto* ve *stz* . STO ve STZnin kalsinörine dizilim benzerliği göstermemesi tuz toleransında kalsinörinin yerine görev almadıklarını göstermektedir. Kalsinörin mutantı mayalarda STO kalsinörin ile düzenlenen tüm fenotiplerin yerine gelmesini sağlarken STZ sadece Na^+ ve Li^+ duyarlılığını ortadan kaldırmıştır. Deneyler STO ve STZnin mutant maya hücrelerinde sadece tuz koşulunda normal mayalardan daha yüksek büyüme sağlanmasına sebep olduğunu göstermiştir.

STO 27.6 kDluk ve 249 amino asitten oluşan hidrofilik bir proteindir. Yapı olarak çiçeklenmede rol alan *Arabidopsis* CONSTANS proteinine benzemektedir. CONSTANS proteininde iki GATA1 benzeri çinko parmak yapısı tekrarı bulunmaktadır ve STO bu yapılar bakımından CONSTANS ile büyük benzerlik göstermektedir (Putterill ve ark., 1995).

Southern Blot analizlerine göre *Arabidopsis*de bir adet *sto* geni bulunmaktadır. NaCl ile muamele edilmiş ve kontrol *Arabidopsis* bitkilerinde Northern Blot analizi *sto* mRNA düzeyinin NaCl koşullarının artmasından etkilenmediği gözlenmiştir (Lippuner ve ark., 1996). *Arabidopsis* bitkisinde ayrıca *sto*-benzeri bir gen, çeltikte ise *sto*-benzeri en az iki gen olduğu bilinmektedir. STO mayalarda ve bitkilerde conzörve edilmiş bir tuz tolerans mekanizması elemanı olabilir (Takatsuji, 1998).

STO, COP1 ile etkileşir . COP1 mayada Ca^{+2} sinyallerini modüle eden muhtemel bir transkripsiyon faktörüdür. Işığa has sinyal yollarında, patojen enfeksiyonunda, hipoksiya ve gelişim programlarında rol alır. Eğer COP1-STO etkileşimi STO degredasyonuna sebep olursa, COP1in kalsiyum

ilişkili transkripsiyonu nasıl modüle ettiği ile ilgili bilgi edinilebilir (Holm ve ark., 2001).

Arabidopsis bitkisinde STZ TFIII-A tipi çinko parmak ailesine aittir. Tuz ile muamele edilen bitkilerde *stz* ifadesi artmaktadır. Dolayısıyla, STZ muhtemelen transkripsiyon regülasyonunda direk rol almaktadır ve tuz toleransında rol oynadığı kanıtlanmış ilk ökaryotik transkripsiyon faktörüdür.

Sto ve *stz* genlerinin ifade edilmesi kalsinörin mutantı ve normal mayalarda tuz toleransını arttırmıştır. Maya ve bitkiler arasında tuz tepkisi ve tuz duyarlı basamaklar benzerlik gösterdiğinden Lippuner ve arkadaşları (1996) *sto* ve *stz* genlerinin fazla üretiminin bitkilerde tuz tolaransını arttırmak için muhtemel bir yöntem olduğunu söylemektedir.

Daha sonra, Selçuk (2004) *Arabidopsis sto* genini *Arabidopsis thaliana* ve tütün transformasyonu için klonlamıştır. Transgenik tütün bitkilerinde tuz stresine tolerans gözlenirken transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde herhangi bir avantaj gözlenmemiştir. Ancak *sto* geninin antisens ifadesi *Arabidopsis* bitkilerinin normal koşullarda germinasyonunu düşürmüştür.

Amaç

Bu çalışmanın amacı tuz ve kuraklık stresine toleranslı transgenik patates bitkilerinin geliştirilmesidir. Bu amaçla bitkilerde prolin biyosentezinde anahtar enzim olan P5CS enziminin geni ve kalsiyum sinyal iletim yollarında görevi olduğu düşünülen *sto* geninin transferi ve elde edilen bitkilerin osmotik stres dirençleri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Patates Ana Kültürünün Kurulması

Ausonia cinsi patates yumruları oda sıcaklığında iki ay muhafaza edilmiş, yumrulardan oluşan filizler yüzey sterilizasyonunu takiben MS (Murashige ve Skoog, 1962) bazlı (MS0) (Ek 1) steril ortamlara transfer edilmiş, 24±1 °C sıcaklıkta, 16 saat/8 saat aydınlık/ karanlık ışık döngüsü sağlayan bitki odasında büyümeye bırakılmıştır. Bitkiler dört haftalık düzenli aralıklarla altkültüre alınıp amplifiye edilmiştir.

P5CS Geni İçin Yapılan Çalışmalar

Bakteri Transformasyon Çalışmaları

Plazmid vektörlerinin (Ek 2) amplifikasyonu için competan *E.coli* DH5α hücreleri Inoue ve arkadaşlarının (1990) yöntemiyle hazırlanmıştır. *E.coli* transformasyonu ısı şoku ile gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası bakteriler seçici LB (100 mg/L Kanamisin) ortamlarına ekilmiş, pozitif koloniler seçilmiştir. Bu kolonilerden Nucleospin Plazmid kiti kullanılarak (Macherey Nagel, Almanya) plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidin saf ve bütün olarak elde edildiği agaroz jel elektroporez (%0.6 agaroz jeli, TBE tampon çözeltisi ile hazırlanmış, 70 V akım ile yürütülmüştür) yöntemiyle doğrulanmıştır.

Bitki transformasyonunda kullanılmak üzere seçilmiş olan *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücreleri elektrokompetan hale getirilmiştir. Elektrocompetan hücreler ve 1-2 ng plazmid karıştırılmış, 4° C sıcaklıkta, 6 ms süreyle 16.7 kV/cm elektrik alanı uygulanarak BIORAD Gene Pulser ile elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. Bakteri hücreleri seçici YM (100 mg/L Kanamisin) ortamlarında büyütülüş, pozitif koloniler seçilmiştir. Pozitif kolonilerden direk PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır.

Sıvı ortamda uygun antibiyotikler varlığında (20 mg/L Rifampicin, 100 mg/L Kanamisin) büyütülen *Agrobacterium* hücreleri PZR için DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. 3 µL sıvı kültür, 20 pmol spesifik primer, 0.2 mM dNTP karışımı, 2.5 µL Taq Polimeraz reaksiyon tamponu, 1 µL $MgCl_2$, 2 ünite Taq Polimeraz içeren ana kültür ile karıştırılmış ve toplam hacim 25 µL olacak şekilde dH_2O ile tamamlanmıştır. PZR koşulları Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 2. P5CS geni için PZR koşulları

95 °C	5 dak	
95 °C	1 dak	25 döngü
50 °C	45 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	5 dak	

PZR sonuçları TBE ile hazırlanmış %0.8 agaroz jelde 70 V akım uygulanarak analiz edilmiştir.

Bitki Transformasyon Çalışmaları

Ana kültürdeki patates fidelerin yaprak ve gövde parçacıkları DeBlock'un (1988) yöntemiyle transforme edilmiştir. Uygun antibiyotikler varlığında büyütülen *Agrobacterium* hücreleri OD_{595} 0.6-0.8 arasında olduğunda transformasyon için uygun hale gelmektedir. Dört haftalık fidelerden toplanan yapraklar ortadan ikiye bölünerek, gövdeler ise 1 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak eksplantlar hazırlanmıştır. 10 eksplant 10 mL sıvı MS (Ek1) içeren ortama koyulmuş, 30 µL *Agrobacterium* eklenerek bitki odasında 2 gün süre ile 50 rpm de sallanarak kokaltivasyona bırakılmıştır. Daha sonra eksplantlar 800 mg/L Augmentin içeren sıvı MS içerisinde 3.5-4 saat 100 rpm de sallanarak yıkanmış, kaba filtre üzerinde kurutulmuş ve *Agrobacterium* hücreleri elemine edilmiştir. Eksplantlar

seçici MS4 (Ek1) ortamına transfer edilmiştir. Bitki odasında büyütülen eksplantların ortamları 10 günlük sürelerle tazelenmiştir.

Sistemin seleksiyon ve rejenerasyon potansiyellerini test etmek amacıyla her set transformasyon deneyine (-) ve (+) kontroller eklenmiştir. Kontrol eksplantları diğer eksplantlarla aynı muamelelere maruz bırakılmış, ancak *Agrobacterium* eklenmemiştir. (-) kontrol eksplantlarında 4 hafta içinde nekroz gözlenirken (+) kontrol eksplantlarında transgenik eksplantlarla paralel rejenerasyon olmuştur.

Kallus oluşumunun ardından eksplantlar MS6 (Ek 1) ortamına transfer edilmiş ve 4-6 hafta süre ile kallus gelişimi ve gövde oluşumu için inkübe edilmiştir. Gövde oluşumunun ardından eksplantlar MS8 ortamına transfer edilmiş ve kök gelişimi için bırakılmıştır. Gelişen gövdeler izolasyon için yeterli uzunluğa eriştiğinde kalluslardan ayrılarak seçici MS0 ortamlarında kök oluşumuna bırakılmıştır.

Transgenik Bitkilerin Analizleri

Elde edilen 88 hat transgenik hat bitkide prolin analizi yapılmış (Bates ve ark. 1973), en fazla prolin akümüle eden 10 hat transgenik bitki seçilmiş ve çalışmalara bu hatlarla devam edilmiştir.

Bu 10 hat transgenik bitkide transfer edilen genin varlığını ispatlamak amacıyla DNA izolasyonu yapılmış (Nucleospin Bitki DNA İzolsayon Kiti, Macherey Nagel, Almanya), P5CS geni için PZR (koşullar Tablo 2 de verildiği gibidir) yapılmıştır. PZR için 200-500 ng bitki DNAsı kullanılmıştır. Sonuçlar TBE tamponunda hazırlanmış % 0.8 agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçlar P5CS genini transferini doğrular niteliktedir.

Daha sonra bu transgenik hatlar farklı tuz konsantrasyonları (0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM) içeren MS0 ortamlarına altkültür edilmiş bitkilerin tuz toleransı fizyolojik ve biyokimyasal testler ile analiz edilmiştir.

Sto Geni İçin Yapılan Çalışmalar

Bakteri Transformasyon Çalışmaları

E.coli hücreleri içinde bulunan pPCVB-STO (Ek 2) plazmidinin *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücrelerine transferi için miniprep izolasyonu ile pPCVB-STO plazmidi izole edilmiş, iki farklı yöntem ile saf plazmidin *A.tumefaciens* EHA105 hücrelerine transferi denenmiştir.

İlk olarak Van Haute ve arkadaşlarının (1983) triparental mating yöntemi denenmiştir. İlgili plazmid vektörünü taşıyan *E.coli* suşu, boş *A. tumefaciens* EHA105 suşu, ve yardımcı *E.coli* suşu karıştırılmış, seçici ortamda (100 mg/L Ampisilin) büyütülmüştür. Sistemin kontrolü amacıyla *A. tumefaciens* ve yardımcı *E.coli* suşunun karıştırılmış, seçici olmayan ortama ekilerek (+) kontroller, seçici ortama ekilerek (-) kontroller eklenmiştir. Bu deneylerin sonunda PZR gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra direk transformasyon yönteminin kullanılması hedeflenmiştir. Bu amaçla $CaCl_2$ kullanılarak kompetan *A. tumefaciens* EHA105 hücreleri hazırlanmış, ısı şoku yöntemi ile transformasyon yapılmıştır. Sistemin kontrolü amacıyla eklenen (+) ve (-) kontrollerde büyüme gözlenmiş, 35S promotörüne spesifik primerlerle PZR yapılmıştır.

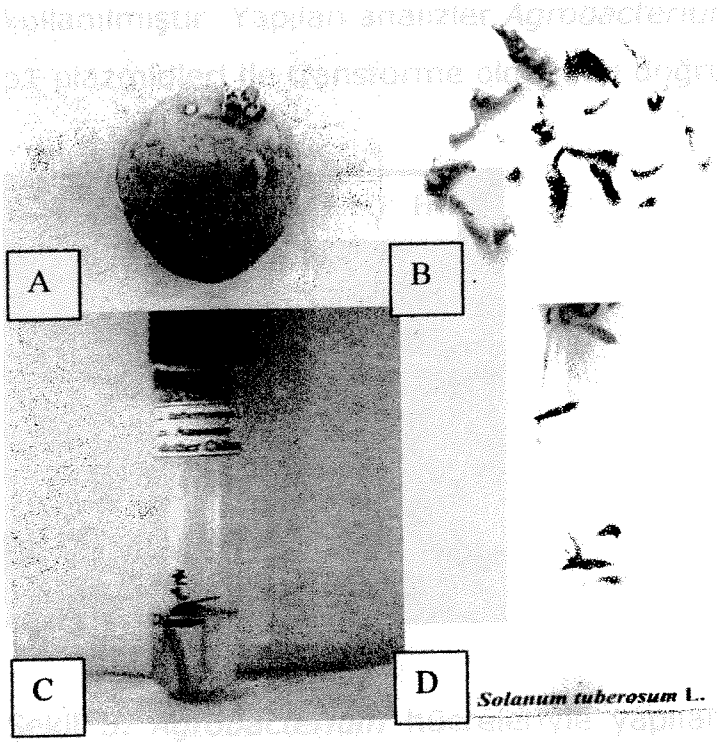
Bitki Transformasyon Çalışmaları

Bitki transformasyon çalışmaları P5CS geni için tarif edildiği gibi yapılmıştır. Bitki seçici markör olarak PPT (2 mg/L) kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Patates Ana Kültürünün Kurulması

Bitki transformasyonu ve stres uygulaması çalışmaları için gerekli materyalin sağlanabilmesi amacıyla patates ana kültürü kurulmuştur. Kültürün kurulması Şekil 4 de gösterilmiştir.

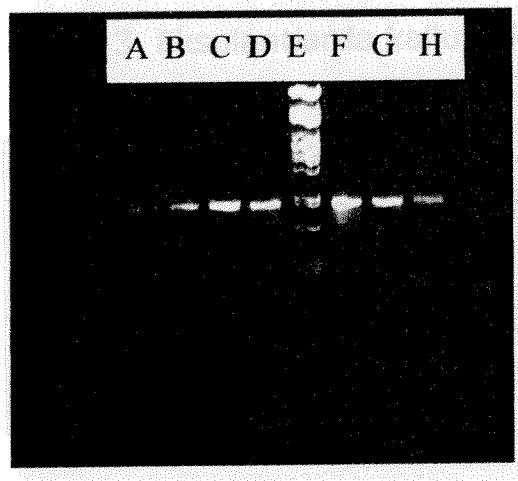


Şekil 4. Patates ana kültürünün kurulması. A- Yumrularda oluşan filizler, B- Yüzey sterilizasyonu için toplanmış filizler, C- MS0 ortamında büyümeye bırakılmış bir filiz, D- Altkültür aşamasında bir patates bitkisi

P5CS Geni İçin Yapılan Çalışmalar

Bakteri Transformasyon Çalışmaları

Elimizde saf olarak bulunan pR2-p1 ve pR8-p1 plazmid vektörleri (Ek 2) önce *E.coli* DH5α hücrelerine aktarılmış, amplifikasyonu takiben plazmid izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu plazmidler *A. tumefaciens* EHA105 hücrelerine aktarılmış ve bakteriler bitki transformasyonu için kullanılmıştır. Yapılan analizler *Agrobacterium* hücrelerinin pR2-p1 ve pR8-p1 plazmidleri ile transforme olduğunu doğrular niteliktedir (Şekil 5).



Şekil 5. *Agrobacterium* hücreleriyle yapılan PZR sonuçları. (A), (B), (C) *A.tumefaciens* EHA105::pR2-p1 bakterisinden PZR sonucu, (D) saf plazmid pR2-p1in PZR sonucu, (E) PstI markörü, (F) saf plazmid pR8-p1in PZR sonucu, (G), (H) *A.tumefaciens* EHA105::pR8-p1 bakterisinin PZR sonucu

Bitki Transformasyon Çalışmaları

Projenin sonraki aşamalarında ilk kısımda elde ettiğimiz *Agrobacterium* suşları kullanılarak bitki transformasyon çalışmaları yapılmıştır. Eksplantlardaki kallus ve gövde oluşumu Şekil 6 ve Şekil 7 de gösterilmiştir. Gövdeler yeterli uzunluğa ulaştıklarında kalluslardan ayrılmış, kök oluşumu için seçici ortamlara alınmıştır (Şekil 8).

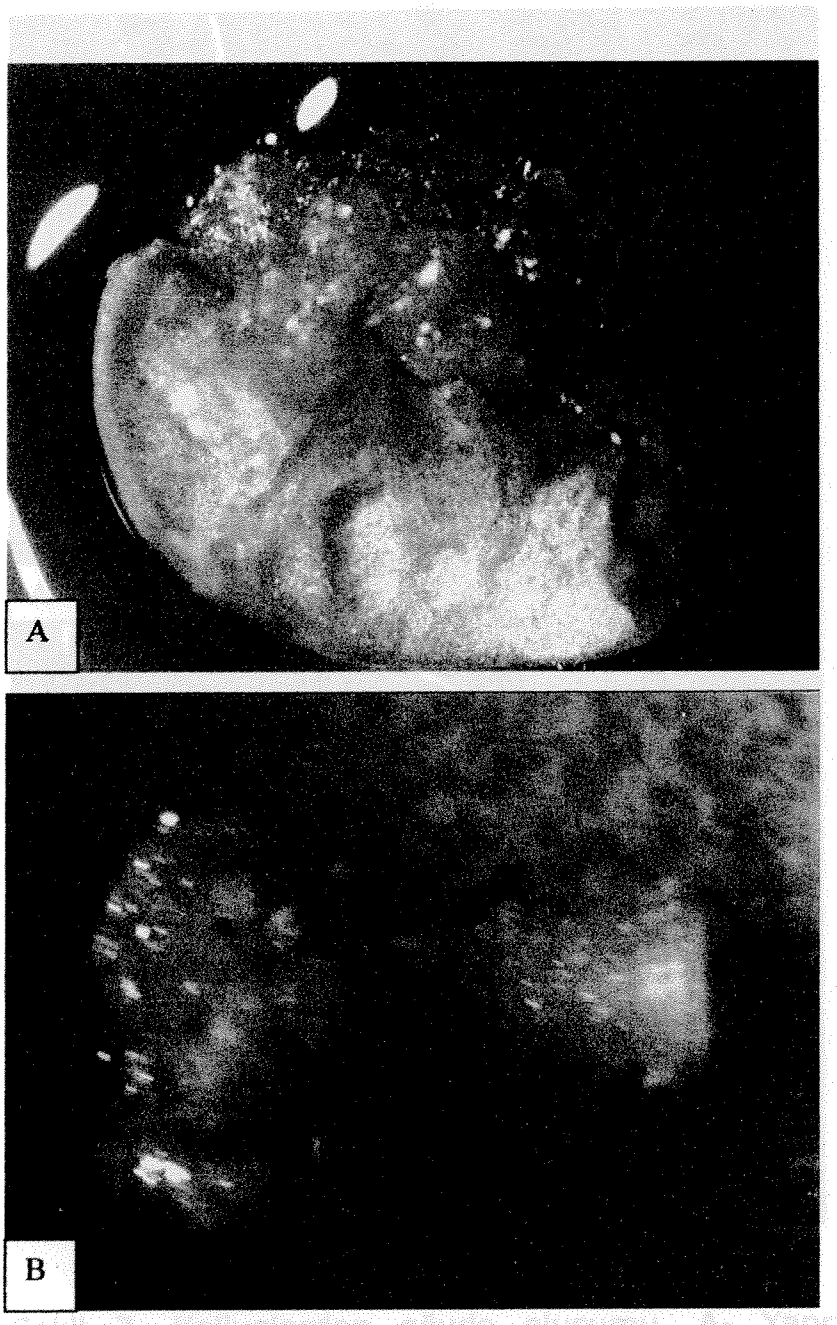
pR2-p1 ve pR8-p1 plazmid vektörleri kullanılarak yapılan transformasyon-rejenerasyon çalışmalarının sonuçları Tablo 3 ve Tablo 4 de verilmiştir.

Tablo 3. Eksplantlarda kallus oluşturma yüzdeleri

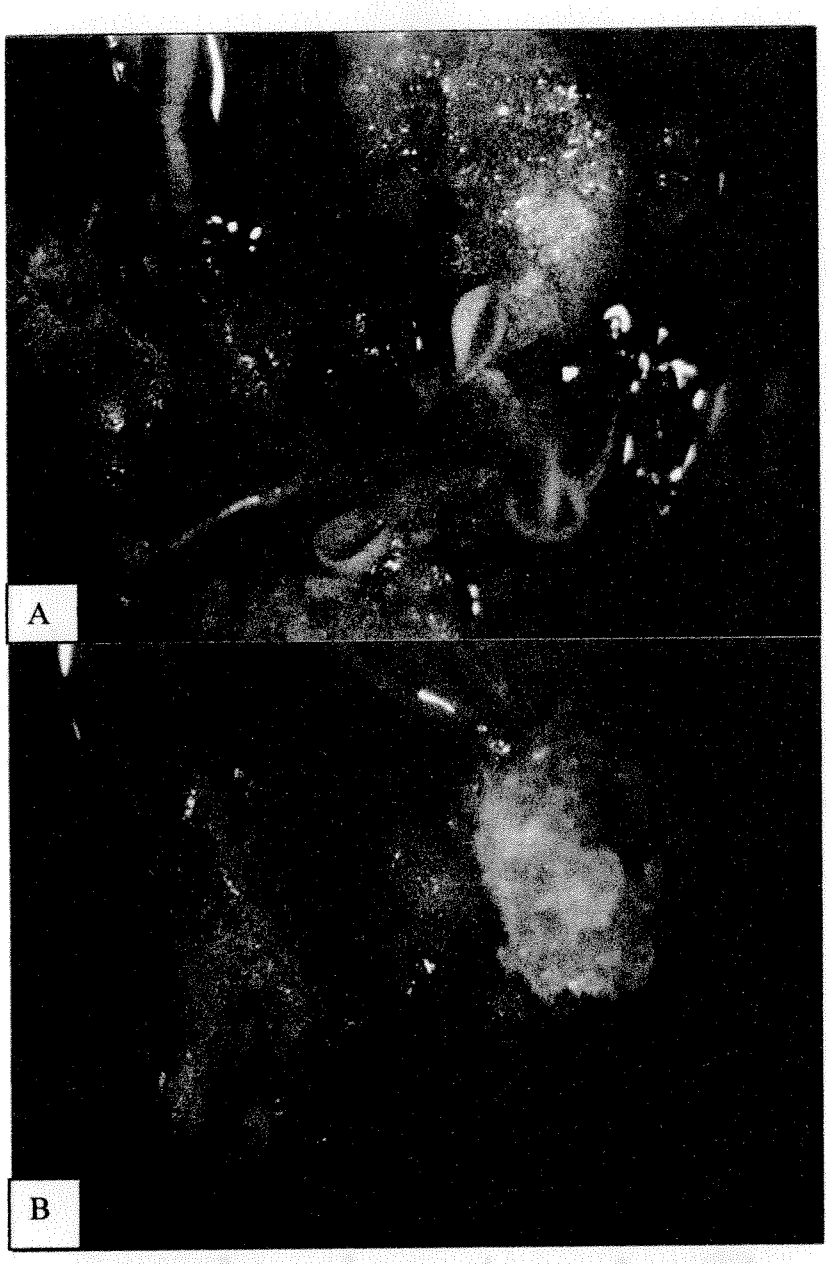
Eksplant tipi	pR2-p1	pR8-p1	(+) kontrol	(-) kontrol
Yaprak parçası	% 48.8	%26.6	%61.1	% 0.0
Gövde parçası	%71.1	% 57.0	% 77.0	% 0.0

Tablo 4. Kalluslarda gövde oluşturma yüzdeleri

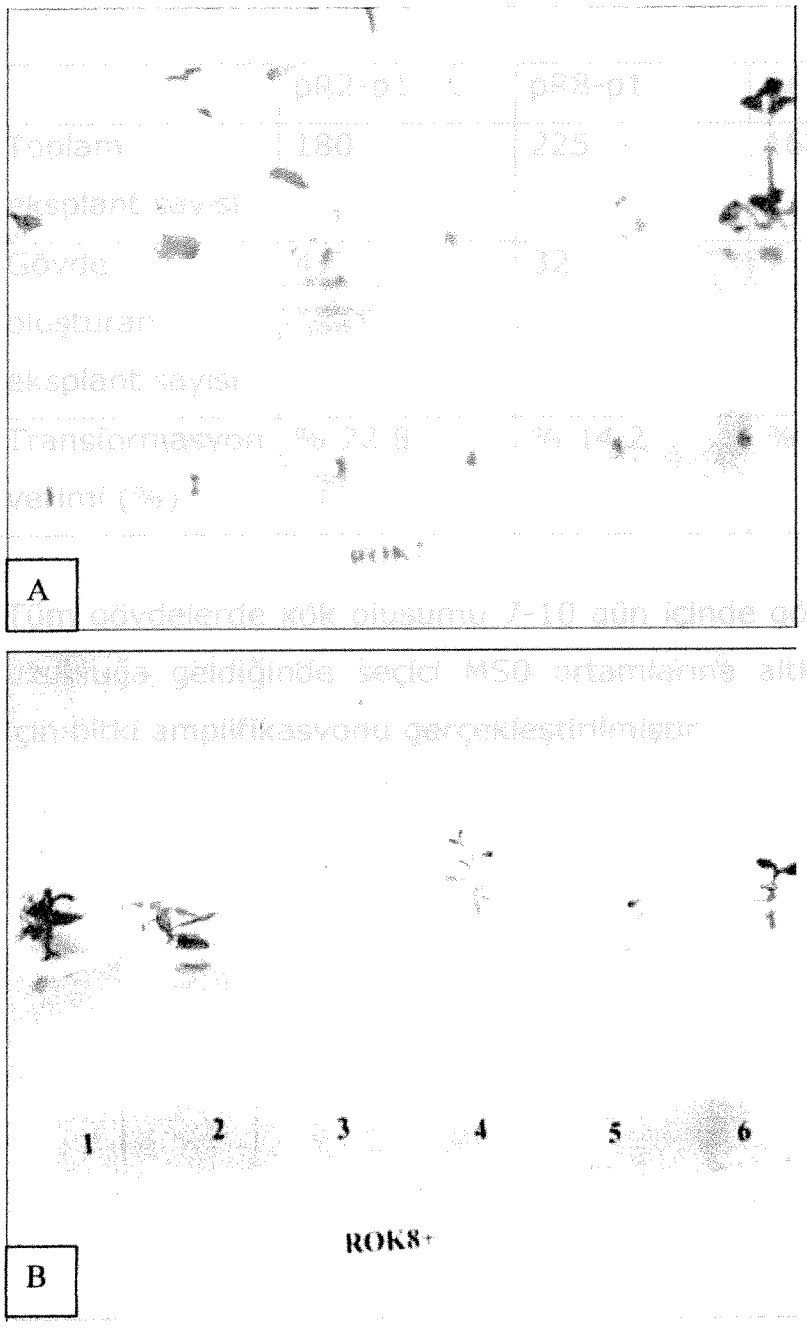
Eksplant tipi	pR2-p1	pR8-p1	(+) kontrol	(-) kontrol
Yaprak parçası	% 46.6	% 14.6	%72.7	%0.0
Gövde parçası	% 18.6	% 6.7	% 64.3	% 0.0



Şekil 6. Bitkilerde kallus oluşumu. A- Yaprak parçasından kallus oluşumu, B- Gövde parçasından kallus oluşumu.



Şekil 7. Kalluslardan gövde oluşumu. A- Yaprak parçasından gövde oluşumu, B- Gövde parçasından gövde oluşumu



Şekil 8. Rejenere olan gövdelerde kök oluşumu. A- pR2-p1 ile transforme edilmiş bitkilerde kök oluşumu, B- pR8-p1 ile transforme edilmiş bitkilerde kök oluşumu.

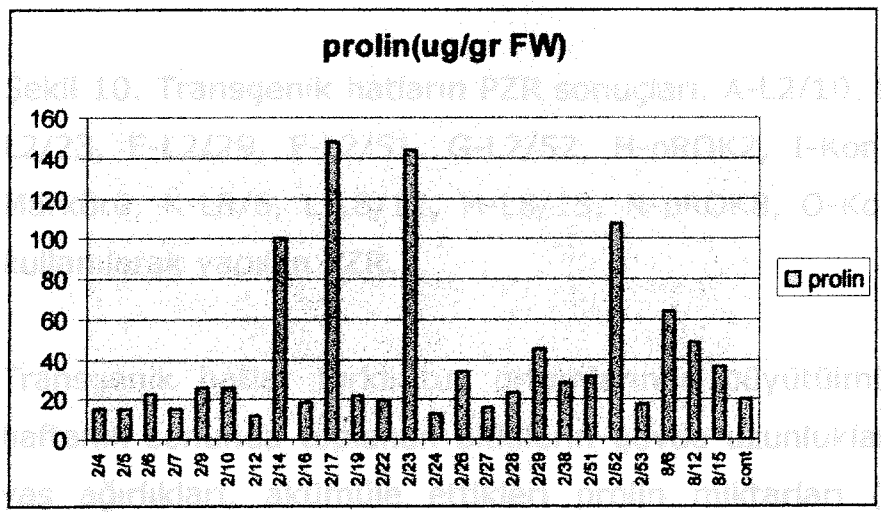
Tablo 5. Gövde oluşumu ve transformasyon verimi

	pR2-p1	pR8-p1	(+) kontrol	(-) kontrol
Toplam eksplant sayısı	180	225	168	207
Gövde oluşturan eksplant sayısı	41	32	7	8
Transformasyon verimi (%)	% 22.8	% 14.2	% 4.2	% 3.9

Tüm gövdelerde kök oluşumu 7-10 gün içinde gözlenmiştir. Fideler yeterli uzunluğa geldiğinde seçici MS0 ortamlarına altkültür yapılmış, analizler için bitki amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

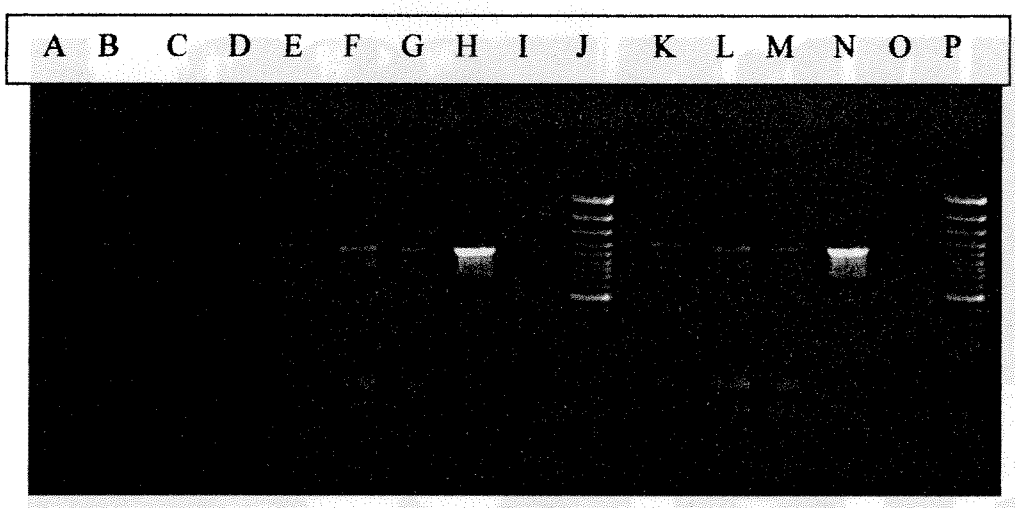
Transgenik Bitkilerin Analizleri

Elde edilen 88 hat transgenik hat bitkide prolin analizi yapılmış, en fazla prolin akümüle eden 10 hat transgenik bitki seçilmiş (Şekil 9) ve çalışmalara bu hatlarla devam edilmiştir.



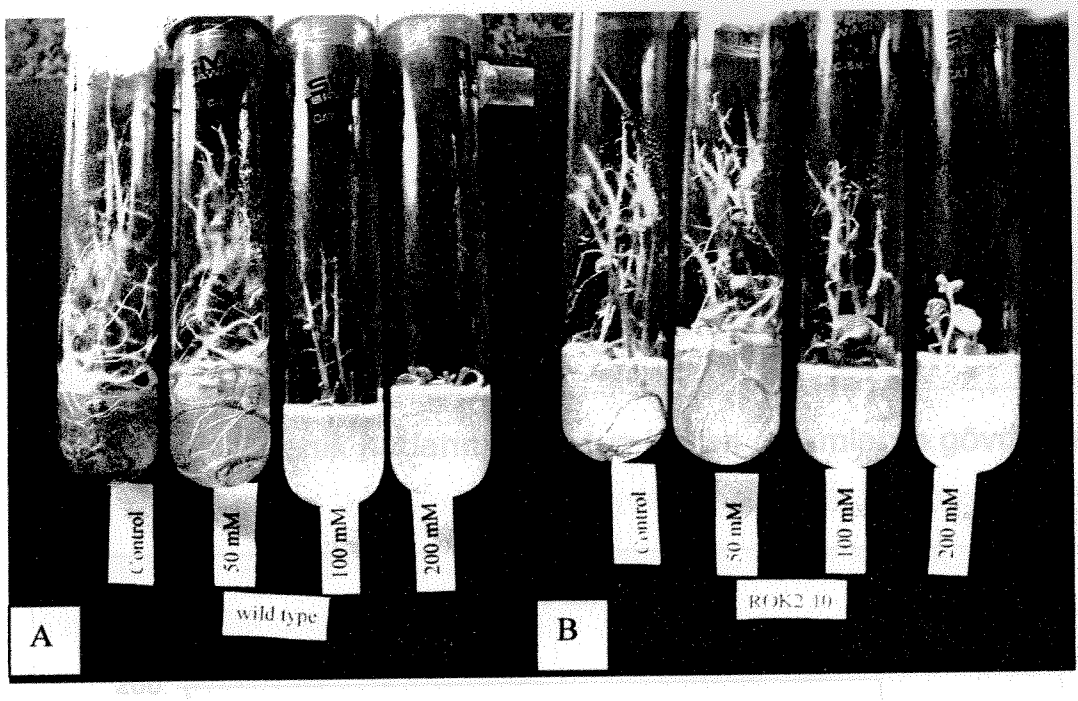
Şekil 9. Trangenik hatlarda prolin akümülasyonu

Bu 10 hat transgenik bitkide transfer edilen genin varlığını ispatlamak amacıyla P5CS geni için PZR yapılmıştır. Sonuçlar P5CS genini transferini doğrular niteliktedir (Şekil 10).

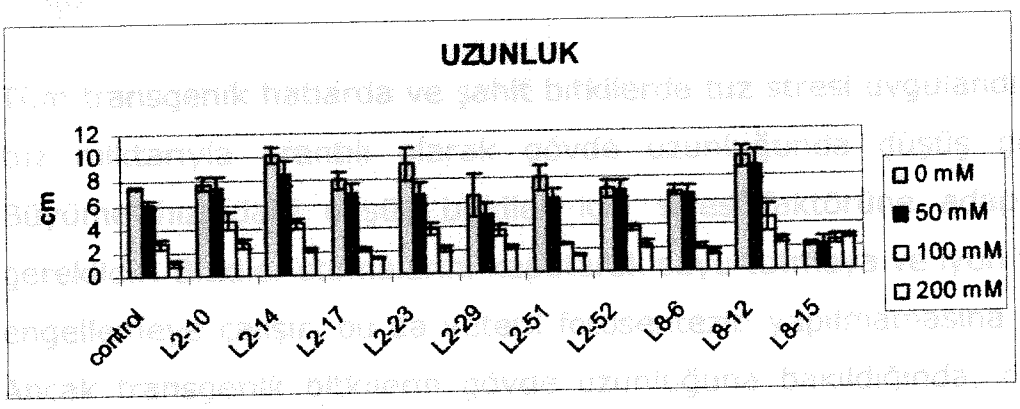


Şekil 10. Transgenik hatların PZR sonuçları. A-L2/10, B-L2/14, CL2/17, D-L2/23, E-L2/29, F-L2/51, G-L2/52, H-pROK2, I-Kontrol patates, J-DNA Markörü, K-L8/6, L-L8/12, M-L8/15, N-pROK8, O-Kontrol patates DNAsı kullanılarak yapılan PZR.

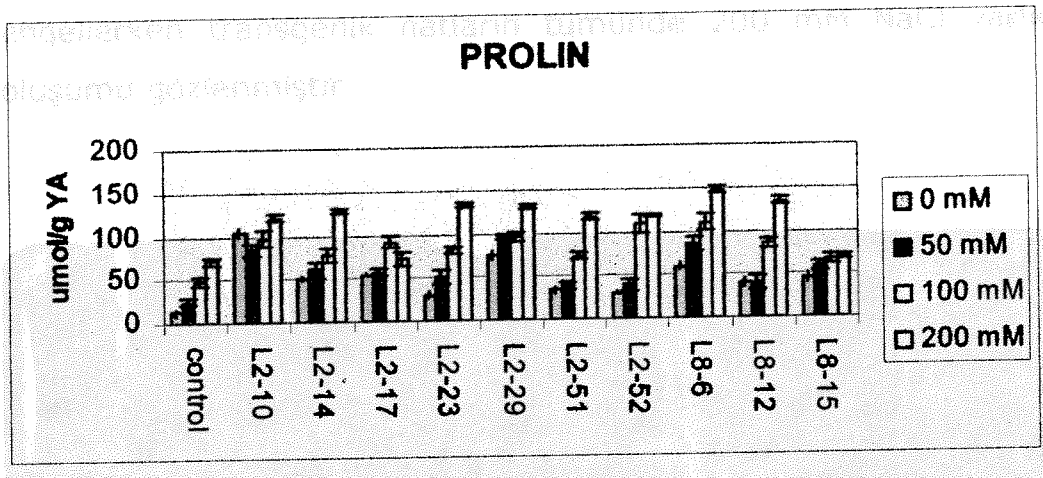
Transgenik hatlar farklı tuz ortamlarında büyütülmüştür (Şekil 11). 6 haftanın sonunda toplanan bitkilerin gövde uzunlukları (Şekil 12), gövde yaş ağırlıkları, akümüle ettikleri prolin miktarları (Şekil 13) ve MDA (malondealdehit) miktarları (Şekil 14) analiz edilmiştir.



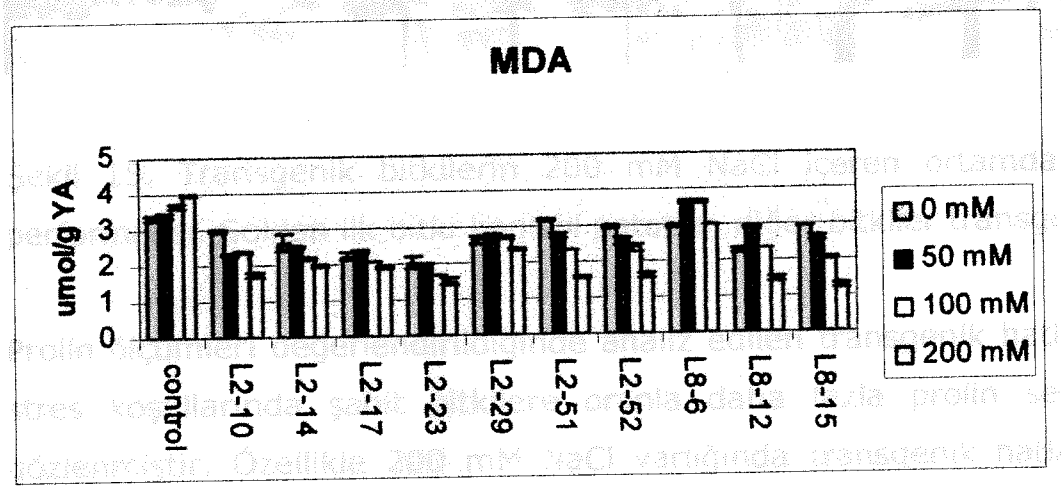
Şekil 11. Tuzlu ortamda büyütülmüş bitkiler. A- Kontrol patateslerin farklı tuz konsantrasyonlarında büyümesi, B- Transgenik bir patatesin farklı tuz konsantrasyonlarında büyümesi.



Şekil 12. Transgenik hatların farklı tuz içeren ortamlarda gövde uzunlukları

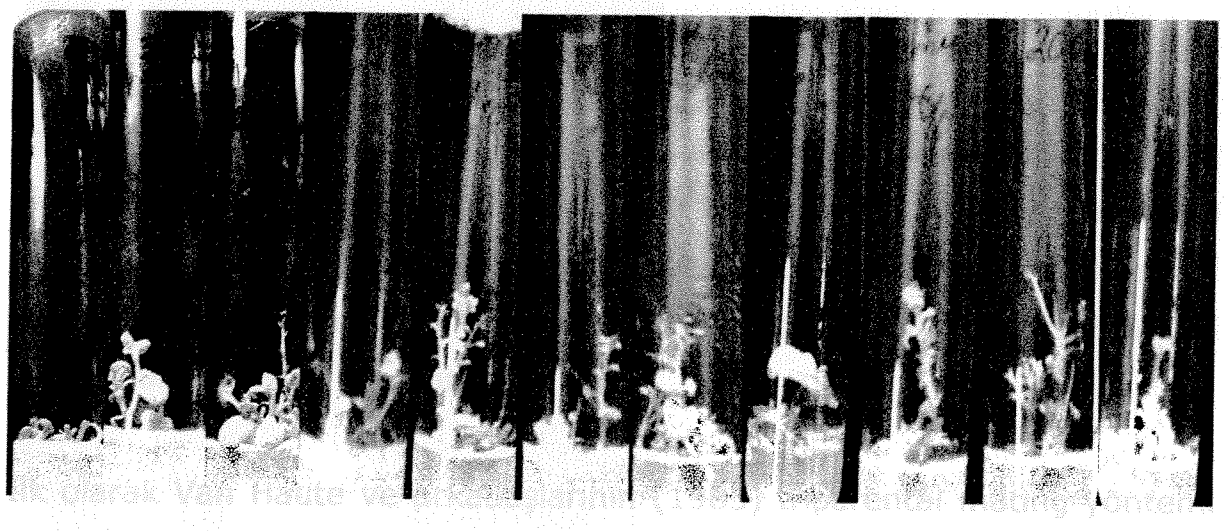


Şekil 13. Transgenik hatların farklı tuz içeren ortamlarda prolin akümülasyonu



Şekil 14. Transgenik hatların farklı tuz içeren ortamlarda MDA akümülasyonu

Tüm transgenik hatlarda ve şahit bitkilerde tuz stresi uygulandığında artan tuz miktarıyla orantılı olarak gövde uzunluğunda düşüş gözlenmiştir. Büyüme hızındaki düşüş bitkiler için stres faktörüne adaptasyon için gereklidir. Bitkiler stomalarını kapatarak suyu tutmaya ve iyon toksisitesini engellemeye çalışır, bu da yeterli fotosentezin yapılmamasına neden olur. Ancak transgenik bitkilerin gövde uzunluğuna bakıldığında, özellikle 200 mM tuz stesinde şahit bitkilere oranla daha hızlı büyüdükleri gözlenmiştir (Şekil 15). Şahit bitkilerde 200 mM NaCl kök oluşumunu tamamen engellerken transgenik hatların tümünde 200 mM NaCl varlığında kök oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 15. Transgenik bitkilerin 200 mM NaCl içeren ortamda büyüme performansı. Soldan ilk bitki kontrol patates, diğer bitkiler transgeniktir.

Prolin ölçümleri değerlendirildiğinde analiz edilen transgenik hatların, tüm stres koşullarında şahit bitkilere oranla daha fazla prolin sentezlediği gözlenmiştir. Özellikle 200 mM NaCl varlığında transgenik hatlar (L8-15 hariç), şahit bitkilere oranla ortalama 2 kat daha fazla prolin sentezlemiştir.

MDA strese bağlı lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla membran bozulmasında açığa çıkan ürünlerden biridir. MDA ölçümleri değerlendirildiğinde transgenik hatların tüm stres koşullarında şahit bitkilere oranla daha az zarar gördüğü gözlenmektedir. Özellikle 200 mM NaCl varlığında tüm transgenik hatlar şahit bitkilerin yaklaşık yarısı kadar MDA akümüle etmiştir.

Yapılan bu analizler sonucunda, projemiz kapsamında elde edilen transgenik hatların tuz stresi koşullarında şahit bitkilere oranla daha toleranslı oldukları gözlenmektedir.

Sto Geni İçin Yapılan Çalışmalar

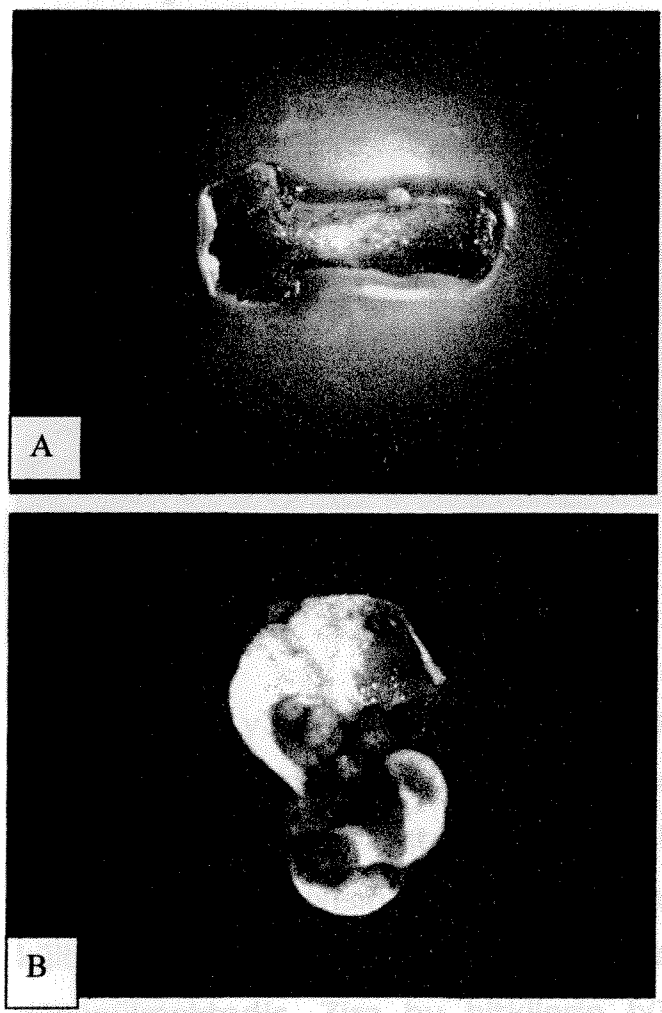
Projenin ilk çalışma dönemlerinde *E.coli* hücreleri içinde bulunan pPCVB-STO (Ek 2) plazmidinin, patateste başarı ile transformasyon sonuçları aldığımız *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücrelerine transferi hedeflenmiştir. Bu amaçla miniprep izolasyonu ile pPCVB-STO plazmidi izole edilmiş, iki farklı yöntem ile saf plazmidin *A.tumefaciens* EHA105 hücrelerine transferi denenmiştir.

İlk olarak Van Haute ve arkadaşlarının (1983) triparental mating yöntemi denenmiştir. Bu deneylerin sonunda tüm koşullarda büyüme gözlenmiş, sonucun kesinleştirilmesi amacıyla PZR gerçekleştirilmiştir. Ancak deneylerin sonunda (+) ve (-) kontrollerde de STO genine denk gelen silik bantlar gözlenmiştir.

Daha sonra direk transformasyon yönteminin kullanılması hedeflenmiştir. Sistemin kontrolü amacıyla eklenen (+) ve (-) kontrollerde büyüme gözlenmiş, 35S promotörüne spesifik primerlerle yapılan PZR ile (+) ve (-) kontrollerde de 35S promotör bantları gözlenmiştir.

Bu deneylerin sonunda muhtemel bir kontaminasyondan şüphelenilmiş, daha önce *A.thaliana* bitkilerinin transformasyonunda kullanılan *A.tumefaciens* GV3101 suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Bitki transformasyon çalışmaları P5CS geni için tarif edildiği gibi yapılmıştır. Bitki seçici markörü olarak PPT (2 mg/L) kullanılmıştır. Eksplantlardaki kallus oluşumu Şekil 16 de gösterilmiştir. Transformasyon deneylerinden elde edilen kallus oluşum verimleri Tablo 6 de gösterilmiştir.



Şekil 16. Eksplantlarda kallus oluşumu. A- Gövde parçalarında kallus oluşumu, B- Yaprak parçalarında kallus oluşumu.

Tablo 6. Eksplantlarda kallus oluşturma yüzdeleri

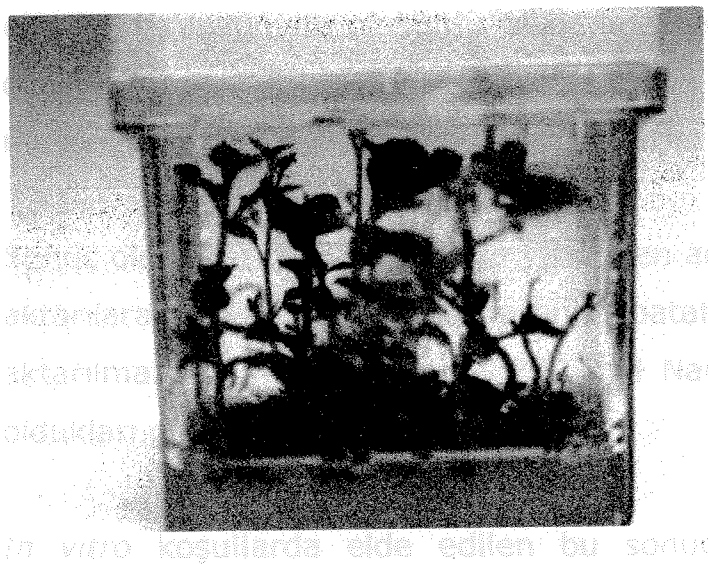
Eksplant tipi	PPCVB-STO	(+) kontrol	(-) kontrol
Yaprak parçası	% 18.8	% 48.8	% 0.0
Gövde parçası	% 23.2	% 60.3	% 0.0

Ancak kallus oluşumu sonrasında eksplantlardan gövde oluşumu beklenirken nekroz gözlenmiştir. Şekil 17 nekroz gözlenen eksplantlardan örnekler göstermektedir.

Şekil 17. Nekroz gözlenen eksplantlar.

P5CS geni ile yapılan transformasyon çalışmalarında elde ettiğimiz yüksek rejenerasyon verimi göz önünde tutulduğunda, STO geni için aynı sistem kullanılarak yapılan transformasyon çalışmalarından, yüksek eksplant ve deney tekrar sayısına rağmen, sonuç alınamamıştır. Sorunun ana kültürdeki bitkilerin yaşlanmalarından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Zira bu bitkilerin büyüme hızındaki düşüş ve yaprak çaplarındaki küçülme sonucu rejenerasyon verimlerinde önemli düşüşler de gözlenmektedir.

Bu sorunu çözmek amacıyla başka bir patates cinsi olan Russet ile tekrar ana kültür kurulmuştur. Şekil 18 de Russet cinsi patatesler gösterilmektedir. Russet cinsi patatesler ile grubumuzca daha önce çalışılmadığından rejenerasyon sisteminin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla STO geni için seçici markör olan PPT'nin etkili dozunun tespiti yapılmıştır. Farklı miktarlarda PPT (10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 2 mg/L, 1.5 mg/L, 1 mg/L, 0.5 mg/L) içeren MS4 ortamlarında tutulmuştur. Dört haftanın sonunda 2 mg/L PPTnin bitkilerin seçilmesinde etkili olacağı belirlenmiştir. Buna ek olarak rejenerasyon için alternatif ortamlar denenmektedir. Chang ve arkadaşları (2002) tarafından kullanılan 3C5ZR ortamı kallus oluşumu bakımından umut vaat edicidir, Sonuç raporu dönemi itibarı ile gövde oluşumu safhası beklenmektedir. Çalışmalar Simin Tansı isimli öğrencimizin doktora tezi kapsamında devam etmektedir.



Şekil 18. Russet cinsi patatesler

SONUÇ

P5CS geni ile yapılan transformasyon-rejenerasyon çalışmaları sonucu 88 hat transgenik patates geliştirilmiş, bu hatlardan en fazla prolin akümüle eden 10 hat seçilmiştir. Özellikle 200 mM NaCl varlığında transgenik hatlar, kontrol bitkilere oranla ortalama 2 kat daha fazla prolin sentezlemiştir. Kontrol bitkilerde 200 mM NaCl kök oluşumunu tamamen engellerken transgenik hatların tümünde 200 mM NaCl varlığında kök oluşumu gözlenmiştir. MDA ölçümleri değerlendirildiğinde transgenik hatların tüm stres koşullarında şahit bitkilere oranla daha az zarar gördüğü sonucu gözlenmektedir. Özellikle 200 mM NaCl varlığında tüm transgenik hatlar şahit bitkilerin yaklaşık yarısı kadar MDA akümüle etmiştir. Yapılan PZR çalışmaları transgenik hatlarda P5CS geninin varlığını doğrular niteliktedir.

STO geni ile yapılan transformasyon-rejenerasyon çalışmalarından henüz sonuç alınamamıştır. Russet cinsi patatesler ile çalışmalara başlanmış, eksplantlarda gövde oluşumu beklenmektedir. Gövde oluşumunu takiben oluşan transgenik bitkiler seçici ortamlarda köklendirilecek, çoğaltılacak ve moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal testler tamamlanacaktır.

Sonuç olarak proje kapsamında yürütülen araştırma sonucunda, P5CS geni aktarılarak elde edilen transgenik patates bitkilerinin, kontrol (gen aktarılmamış) bitkilere oranla 200 mM NaCl tuz stresine daha toleranslı oldukları gösterilmiştir.

In vitro koşullarda elde edilen bu sonuçların sera denemeleri ile de doğrulanabilmesi durumunda, bahsi geçen strateji önemli kültür çeşitlerinde tuzlanmaya toleranslı bitki materyalinin geliştirilmesinde kullanılabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L., Ho, T., Wu, R. Transgeniv approaches to increase dehydration stress tolerance in plants. Molecular Breeding 5:493-503, (1999).

Boggess S.F., Stewart C.R., Aspinall D., Paleg L. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. Plant Physiol. 58:398-401, (1976).

Bohnert, H.J. ve Jensen, R. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. TIBTECH 14: 89-97, (1996).

Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell 7:1099-1111, (1995).

Bohnert H.J. ve Shen B. Transformation and compatible solutes. Scientia Horticulturae 78:237-260, (1998).

Chang, M.M., Culley, D., Choi, J.J., Hadwiger, L.A. Agrobacterium mediated cotransformation of pea β-1,3-glucanase and chitinase in potato (Solanum tuberosum L. C.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. Plant Science 163: 83-89, (2002).

De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (Solanum tuberosum) using Agrobacterium tumefaciens. Theoretical and Applied Genetics 76:767-774, (1988).

Delauney A.J. ve Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The plant journal 4:215-223, (1993).

Eyidoğan F. Genetic Manipulation of tobacco against osmotic stress via proline overexpression. PhD. Thesis submitted to The Graduate School of Natural and Applied Sciences of the Middle East Technical University, Ankara (2001).

Faberio, C., Martin de Santa Olalla, F., Juan, J.A. Yield and size deficit irrigated potatoes. Agricultural Water Management 48: 255-266, (2001).

FAO, 2004.

Hanson A.D., Nelsen C.E., Everson E.H. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. Crop Science 17:720-726, (1977).

Hare P.D., Cress W.A., Van Staden, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell and Environ. 21:535-553, (1998).

Hu, Y. ve Schmidhalter, U. Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat. II Composition. Journal of Plant Nutrition 20: 1169-1182, (1997).

Inze, D. Ve Montagu, M.V. Oxidative stress in plants. Current Opinion in Biotechnology 6: 153-158, (1995).

Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *E.coli* with plasmids. Gene 96:23-28, (1990).

Kavi-Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G-H., Hu C-A.A., Verma D.P.S. Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiology 108:1387-1394, (1995).

Knight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. Int. Rev. Cytol. 195:269-324, (2000).

Nakamura T., Liu Y., Hirata D., Namba H., Harada S., Hirokawa T., Miyakawa T. Protein phosphotase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. EMBO J. 12: 4036-4071 (1993).

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsuyaka H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 18:185-193, (1999).

Paleg, L.G., Douglas, T.J., van Daal, A., Keech, D.B. Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat activation. Aust. J. Plant Physiol 8:107-114, (1981).

Rhodes, D. ve Handa S. Amino acis metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cells. In: Environmental stress in plants: Biochemical and Physiological Mechanisms NATO ASI series, vol G19, Springer, Berlin (1989) pp.41-62.

Rhodes, D., Handa, S., Bressan, R.A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. Plant Physiol. 82:890-903, (1986).

Rudolph A.S., Crowe J.H., Crowe L.M. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine and trehalose- on membrane phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 245:134-143, (1986).

Samaras Y., Bressan R.A., Csonka L.N., Garcia-Rios M.G., Paino D'Urzo M., Rhodes D. Proline accumulation during drought and salinity. In (N Smirnoff ed)Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. Bios Scientific publishers, Oxford (1995), pp 161-187.

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. Communicating with calcium. Plant Cell 11:691-706 (1999).

Santarius K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VI. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. Physiol. Plant. 84:87-93, (1992).

Smirnoff N. ve Cumbes Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochem.28: 1057-1060, (1989).

Solomon, A., Beer, S., Waisel, Y., Jones, G.P., Paleg, L.G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. Plant Physiol 90:198-204, (1994).

Stewart C.R. Proline Accumulation: Biochemical Aspects. In: The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (eds. Paleg and Aspinall D.) Academic Sydney, pp.243-259, (1981).

Stewart C.R., Boggess S.F., Aspinall D., Paleg G. Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol 59:930-932, (1977).

Takatjusi, H. Zinc-finger transcription factors in plants. Cell. Mol. Life Sci. 54:582-596 (1998).

Yoshiba Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. Correlation between the

induction of a gene for delta1-pyrolline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. Plant J. 7:751-760, (1995).

Zhang C.S., Lu Q., Verma D.P.S. Removal of feedback inhibition of Δ^1-pyrolline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalysing the first two steps of proline biosynthesis in plants. J. Biol. Chem. 270:20491-20496, (1995).

Zhu B., Su J., Chang M.C., Verma D.P.S., Fan Y.L., Wu R. Overexpression of P5CS gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. Plant Science 139:41-48 (1998).

Ek 1

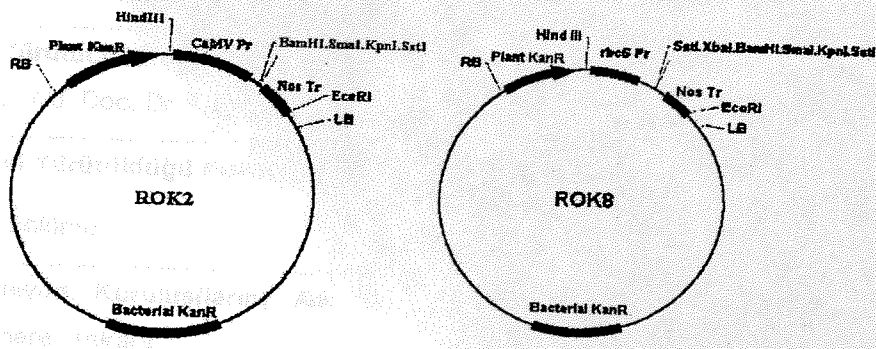
BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

Besiyeri	İçerik	Kullanım Amacı
Sıvı MS	M5519 + 30 g/L sukroz + 0.5 g/L MES + 20 g/L mannitol	Enfeksiyon ve ko-kultivasyon sırasında *Agrobacterium* hücrelerini seyretilmesi, rejenerasyon için *Agrobacterium* hücrelerini 800 mg/L Augmentin eklenmesiyle elimine edilmesi
MS0	M0404 + 30 g/L sukroz + 5 g/L agar	Mikropropagasyon, rejenere olan gövdelerde kök oluşumu (50 mg/L Kanamisin ya da 2 mg/L PPT eklenerek)
MS4	M5519 + 30 g/L sukroz + 0.5 g/L (MES ve PVP) + 20 g/L (mannitol ve glukoz) + 40 mg/L Adenin + 5 g/L agar + 1 mg/L ZR + 0.1 mg/L NAA + 10 mg/L $AgNO_3$ + 500 mg/L Sefotaksim	Yaprak diskleri ve yaprak parçaları için kallus oluşum ortamı (Transformantların seçilmesi için 50 mg/L Kanamisin ve 2 mg/L PPT eklenerek)
MS6	NAA içermeyen MS4 ortamı, 250 mg/L Sefotaksim eklenmiş	Yaprak diskleri ve gövde parçaları için Gövde oluşum ortamı (50 mg/L Kanamisin ve 2 mg/L PPT eklenerek)
MS8	0.1 mg/L GA_3 eklenmiş MS6 ortamı	Gövde oluşum ortamı (50 mg/L Kanamisin ve 2 mg/L PPT eklenerek)

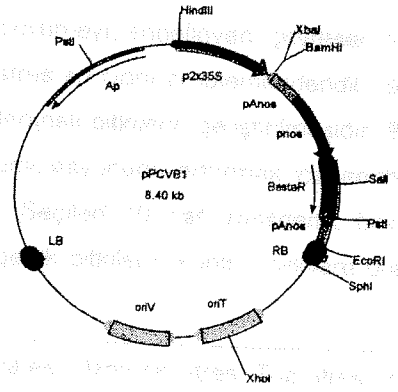
Ek 2

PLAZMİD HARİTALARI

P5CS Genini Taşıyan Plazmid Vektörleri



STO Genini Taşıyan Plazmid Vektörü



1-41

(35)

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TOGTAG 3191

Proje Başlığı: PATATESDE TUZ KURAKLIK STRESİNE TOLERANSLI TRANSGENİK BİTKİLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM, Prof. Dr. Meral YÜCEL, Yrd. Doç. Dr. Füsun İnci EYİDOĞAN, Dr. Feyza SELÇUK, Müge Simin TANSI

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TOVAG, Atatürk Bulvarı No:221 Kavaklıdere, Ankara

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Eylül 2002-Eylül 2004

Öz (en çok 70 kelime)

Bitkilerde üretim ve büyümeyi engelleyen çevresel faktörler arasında kuraklık ve tuzluluktan kaynaklanan ozmotik stres en ciddi problemlerdendir. Bu çalışmanın amacı gen teknolojisi ile tuz ve kuraklık stresine toleranslı bitkilerin geliştirilmesidir. Bu amaçla bitkilerde ozmokoruyucu olarak görev alan prolinin akümülasyonunu arttırmak için anahtar enzim P5CS yi kodlayan gen patates bitkilerine aktarılmıştır. Seçilen 10 hat transgenik bitkide moleküler ve biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiş, transgenik bitkilerin kontrol bitkilere oranla tuz stresine daha toleranslı oldukları gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Patates, Ozmotik Stres, Tuz Stresi, Kuraklık, Prolin, P5CS, STO

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

Patatesin P5CS geni ile transformasyonu ve transgenik bitkilerde tuz direncinin değerlendirilmesi, Müge Simin Tansı, sözlü bildiri, 31 Ağustos-2 Eylül 2005, 14. Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye

Genetic transformation of potato with P5CS gene and evaluation of salt resistance in transgenic plants, Füsun Eyidoğan, sözlü bildiri, 12-16 Eylül 2005, 6th International Symposium in the Series, Recent Advances in Plant Biotechnology, Ceske Budejovice, Czech Republic

Bilim Dalı: Biyoloji

Doçentlik B. Dalı Kodu: 203