

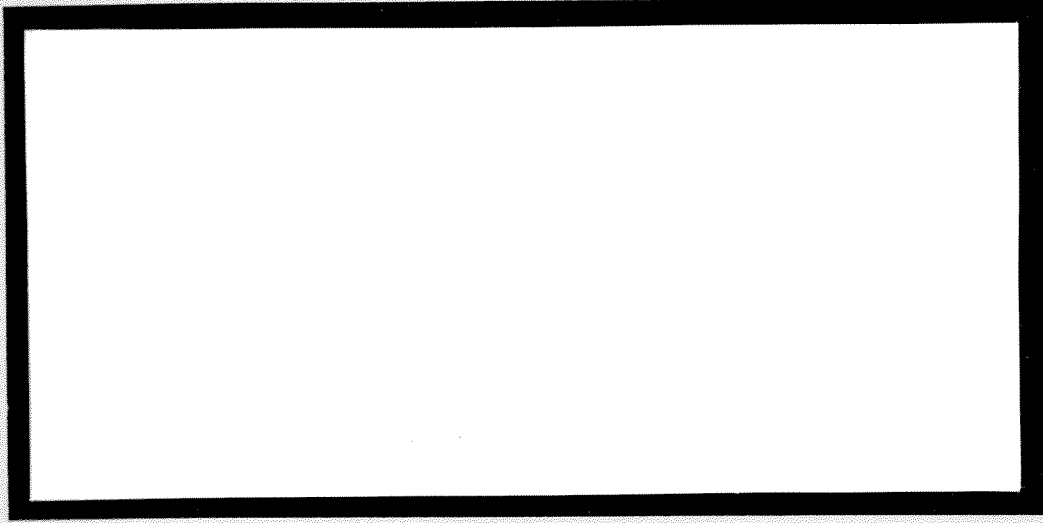
DAP

1997-580.



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu

Agriculture and Forestry Research Grant Committee

SICAKLIK, SOĞUKLUK, KURAKLIK, TUZLULUK ve METAL STRESİNE  
DAYANIKLI ZİRAİ BİTKİLERİN BİYOKİMYASAL ve FİZYOLOJİK  
YÖNTEMLERLE TESBİTİ ve GEN TRANSFERİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

PROJE NO: TBGAG-31DPT

PROF. DR. MERAL YÜCEL  
DOÇ. DR. HÜSEYİN AVNİ ÖKTEM  
DR. SAGLAN M.S. NAQVİ  
VELİ CENGİZ ÖZALP  
FATMA ÖZKAN

MART 1996

ANKARA

## ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TBGAG 31DPT sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Raporla ilgili bütün deneyler ODTÜ Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu proje aynı zamanda ODTÜ Araştırma Fonu AFP-93-01-08-06 ve AFP-94-01-08-09 nolu projeleri ile desteklenmiştir. Projenin gerçekleştirilmesinde yardımları olan tüm araştırmacılara, Füsun İnci, Meltem Mavituna, Alper Soydan, Demet Nalbant ve Matthew Weinheimer'a teşekkür ederiz. Proje sırasında buğday tohumlarını bize muntazam olarak temin eden Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Eskişehir Geçit Kuşluğu Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü Müdürü Doç Dr. Fahri Atay'a ve Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nden Prof. Dr. Ekrem Kün'e teşekkür ederiz. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nden Prof. Dr. Kazım Abak'a yapıcı kritikleri ve katkılarından dolayı teşekkür ederiz. Jel fotoğraflarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı Hasan Yılmaz ve Doğan Yaşara teşekkür ederiz. TBGAG eski genel sekreteri merhum Prof. Dr. Ferhan Hatipoğlu'na göstermiş oldukları ilgi ve iyi niyetlerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na şükranlarımızı sunarız. Beşinci ara raporda, raportörün görüşleri doğrultusunda proje önerisindeki başlık şimdiki şekliyle değiştirilmiştir.

Mart 1996 Ankara

Prof. Dr. Meral Yücel

Proje Yöneticisi

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİLLERİN VE TABLOLARIN LİSTESİ.....	8
ÖZ.....	10
ABSTRACT .....	11
GİRİŞ .....	12
<b>1. BÖLÜM SICAKLIK STRESİ.....</b>	<b>15</b>
1.1. GİRİŞ .....	15
1.1.1. Sıcaklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Biyokimyasal Etkileri.....	15
1.1.1.1. Büyük Moleküler Ağırlıklı HSP'ler.....	16
1.1.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı HSP'ler.....	17
1.1.2. Sıcaklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Fizyolojik Etkileri.....	17
1.1.2.1. Sıcaklık Stresi Altında Fotosentetik Aktivite.....	17
1.1.2.2. Sıcaklık Stresinde Hücre Zarı Geçirgenliği .....	18
1.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	19
1.2.1. Materyaller.....	19
1.2.2. Metotlar.....	20
1.2.2.1. Buğdayların Büyütülmesi .....	20
1.2.2.2. Bitkilere Sıcaklık Stresi Uygulaması .....	20
1.2.2.3. Fizyolojik Analizler.....	20
1.2.2.3.1. Fotosistem II (PS-II) Aktivite Tayini .....	20
1.2.2.3.1.1. Thylakoid zarların izolasyonu.....	20
1.2.2.3.1.2. Klorofil Tayini .....	21
1.2.2.3.1.3. Fotosentez Aktivite Tayinleri.....	21
1.2.2.3.2. Hücre Zarı Geçirgenlik Testi.....	21
1.2.2.3.3. Mitokondrial Aktivite Testi (TTC Testi).....	23
1.2.2.4. Biyokimyasal Analizler: .....	24
1.2.2.4.1. Protein İzolasyonu:.....	24
1.2.2.4.2. 1D SDS-PAGE.....	24
1.2.2.4.3. 2D SDS-PAGE.....	25
1.2.2.4.4. Gümüş Boyama Tekniği .....	26
1.3. BULGULAR .....	28

1.3.1. Sıcaklık Stresinin Fotosistem-II Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	28
1.3.2. Sıcaklık Stresinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi .....	29
1.3.3. TTC Canlılık Testi .....	29
1.3.4. 1D-SDS-PAGE .....	30
1.3.5. 2D-SDS-PAGE .....	30
1.4. TARTIŞMA .....	30
1.5. KAYNAKLAR .....	34
1.6. ŞEKİLLER .....	37
<b>2. BÖLÜM TUZ STRESİ</b> .....	<b>47</b>
2.1. GİRİŞ .....	47
2.1.1. Tuz Stresinin Bitkilerde Oluşturduğu Etkiler .....	47
2.1.2. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Gösterdiği Fizyolojik ve Biyokimyasal Tepkiler .....	48
2.2. ÇELTİKTE TUZ STRESİ .....	50
2.2.1. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....	50
2.2.1.1. Bitkilerin Büyütülmesi .....	50
2.2.1.2. Stres Uygulaması .....	51
2.2.1.3. Protein İzolasyonu .....	51
2.2.1.4. Protein Karakterizasyonu .....	52
2.2.1.4.1. Proteinlerin in-vivo İşaretlenmesi .....	52
2.2.1.4.2. Hücre Fraksiyonlarının Hazırlanması .....	52
2.2.1.4.3. Mikrozomal Zarların Fraksiyonu .....	53
2.2.1.5. PS-II Aktivite Ölçümleri .....	53
2.2.2. BULGULAR .....	54
2.2.2.1. Tuz Stresi Altında Çeltikte Protein Sentezi .....	54
2.2.2.2. Tuz Stresi Proteinlerinin Hücre İçine Dağılımı .....	55
2.2.2.3. Tuz Stresi Altında Çeltikte PS-II Aktivite Ölçümleri .....	56
2.2.3. TARTIŞMA .....	57
2.2.4. KAYNAKLAR .....	60
2.2.5. ŞEKİLLER .....	62
2.3. BUĞDAYDA TUZ STRESİ .....	73
2.3.1. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....	73
2.3.1.1. Bitkilerin Büyütülmesi .....	73
2.3.1.2. Stres Uygulaması .....	73
2.3.2. BULGULAR .....	73
2.3.2.1. Tuz Stresinin PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	73
2.3.2.2. Tuz Stresinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi .....	74
2.3.2.3. Tuz Stresi Altında Buğday Çeşitlerinde Sentezlenen Proteinler .....	74
2.3.4. TARTIŞMA .....	75
2.3.5. KAYNAKLAR .....	77

2.3.6. ŞEKİLLER.....	79
<b>3. BÖLÜM KURAKLIK STRESİ.....</b>	<b>89</b>
3.1 GİRİŞ.....	89
3.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	90
2.3.1. Bitki materyali.....	90
2.3.2. Kuraklık Stresinin Uygulanması.....	90
3.3. BULGULAR.....	91
3.3.1. Kuraklık Stresinin PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	91
3.3.2. Kuraklık Stresinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi.....	91
3.4. TARTIŞMA.....	92
3.5. KAYNAKLAR.....	95
3.6. ŞEKİLLER.....	97
<b>4. BÖLÜM SOĞUK VE METAL STRESİ.....</b>	<b>99</b>
4.1. GİRİŞ.....	99
4.1.1 Soğuk Stresi.....	99
4.1.2. Metal Stresi.....	100
4.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	101
4.2.1. Bitki Materyali ve Büyütülmesi.....	101
4.2.2. Stres Uygulaması.....	101
4.2.2.1. Soğuk Stresi.....	102
4.2.2.2. Metal Stresi.....	102
4.2.2.3. PS-II Aktivite Ölçümleri.....	102
4.2.2.4. Protein İzolasyonu.....	102
4.2.2.5. Jel Elektrophoresis Yöntemi ile Proteinlerin Karakterizasyonu.....	102
4.3. BULGULAR.....	103
4.3.1. Soğuk Stresi ve Metal Stresi Altında Sentezlenen Proteinler.....	103
4.3.2. Soğuk Stresinin Haşhaş Bitkisinde PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	103
4.4. TARTIŞMA.....	104
4.5. KAYNAKLAR.....	107
4.6 ŞEKİLLER.....	109
<b>5. BÖLÜM GEN TRANSFERİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>117</b>
5.1. DNA PARMAK İZİ ÇALIŞMALARI.....	117
5.1.1. GİRİŞ.....	117
5.1.2 MATERYAL ve YÖNTEMLER :.....	119
5.1.2.1. Bitkilerden DNA izolasyonu.....	119
5.1.2.2. DNA derişiminin tesbiti :.....	119
5.1.2.3. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu.....	120

5.1.2.3.1. CaCl <sub>2</sub> Yöntemi .....	120
5.1.2.3.2. DMSO Yöntemi .....	120
5.1.2.4. Plasmid DNA izolasyonu .....	121
5.1.2.5. Restirksiyon Enzim (RE) Hidrolizi .....	121
5.1.2.6. Agaroz Jel Elektroföresi .....	122
5.1.2.7. Insert izolasyonu .....	122
5.1.2.8. Proben İşaretlenmesi .....	122
5.1.2.9. DNA Parçacıklarını Naylon Membranlara Aktarılması (Southern Blot) .....	123
5.1.2.10. Hibridizasyon Deneyleri .....	123
5.1.2.11. Blotun Görüntülenmesi .....	124
<b>5.1.3. BULGULAR</b> .....	<b>124</b>
5.1.3.1. Kompetant Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu .....	124
5.1.3.2. RFLP Çalışmaları .....	124
5.1.3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Restirksiyon Enzim Sindirimi .....	124
5.1.3.2.2. Insert İzolasyonu ve Prob Hazırlanması .....	125
5.1.3.2.3. Southern Blot ve Hibridizasyon Çalışmaları .....	125
<b>5.1.4. TARTIŞMA</b> .....	<b>125</b>
<b>5.1.5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>127</b>
<b>5.1.6. ŞEKİLLER</b> .....	<b>129</b>
<b>5.2. TÜTÜN BİTKİSİNDE AGROBAKTERİ KULLANILARAK GEN TRANSFERİ:</b> .....	<b>133</b>
5.2.1. GİRİŞ : .....	133
5.2.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER : .....	134
5.2.2.1. Bitkilerin ve Agrobacterium Suşlarının Büyütülmesi .....	134
5.2.2.2. Yaprak Diski Transformasyonu .....	134
5.2.2.3. Regensasyon ve Transgenik Bitkilerin Seçimi .....	135
5.2.2.4. GUS Analizleri : .....	135
5.2.2.4.1. Spektrofotometrik Analizler .....	136
5.2.2.4.2. Histokimyasal Analizler .....	136
5.2.3. BULGULAR .....	136
5.2.4. TARTIŞMA .....	137
5.2.5. KAYNAKLAR .....	140
5.2.6. ŞEKİLLER .....	141
<b>SONUÇLARIN UYGULANABİLİRLİLİĞİ</b> .....	<b>149</b>
<b>PROJE KAPSAMINDA YAPILAN YAYIN VE TELBİĞLERLE</b> .....	<b>151</b>
<b>İLGİLİ BİLGİLER</b> .....	<b>151</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>154</b>

## ŞEKİLLERİN ve TABLOLARIN LİSTESİ

<i>Tablo 1.1</i> 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresine tabi tutulmuş buğday çeşitlerinde fotosistem-II aktivitesinin ikinci bir sıcaklık şokundan (40 derece 10') korunması.....	37
<i>TABLO 1.11</i> Sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinlerin çeşitlere göre dağılımı.....	37
<i>Şekil 1.1</i> Tosun çeşidinin PS-II aktivite grafikleri.....	38
<i>Şekil 1.2</i> Hücre zarı geçirgenlik testinin sonuçları.....	39
<i>Şekil 1.3</i> TTC canlılık testinin sonuçları.....	39
<i>Şekil 1.4</i> Deneylerde kullanılan beş değişik buğday çeşidinin yaprak proteinlerinin 1D-SDS-PAGE profilleri.....	40
<i>Şekil 1.5</i> Tosun çeşidinin 2D SDS-PAGE protein profilleri.....	41
<i>Şekil 1.6</i> Kharachia çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.....	42
<i>Şekil 1.7</i> Bezostaya çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.....	43
<i>Şekil 1.8</i> Çakmak çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.....	44
<i>Şekil 1.9.A</i> ES-91 çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.....	45a
<i>Şekil 1.9.B</i> Gerek çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.....	45b
<i>Şekil 1.10</i> Farklı buğday çeşitlerinde sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinler.....	46
<i>Şekil 2.2.1</i> Değişik tuz derişimlerinin Nona Bokra kök protenleri üzerine etkisi.....	62
<i>Şekil 2.2.2</i> Değişik sürelerle uygulanmış tuz stresinin Nona Bokra kök protenleri üzerine etkisi.....	63
<i>Şekil 2.2.3</i> %2 NaCl'de 48 saat süre ile strese tabi tutulmuş bitkilerin kök proteinleri.....	64
<i>Şekil 2.2.4</i> %2 NaCl 48 saat süre ile uygulandıktan sonra bitkilerin yaprak dokularının protein profilleri.....	65
<i>Şekil 2.2.5</i> Değişik stres faktörlerinin kök proteinleri üzerine etkileri.....	66
<i>Şekil 2.2.6</i> Hücre fraksiyonlatından alınan proteinlerin SDS-PAGE sonuçları.....	66
<i>Şekil 2.2.7</i> Nona bokra kök dokusu sitozolik proteinlerinin 2D SDS-PAGE profilleri.....	68
<i>Şekil 2.2.8</i> %2 NaCl stresi uygulanmış kök dokusundan hazırlanan mikrosomal fraksiyonların protein profilleri.....	69
<i>Şekil 2.2.9</i> %1 ve %2 NaCl stresinin Nona Bokra çeşidinin PSII aktivitesi üzerine etkisi.....	71
<i>Şekil 2.2.10</i> Nona bokra çeşidinde PS-II aktivitesinin başlangıç hızları.....	71
<i>Şekil 2.2.11</i> %2 ve %4 NaCl derişimlerinin 5 gün süre ile Nona Bokra ve Taichung native çeşitlerine uygulanması sonucunda PS-II aktivitelelerinde meydana gelen değişiklik.....	72
<i>Şekil 2.2.12</i> İki farklı çeşitte 5 gün süre ile %2 NaCl uygulanması sonucu PS-II aktivitelelerinin başlangıç hızı.....	72
<i>Şekil 2.2.13</i> %2 NaCl stresinin 8 gün süre ile uygulanmasının Nona Bokra ve Taichung Native çeşitlerinin PS-II aktiviteleleri üzerine etkileri.....	74
<i>Şekil 2.2.14</i> İki farklı çeşitte 8 gün süre ile %2 NaCl uygulanması sonucu PS-II aktivitelelerinin başlangıç hızı.....	74
<i>Şekil 2.2.15</i> Nona Bokra ve Taichung Native çeşitlerinde %2 NaCl stresinin 4, 5 ve 8 gün uygulanması sonucu PS-II aktivitelelerindeki değişiklik.....	76
<i>Şekil 2.3.1</i> Tosun çeşidinin 5 gün süre ile değişik derişimlerde verilen NaCl stresi sonucu gözlenen PS-II aktiviteleleri.....	81
<i>Şekil 2.3.2</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) bir günlük stres sonucu PS-II aktivitelelerindeki değişim.....	82
<i>Şekil 2.3.3</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) üç günlük stres sonucu PS-II aktivitelelerindeki değişim.....	83
<i>Şekil 2.3.4</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) beş günlük stres sonucu PS-II aktivitelelerindeki değişim.....	84
<i>Şekil 2.3.5</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) bir günlük stres sonucu hücre zarlarında meydana gelen yarananma.....	85
<i>Şekil 2.3.6</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) üç günlük stres sonucu hücre zarlarında meydana gelen yarananma.....	86
<i>Şekil 2.3.7</i> Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) beş günlük stres sonucu hücre zarlarında meydana gelen yarananma.....	87
<i>Şekil 2.3.8</i> Tosun ve Gerek çeşitlerinde %2 NaCl stresinin 3 gün süre ile uygulanması sonucunda kök protein profillerindeki değişimler.....	88
<i>Şekil 2.3.9</i> Tosun çeşidinde <sup>35</sup> S-Methionin ile işaretleme sonucu NaCl stresi altındaki kök protein profilleri.....	89
<i>Şekil 2.3.10</i> Bir gün süre ile NaCl stresi uygulanmış Tosun çeşidinde yaprak dokusu proteinlerinin 2D-SDS-PAGE ve gümbüş boyama profilleri.....	90
<i>Şekil 3.1</i> Kuraklık stresinin farklı buğday çeşitlerinin fotosentez aktiviteleleri üzerine etkisi.....	98
<i>Şekil 3.2</i> Kuraklık stresinin farklı buğday çeşitlerinin hücre zarı geçirgenliği üzerine etkisi.....	99



<u>Şekil 4.1.</u> 4 derecede 5 saat süre ile soğuk stresi uygulanmış haşhaş çeşitlerinde yaprak dokusunda sentezlenen proteinlerin bir boyutlu SDS-PAGE profilleri .....	110
<u>Şekil 4.2.</u> Haşhaş 163 çeşidinde soğuk stresi uygulanmış ve kontrol numunelerinden hazırlanmış proteinlerin iki boyutlu SDS-PAGE profilleri .....	111
<u>Şekil 4.3.</u> Haşhaş 163 çeşidinde 3mM Cd stresinin 3 gün süre ile uygulanması sonunda sentezlenen proteinlerin bir boyutlu SDS-PAGE profilleri .....	112
<u>Şekil 4.4.</u> 4 derecede sabaha kadar soğukluk stresi uygulanmış haşhaş çeşitlerinin PS-II aktivite ölçümleri .....	113
<u>Şekil 4.5.</u> 4 derecede 6 saat ve sabaha kadar uygulanan soğuk stresinin haşhaş çeşitlerinin PS-II aktiviteleri üzerine etkisi .....	114
<u>Şekil 5.1.1.</u> pHS17.3 plazmidinin EcoRI RE muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel profili .....	132
<u>Şekil 5.1.2.</u> Bitki genomik DNA'larının RE hidrolizi öncesi agaroz jel profilleri .....	132
<u>Şekil 5.1.3.</u> RE'lerle muamele edilmiş bitki genomik DNA'ları .....	133
<u>Şekil 5.1.4.</u> KM64 plazmidinin HindIII ile sindirimi sonrası agaroz jel elektroforez profili .....	133
<u>Şekil 5.1.5.</u> Digoksigenin kiti kullanılarak elde edilen optimizasyon amaçlı Southern Blot sonucu .....	134
<u>Şekil 5.1.6.</u> Klorofil a/b bağlanma probuyla yapılan hibridizasyon deneyi sonucu .....	134
<u>Şekil 5.1.7.</u> Değişik buğday çeşitlerinin total tohum proteinlerinin SDS-PAGE profilleri .....	135
<u>Şekil 5.2.1.</u> pBI121 binary vektörünün border sekansları arasındaki DNA dizileri .....	146
<u>Şekil 5.2.2.</u> Kontrol bitkilerinde kallus ve gövde oluşumu .....	146
<u>Şekil 5.2.3.</u> Kontrol bitkilerin MSB ortamlarındaki gelişmeleri .....	147
<u>Şekil 5.2.4.</u> Gen aktarımı yapılmış yaprak disklerinin MSB ortamlarındaki gelişmeleri .....	147
<u>Şekil 5.2.5.</u> Transgenik bitkilerin MSC ortamında kök oluşumları .....	149
<u>Şekil 5.2.6.</u> Transgenik bitkilerin toprağa alındıktan sonraki gelişmeleri .....	149
<u>Şekil 5.2.7.</u> Rejenerasyonunu tamamlamış transgenik Samsun çeşidi .....	150
<u>Şekil 5.2.8.</u> Transgenik (A) ve kontrol (B) bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSB ortamlarındaki rejenerasyon potansiyelleri .....	150
<u>Şekil 5.2.9.</u> Transgenik ve kontrol bitkilerin spektrofotometrik GUS aktivite analizleri .....	151
<u>Şekil 5.2.10.</u> Transgenik ve kontrol bitkilerin Histokimyasal GUS aktivite analizleri .....	151
<u>Şekil 5.2.11.</u> Transgenik bitkilerden ve kontrol bitkilerden elde edilen tohumların kanamisin içeren MSB ortamındaki bir aylık gelişmeleri .....	152
<u>Şekil 5.2.12.</u> Transgenik F1 generasyonu ve kontrol bitkilerin spektrofotometrik yöntemle saptanan GUS aktiviteleri .....	153
<u>Şekil 5.2.13.</u> Transgenik F1 bitkilerinin histokimyasal olarak saptanan GUS aktiviteleri .....	154

## ÖZ

Farklı tahıl bitkilerinde farklı stres koşullarında (sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, ağır metal ve soğuk) sentezlenen proteinler 1D ve 2D-SDS PAGE elektroforez sistemi ile ayrıldı ve gümüş boyama ile belirlendi. Sıcaklık stresi sonunda farklı buğday çeşitlerinde düşük moleküler ağırlığında yaprak dokusunda 15-18 kD ve pI:6.0 civarında 16 ayrı proteinin sentezlendiği gözlemlendi. Çeltikte ise 48 saat süre ile %2 NaCl stresi altında kök dokusunda 25.5 ve 27 kD pI:7.0 civarında iki yeni tuz stres proteinlerinin sentezlendiği gösterildi. Bu proteinlerin hücre fraksiyon analizleri sonunda hücre sitozolunda olduğu bulundu. Bu proteinlerin sıcaklık, ABA, PEG veya ağır metal stresi sonunda sentezlenmediği tuza özgü olduğu belirlendi. Aynı şekilde haşhaş bitkisinde soğuk stresi altında yaprak dokusunda sentezlenen 37 kD ağırlığındaki proteinin de soğuk stresi proteini olduğu belirtildi. Bu çalışmanın sonucunda tahıl bitkilerinde stres koşullarında sentezlenen proteinlerin hem tür hem de çeşitlere özgü olduğu ve stresten korunma mekanizmasında önemli rolleri olabileceği öne sürüldü.

Farklı stres koşullarına dayanıklı tahıl bitkilerinin fotosistem-II, hücre zarı geçirgenliği ve TTC mitokondrial canlılık testi yöntemleri ile laboratuvar koşullarında kısa sürede taranabileceği gösterildi.

Tütün bitkisinde *Agrobacterium*'a dayalı DNA transferi tekniği ile bakteri orijinli neomisin fosfotransferaz-II ve  $\beta$ -glukuronidaz enzimlerini kodlayan genler aktarıldı ve transgenik bitkiler elde edildi. Aktarılan bu genlerin bir sonraki generasyona da ( $F_1$ ) taşındığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Stres, Sıcaklık, Tuzluluk, Kuraklık, *Agrobacterium* ile gen transferi, Buğday, Çeltik, Tütün, Haşhaş

## ABSTRACT

The proteins synthesized in different crop plants under different stress conditions (heat, drought, salt, heavy metal and cold) were characterized by 1D and 2D SDS-PAGE and protein patterns were detected by silver staining. Under heat stress, in leaf tissues of wheat varieties the synthesis of 16 different proteins at low molecular weight in the range of 15-18 kD and pI:6.0-7.0 were observed. In rice varieties following 48 hours of 2% NaCl stress two newly synthesized proteins with molecular weights of 25.5 and 27 kD pI:7.0 were detected in root tissues. Cellular fractionation analysis revealed the presence of these proteins in soluble matrix. These proteins are not synthesized in response to heat stress, heavy metals, abscisic acid and polyethylene glycol treatments. In poppy under cold stress conditions, in leaf tissue the synthesis of a cold specific protein at 37 kD was observed. From these results it was concluded that the proteins synthesized under different stress conditions are species and cultivar specific and might have stress tolerance functions.

It was also shown that the photosystem II activity measurements, membrane leakage and TTC mitochondrial viability measurement methods can be used in screening of stress resistant crop plants under laboratory conditions.

In tobacco, utilizing the *Agrobacterium* mediated DNA transfer technique, the bacterial origin genes coding for neomycin phosphotransferase-II and  $\beta$ -glucuronidase enzymes were transferred and transgenic plants were obtained. Presence of the transferred genes were also observed in the F<sub>1</sub> progeny plants.

Key Words: Stress, Heat, Salt, Drought, *Agrobacterium* mediated gene transfer, Wheat, Rice, Tobacco, Poppy

## GİRİŞ

Tahıllar diğer bitkiler gibi değişen çevre koşullarından ve biyolojik faktörlerden etkilenmektedirler. Örneğin yüksek sıcaklık, kuraklık, aşırı soğuk, yüksek tuz derişimi, suni sulama, metal kirliliği, yüksek ışık şiddeti veya patojenik enfeksiyonlar gibi. Bu koşullar bitkilerin normal büyüme ve gelişmelerini etkilediği gibi ürünün verimliliğinin, kalitesinin ve gıda değeriinin değışmesine neden olmaktadır.

Bitkiler stres koşullarından kaçamadıkları için değışikliklere uyum sağlayabilmek ve gelişmelerini devam ettirebilmek için bazı morfolojik, fizyolojik ve biokimyasal ayarlamalar yapmaktadırlar. Genelde stres proteinleri dediğimiz özel proteinleri sentezlemektedirler. Örneğin yüksek sıcaklık şartlarında sıcaklık stres proteinlerini (Kimpel ve Key 1985, Linqvist 1986, 1990, Vierling 1991, Nguyen 1993), tuz stres koşullarında (Ramapagol 1987, Hurkman 1988, 1989, Arpada, Shirata 1990, çeltikte) sentezlenen proteinleri göstermişlerdir.

Farklı stres koşullarında farklı tür ve çeşitlerde sentezlenen proteinlerin farklılık göstermesi bu proteinlerin stres koşullarından korunmada ve strese dayanıklılık mekanizmalarındaki önemini ortaya çıkarmıştır. Bu konudaki çalışmalar farklı laboratuvarlarda devam etmektedir.

Bu alandaki araştırmalar yüksek organizmalarda gen ekspresyonunun anlaşılması açısından önemli olduğu kadar stres sonunda sentezlenen proteinlerin genlerinin tanımlanması açısından çok önemlidir. Klasik breeding programlarında hastalığa dayanıklı, verimi ve kalitesi yüksek tohumların eldesinde çaprazlama yolu ile ıslah çalışmalarına gidilmesi ancak bu tür çalışmaların çok zaman alması pratik uygulamaları geciktirmiştir.

Günümüzde biyolojik yöntemlerle tohum ıslah çalışmaları ağırlık kazanmıştır.

Türkiye'nin bir tarım ülkesi olması ve dış gelirlerinin %30-%40 zirai ürünlerden gelmesi ekonomik gelişmeyle bağlantılı olarak bu tip çalışmaların önemini arttırmaktadır. Türk çiftçisi yılda yaklaşık 8-10 milyon hektarlık alana ekim yapmaktadır. Çevre koşulları bilhassa yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk verim ve kalitenin yarıyarıya düşmesine neden olmaktadır. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) enerji ve tarımda birlikte bölgesel kalkınmanın

gerçekleşmesini amaçlamıştır. Barajlarda yaklaşık 1.7 milyon hektarlık bir tarım alanının sunni olarak sulaması planlanmış ve bir kısmı 1995 itibarı ile başlatılmıştır. Bu bölgelerde başlıca tarım ürünleri buğday, mısır ve pamuktur. Ancak kısa bir süre sonra suni sulama toprakta tuz ve metal problemlerini meydana getirmesi kaçınılmaz bir gerçektir. Projenin başarılı olabilmesi için o yöreye ekilen zirai bitkilerin titizlikle seçilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile proje önerisi yapıldığında bilhassa Türkiye'nin ve Uzak Doğu ülkelerinin kurak ve yarıkurak tarım alanlarında üretimin optimize edilmesi göz önünde bulundurularak sığağa, kurağa, tuza ve metal kirliliğine dayanıklı zirai bitkilerin gen mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çevre stres koşullarının etkisi incelenirken stresin tipini (biyotik stres ve abiyotik stres) yanısıra stresin şiddeti ve etki süresi de önemlidir. Bazı bitki türleri farklı gelişim evrelerinde stres faktörlerinden etkilendikleri gibi organ seviyesinde de farklılıklar göstermeleri farklı genlerin etkisini göstermektedir. Verim içinde belirli bir gen olmayıp bir çok fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının etkileşmeleri söz konusudur. Strese maruz kalmış bitkilerin fizyolojik ve biokimyasal ayarlamalar yaparken metabolik yolları nasıl değiştirdiği hakkında çok az bilgi mevcuttur. Strese dayanıklılık ve uyum sağlama dediğimiz olayların moleküler mekanizmaları henüz çözülmemiştir.

Çevre koşullarını kontrol altında tutmak mümkün olmadığından stres koşullarına dayanıklı verimi yüksek çeşitlerin geliştirilmesinde öncelikle farklı pratik uygulamaların getirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada abiyotik stres koşullarından sıcaklık, soğuk, tuz kuraklık ve metal stresi farklı zirai bitkilerden buğday, haşhaş ve çeltik'te çalışılmıştır. Proje kapsamında belirtildiği gibi projenin birinci kısmı stres koşullarına dayanıklı tahıl çeşitlerinin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tanımlanması ve dayanıklı çeşitlerin seçilmesi için yeni teknikler geliştirilmesi ile ilgili olarak fotosentez aktivite ölçümleri, hücre zarı geçirgenlik ölçümleri, mitokondrial aktivite TTC teknikleri ile stres koşullarında sentezlenen yeni proteinlerin karakterizasyonu ile ilgili olarak SDS-PAGE ve IEF jel elektroforez sistemleri oturtulmuştur.

Proje kapsamında ikinci aşama olarak gen haritalarının hazırlanması önerilmiştir. Strese dayanıklı genin seçimi ve genetik markörlerin hazırlanması açısından önemli çalışmalardır. Bu çalışmalarda strese dayanıklı ve strese dayanıksız buğday çeşitleri fizyolojik yöntemler kullanılarak belirlenmiş ve bu çeşitlerdeki genetik farklılıklar RFLP tekniği ile tesbit edilmeye çalışılmıştır.

Projenin üçüncü aşaması proje kapsamında belirtildiği gibi buğdayda tuz ve sıcaklık stresine yönelik cDNA library hazırlanmasıdır. Bu kısım Texas Tech Üniversitesi Plant Molecular Genetic Laboratuvarlarında Prof. Dr. Henry Nguyen tarafından hazırlanacaktı ancak önerilen SFS NATO projesinin kabul edilmemesi sonucunda bu kısım gerçekleştirilememiştir.

Projenin son kısmı bitkilerde gen transferi ve transjenik bitkilerin eldesidir. Projenin bu kısmı ile ilgili olarak *Agrobacteri* yolu ile gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla binary vektör stratejisi kullanılarak pBI121 binary vektörü üzerinde bulunan ve neomisin fosfotransferaz II (npt-II) ve GUS enziminin sentezinden sorumlu DNA dizinleri tütün bitkisine aktarılmış, F<sub>0</sub> ve F<sub>1</sub> transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Proje kapsamlı olduğu için her bir stres faktörü ve gen transferine yönelik çalışmalar ayrı bölümler halinde verilmiştir.

# 1. BÖLÜM SICAKLIK STRESİ

## 1.1. GİRİŞ

### 1.1.1. Sıcaklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Biyokimyasal Etkileri

Organizmalar normal büyüme ortamlarından 10-15 derece üstünde bir sıcaklığa ani olarak maruz bırakıldığında sıcaklık şoku dediğimiz (Heat Shock-HS) proteinleri sentezledikleri görülmüştür. İlk olarak bu çalışmalar *Drosophila busckii* üzerinde yapılmış (1962) ve 1974'te Tissiere yeni proteinlerin sentezlendiğini göstermiştir. 1978-1979'dan sonra archaobacteria, maya ve diğer organizmalarda çalışılmaya başlanmıştır. (McAlister ve arkadaşları 1979, Key ve arkadaşları 1981, Kelley and Schlesinger 1982, Linqvist 1986)

Sıcaklık stresi organizmalar arası farklılık ve çeşitler arası farklılık göstermekle beraber genel olarak meydana gelen değişiklikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

1. Normal proteinlerin sentezinde azalma, hücre ribozom okunması, monoribozomlarda artış.
2. Normal mRNA sentezinde azalma, sıcaklık stresine özgü mRNA sentezinde ve transformasyonda artış.
3. Sıcaklık stres proteinlerinin yüksek seviyede akümüasyonu.
4. Sıcaklık stres proteinlerinin hücre içi dağılımı ve sıcaklık stresine dayanıklılığın artması.
5. Bitkilerin normal protein sentezine dönmesi ve sıcaklık stres protein sentezinde azalma.

Yapılan çalışmaların ışığında sıcaklığa duyarlı sentezlenen sıcaklık stres proteinlerinin iki önemli karakteri ortaya çıkmıştır.

- i) Ökaryotlarda ve bazı prokaryotlarda nucleotid ve amino asit sıralanmalarında aşırı benzerlik.
- ii) Moleküler mekanizmalarda benzerlik.

Sıcaklık stresi proteinlerini iki grupta incelemek mümkündür.

- i) Büyük moleküler ağırlık sıcaklık proteinleri 110, 90, 70 ve 60 kD.
- ii) Küçük moleküler ağırlık sıcaklık proteinleri 15-30 kD.

### 1.1.1.1. Büyük Moleküler Ağırlıklı HSP'ler

*HSP 110 kD* proteinlerinin hücre içinde çözünür şekilde bulunup yüksek canlılarda, bitkilerde gözlenir. İminoelektron mikroskop çalışmalarında bu proteinler çekirdek ribozom DNA'sı ile (rDNA) bir arada gözlenmiştir (Linguist ve Craig 1988).

*HSP 104 kD* mayadan izole edilmiş ve sıcaklığa dayanıklılıkta rolü olduğu gösterilmiştir (Sanchet ve Linguist 1990).

*HSP 90* protein grupları, bu proteinler 80-94 kD molekül ağırlıkları arasında değişir. Ökaryotlarda amino asit sıralanmalarında %50 benzerlik görülmüştür. *HSP 90* proteinleri sitozolde bulunan fosfoproteinler olup ya steroid hormon reseptörleri (Beaulieu 1987) veya onkogenlerin ürünleri ile veya aktinle kompleks yaparlar. Bitkilerde *HSP 90* proteinleri ile fazla bir çalışma mevcut değildir (Lin ve arkadaşları 1986, Cooper ve Ho 1987).

*HSP 70* protein grupları: bu proteinler bir çok organizmada çalışılmıştır. Genel fonksiyonları aşağıda verilmiştir.

i) Hücrede ATP hidrolizinde etkili oldukları gözlenmiştir. {ATPase fonksiyonu gösterir (Neumann et. al. 1989)}

ii) Sentezlenen proteinlerin hücre içi dağılımında ve sıcaklığa duyarlı büyümede *HSP 70* homologları bazı protein prekürsörleri katlanmamış şekilde tutarak hücre zarından geçişlerine yardımcı olur. (Chirco 1988) ve bazı derivatları proteinlerin doğru katlanmalarında yardımcı olur bu özelliklerinden dolayı chaperon vazifesi gösterirler.

iii) Dönüşümlü olarak çekirdeğe bağlanırlar ve böylece korumada olduğu kadar ribozom sentezinde yardımcı olurlar.

Nukleer proteinlerin disosise olmasına yardımcı olurlar.

Çekirdek matriksine bağlanmış olan diğer proteinlerin ayrılmasına neden olur (Lewis and Pelhan 1985, Little Weed et. al. 1987).

iv) Otokontrol-sıcaklık stres proteinlerinin sentezini kendiliğinden kontrol eder. Bu özellik bitkilerde çalışılmamış olmasına rağmen *E. coli*, yeast, *drosophila* ve bazı vertebralarda gösterilmiştir (Di Domenico et. al. 1982, Gnossmann et. al. 1987).

*HSP 60*; bu proteinler mitokondria ve kloroplastlarda bulunmaktadır. Kloroplastlardaki derivatı Rubisco altbirimini bağlayan proteindir. (Barvaclough ve Ellis 1980). Bu proteinin rubisco 1.5 bifosfat karboksilaz enzimi iki alt birimini bir araya getirmesinden dolayı post translasyonel regülasyonda rolü olduğu düşünülmektedir.



### *1.1.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı HSP'ler*

Farklı organizmalarda farklı sayılarda düşük moleküler ağırlıklı sıcaklık stres proteinleri gözlenmiştir. Normal büyüme sıcaklığının 5-10 derece üstünde sıcaklıklarda 15-30 kD molekül ağırlığında sıcaklık stres proteinleri sentezlendiği görülmüştür (Mansfield ve Key 1987, Chen ve arkadaşları 1990). Küçük molekül ağırlıklı sıcaklık stres proteinlerinin sitozolde granül halinde bulunması veya normal mRNA'ye bağlanmış olması bu proteinlerin sıcaklık stresinden korunmadaki rollerini vurgulamaktadır (Lin ve arkadaşları 1985, 1989, Chen 1989, Nover ve arkadaşları 1989, Yeh ve arkadaşları 1995).

## **1.1.2. Sıcaklık Stresinin Bitkiler Üzerindeki Fizyolojik Etkileri**

### *1.1.2.1 Sıcaklık Stresi Altında Fotosentetik Aktivite*

Ani sıcaklık değişiklikleri bütün hücre metabolizmasını ve fotosentez olayını etkilemektedir. Fotosistem II (PSII) ünitesini Fotosistem I ünitesinden daha çok etkilediği görülmüştür (Beryand Björkman 1980). Fotosentez ünites, thylakoid zarlar üzerinde bulunan iki reaksiyon merkezinden meydana gelmektedir; PS I ve PS II. Her iki ünite klorofil tarafından tutulmuş olan foton enerjisini kullanarak suyun fotoelektrolizi ile fotoelectriği ile açığa çıkan elektronların  $NADP^+$  molekülünün redüklenmesinde rol oynar. Aynı zamanda meydana gelen  $H^+$  proton gradientide inorganik fosfat ( $P_i$ ) ve ADP den ATP sentezinde kullanılır.

PS II kompleksi molekül ağırlığı 4-50 kD arasında değişen yaklaşık 12 farklı polipeptidden oluşmaktadır. PS II kompleksindeki en büyük protein klorofil bağlayan protein olup CP 47 ve 43 kD ağırlıklarında iki polipeptid içerir. Bunun yanı sıra Mn ihtiva eden 32-34 kD ağırlıklarındaki D1 ve D2 proteinleri suyun ayrışmasını katalize eder (Nanbasatoh 1986, Verma 1993).

Fotosistem II (PS-II) thylakoid zarlara gömülü olduğu için fiziksel özellikleride sıcaklık artışı ile meydana gelen değişiklikler PS-II aktivitesini direkt olarak etkilemektedir. Sıcaklığın artmasında granum ayrılmasını ve klorofil bağlayan proteinler LHC thylakoid zar içerisinde

lateral hareketine neden olduğu gibi klorofil protein kompleksinin de ayrılmasına neden olduğu farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. (Sundby ve Anderson 1985)

Pearcy 1978 ve Raison 1982 yüksek sıcaklıkta büyüyen bitkilerin hücre zarlarında doymuş yağ asitlerinin artması fotosentez ünitesini sıcağına dayanıklı hale getirdiğini öne sürmüşlerdir. 1993'te Nishiyama, Gombas ve arkadaşları 1994'de sıcağına dayanıklılığın doymuş yağ asitlerinin artışı ile ilgili olmadığını hatta doymamış yağ asitlerinin fotosentez ünitesini stabilize ettiğini öne sürmüşlerdir.

Hücre zarı lipid ompozisyonunun fotosentez aktivitesinin sıcaklığa hassasiyetini etkilediği başka araştırmacılar tarafındanda ileri sürülmüştür (Berry ve Bjorkman 1980, Yordanov ve arkadaşları 1987, Gombas 1994). Diğeri bir yaklaşım sıcaklığa dayanıklılığın sıcaklık şoku proteinlerinin stromada artması veya thylakoid zarlara bağlanması ile ilgili olduğu görüşüdür. Kloppstel ve arkadaşları 1985, Schuster ve arkadaşları 1988, Vierling 1988).

#### *1.1.2.2. Sıcaklık Stresinde Hücre Zarı Geçirgenliğı*

Yüksek sıcaklıkta yaprak dokusunda meydana gelen yaralanmalar hücre zarının geçirgenliğini etkilenmektedir (Martineau ve arkadaşları 1978). Sıcaklık stresi sonunda meydana gelen değışimler ve yaralanmalar direkt olarak hücre zarı dayanıklılığı ile ilgili olduğu, sıcaklık stresi sırasında hücre zarı fonksiyonlarını yitirmezse bu bitkilerin sıcaklığa adaptasyon gösterdiği öne sürülmüştür (Raison ve arkadaşları 1980, Steponkus 1981).

Kloroplastlarda sıcaklık sonucunda meydana gelen yaralanmalar öncelikle hücre zarının yarı geçirgenlik özelliğini kaybetmesini takiben gözlenmiştir. Hücre zarının yarı geçirgenlik özelliğinin kaybolması sonucunda hücre içi iyon kuvveti ve pH'ın değışmesi kloroplast zarlarını dolayısıyla fotosentez aktivitesini etkiler (Berry ve arkadaşları, 1975, Berry ve Bjorkman 1980).

Bitkilerde öncül sıcaklık şoklarının ikinci bir şokun etkisini önlediğı ve bu bitkilere sıcaklığa karşı dayanıklılık kazandırdığı öne sürülmüştür (Krause ve Santarus, 1975, Pearcy ve arkadaşları 1977, Bulum ve Ebercon 1981). Bu şekilde kazanılan dayanıklılık hücre lipid yapısının değışikliliğı, hücre zarının akışkanlığı, hücre zar proteinleri veya bazı koruyucu

moleküllerin hücre içinde derişimlerinin artması (şeker alkollerini veya hücre polipeptid molekülleri) ile ifade edilmiştir. Hücre zarı dayanıklılığı strese dayanıklı çeşitlerin seçimi için fizyolojik bir kriter olarak önem kazanması ilk olarak Sullivan (1972) tarafından önerilmiştir. Bu yöntemlerin basit, çabuk ve sonuçlarının güvenilir olması, yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur.

Mitokondrial aktivite ölçümü ise dayanıklı çeşitlerin seçiminde kullanılan diğer bir yöntemdir. 2,3,5-Trifeniltetrazolium klorid (TTC) tuzunun mitokondriada elektron zincir sistemi tarafından indirgenmesi prensibine dayanır (Nachlas ve arkadaşları 1960). Sıcaklık stresi sonunda canlı olan hücrelerde redüklenme işlemi olduğu için bu test mitokondrial dayanıklılık veya mitokondrial canlılık testi olarak nitelendirilmektedir. TTC solusyonu normalde renksiz olup, redüklenme sonunda kırmızı-kahverengine dönüşür. Formazon etanol ile ekstrakt edildikten sonra spektrofotometrik olarak 485 nm'de ölçülür. (Steponkoou ve Lanphear 1967).

## AMAÇ

Çalışmanın bu kısmında farklı buğday çeşitlerinin sıcaklık stresine karşı gösterdikleri fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerin moleküler mekanizması tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu amaca varmak için aşağıda belirtilen yaklaşımlar kullanılmıştır:

- Sıcaklık stresi altında fotosentez aktivitelerinde (Fotosistem II) meydana gelen değişiklikler
- Hücre zarı geçirgenliği
- Mitokondrial aktivite tayini
- Stres protein profillerinin sıcaklığa dayanıklılık mekanizmasında rolleri.

## 1.2 MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 1.2.1 Materyaller

*Bitki materyali* : Çalışmalarımızda 4 ekmeklik buğday çeşidi (*Triticum aestivum*) Tosun, Gerek (Türk orijinli), Kharchia (Pakistan orijinli) Bezostaja (Rus orijinli), ve iki makarnalık (*Triticum durum*) çeşidi Çakmak ve Eskişehir 91 (ES-91) kullanılmıştır. Çakmak, ES-91, Gerek ve

Bezostaja Tarım ve Orman Bakanlığı Eskişehir Geçit Kuşığı Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tosun 144 Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri öğretim üyesi Prof. Dr. Ekrem Kün'ün hediyesidir. Kharachia Dr. Saqlan M.S. Naqvi tarafından Pakistan'dan getirilmiştir. Kimyasal malzemeler Sigma veya Merck firmalarından alınmıştır.

## 1.2.2 Metotlar

### 1.2.2.1. Buğdayların Büyütülmesi

Tohumlar % 40'lık  $\text{HClO}_4$  içerisinde 20 dak. süre ile sterilize edildikten sonra musluk suyu ile yıkanır ve perlit üzerinde iklim dolabında  $22 \pm 3$  derecede 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde gün aşırı sulanarak 10 gün süre ile büyütülür.

### 1.2.2.2. Bitkilere Sıcaklık Stresi Uygulaması

On gün süre ile perlit üzerinde büyütülmüş fideler 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresine bırakılır. Stres sonunda yaprak dokusu toplanarak fotosentez aktivite ölçümleri ve hücre zarı geçirgenlik testleri hemen yapılır. Protein analizleri için yapraklar sıvı nitrojende dondurulur ve deney yapılınca kadar -20 derecede saklanır.

### 1.2.2.3. Fizyolojik Analizler

#### 1.2.2.3.1. Fotosistem II (PS-II) Aktivite Tayini

Fotosentez aktivite tayinleri sıcaklık stresi uygulanmış bitki numuneleri ve kontrol numunelerinde yapılır. Bunun için ilk aşama tylakoid zarlarının izolasyonudur. Tylakoid zarlar, Burke ve arkadaşları (1978) yöntemine göre izole edilir.

Sıcaklık stresinde bitkiler 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresine tabi tutulduktan sonra tylakoid zarlar izole edilmekte ve ikinci sıcaklık stresi uygulaması su banyosunda 40 derecede 10 dakika süre ile yapılmakta daha sonra PS-II aktiviteleri oda sıcaklığında alınmaktadır. Kontrol numunelerinde de aynı şekilde tylakoid zarlar izole edilir ve PS-II ölçümleri yapılır. Fotosentez aktivite tayinleri stres uygulanmış ve kontrol numunelerinin tylakoid zarlarında yapılmıştır.

#### 1.2.2.3.1.1. *Thylakoid zarların izolasyonu*

Thylakoid zarlar Burke ve arkadaşları yöntemine göre (1978) izole edilir. Yaprak dokusu 500 mg küçük parçalara kesildikten sonra 4 ml yarı dondurulmuş çözeltide (0.33 M sorbitol, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1 % BSA ve 50 mM HEPES-KOH pH=7.0). İki kere 10 saniyelik aralıklarla Sorvall-Omni-Mixer'da en yüksek hızda homojenize edilir. Homojenat önce 4'e katlanmış olan tülbenkten süzülür sonra 8'e katlanmış tülbenkten geçirilir ve filtrat 1300 g'de 6 dakika Sorvall RC-2 santrifuj kullanılarak santrifuj edilir. Supernatant atılır, çökelti 3 ml 0.1 M sorbitol, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES-KOH pH=7.0 tampon çözelti içerisinde sulandırılır ve 12000xg'de Sorvall RC-2 santrifuj kullanılarak santrifuj edilir. Çökelti yaklaşık 200 µl süspansiyon tamponunda (0.1 M sorbitol, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES-KOH pH=7.0) çözülür.

#### 1.2.2.3.1.2. *Klorofil Tayini*

İzole edilen tilakoid zarlarda klorofil miktarı Arnon (1949) yöntemine göre yapılır. 10 µl numune 1 ml %80 aseton ile sulandırılır ve spektrofotometrik olarak klorofil miktarı aşağıda belirtilen formül kullanılarak tesbit edilir.

$$\mu\text{g / ml klorofil} = A_{665}(8.02) + A_{645}(20.2) \times \text{Sulandırma faktörü}$$

$A_{665}$  ve  $A_{645}$  bu dalga boylarındaki absorbans değerleridir.

#### 1.2.2.3.1.3. *Fotosentez Aktivite Tayinleri*

Fotosentez aktivitesi Chetti (1988) yöntemine göre 2,4 diklorofenol indo fenol (DCPIP) kullanılarak yapılır. 50 µg klorofil içeren tilakoid zarlar 2 ml 40 mM Tricine-KOH pH:8.0, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KCl ve 0.01 % DCPIP içeren tampon ile karıştırılır. Reaksiyon sisteme ışık verilerek başlatılır. Işık uygulaması 40 W'lık fiber optik ısınmasız ışına siteminden numunelere 10 cm uzaktan ve her örnek için aynı açıdan olacak şekilde 3 dakika süre ile yapılır. Her 20 saniyede 590 nm'de absorbans (metin içinde OD<sub>590</sub> veya A<sub>590</sub> olarak belirtilmiştir) ölçümü Shimatso UV-VIS spektrofotometre kullanılarak kaydedilir. DCPIP oksitlenmiş durumunda 590 nm'de en yüksek absorbans gösterir, redüklenmiş durumda absorbans düşer. Elektronlar fotosistem II'den verilmektedir. 590 nm'deki absorbans ölçümleri zamana karşı kaydedilir. Elde edilen eğrinin eğimi başlangıç hız olarak alınır. Fotosistem II aktivitesi  $\Delta A_{590}$  nm / saniye olarak ifade edilir.

#### 1.2.2.3.2. Hücre Zarı Geçirgenlik Testi

Sıcaklık stresine tabi tutulmuş buğday çeşitlerinin yapraklarında ve kontrol numunelerinde hücre zarı geçirgenliği Marsh, 1988 yöntemine göre yapılır. Sıcaklık stres uygulaması sonunda yaprak dokuları damıtılmış su ile yıkanır ve 50 ml dH<sub>2</sub>O içeren plastik kaplarda 4 derecede 24 saat bekletilir. Oda sıcaklığına geldiklerinde iyon aktivite ölçümleri alınır ve T<sub>1</sub> değeri olarak kaydedilir. İkinci ölçümden önce bitkiler -20 derecede sabaha kadar bırakılır (doku tamamen ölünceye kadar), ölçümler oda sıcaklığında yapılır ve T<sub>2</sub> değeri olarak kaydedilir.

Sıcaklık stresinin hücre zarına yaptığı tahribat kontrol değerinin yüzdesi olarak aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$\% \text{ Yaralanma} = \frac{1 - (1 - T_1 / T_2)}{1 - (T_{c1} / T_{c2})} * 100$$

$T_1$  = Sıcaklık stresi (37 derecede, 20 saat) uygulanmış bitkilerde iyon geçirgenliği, ilk ölçümler;  
4 derecede 24 saat bekletildikten sonra,

$T_2$  = Sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerde iyon geçirgenliği, ikinci ölçümler; -20 derecede 24 saat bekletildikten sonra,

$T_{c1}$  = Kontrol numunelerinde ilk ölçümler,

$T_{c2}$  = Kontrol numunelerinde ikinci ölçümler.

#### 1.2.2.3.3. Mitokondrial Aktivite Testi (TTC Testi)

Mitokondrial aktivite testi (TTC viability) Towill 1975 yöntemine göre 2,3,5 Trifeniltetraklorit (TTC) kullanılarak yapılır. Canlı hücrelerin mitokondrialarındaki elektron zincir sisteminin TTC tuzuna redüklemeleri prensibine dayandığı için canlılık testi olarak nitelendirilir. Kontrol ve sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerin yaprak numuneleri 1 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde 1 saat süre ile 50 derecede subanyosunda tutulur. Ölümcül stres aynı şekilde kontrol bitkilerinden alınan yaprak numunelerinin 50 derecede 1 saat su banyosunda bekletilmesi ile uygulanır. Stres uygulanmasından sonra numuneler havası alınmış ve 0.5 M potasyumfosfat tamponu (pH:7.4) içerisinde hazırlanmış olan % 0.8 TTC, % 0.1 Tween80 ihtiva eden solüsyon içerisinde karanlıkta 20 saat süre ile bekletilir. TTC solüsyonunun tamamen yaprak dokusu tarafından alınmasından sonra yapraklar 95 %'lik etanol içerisinde oda sıcaklığında 20 saat süre ile bekletilir. Etanol, numunelerin TTC solüsyonunun canlı hücrelerin mitokondriaları tarafından redüklenmesi sonunda oluşan formazon kromoforunu açığa çıkarır. Meydana gelen solüsyonun absorbansı 485 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. % canlılık ( % viability) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$\% \text{ viability} : T_{RT} / T_{50} / C_{RT} / C_{50} \times 100$$

$T_{50}$  : 37 derecede 20 saat öncül sıcaklık stresi ve 50 derecede ölümcül stres verilmiş numuneler

$T_{RT}$  : 37 derecede 20 saat öncül sıcaklık stresi verilip ölümcül stres verilmeyen numuneler

$C_{50}$  : Normal koşullarda büyütülüp 50 derecede ölümcül stres verilmiş numuneler

C<sub>RT</sub>: Normal koşullarda büyütülüp ölümcül stres verilmeyen numuneler

#### 1.2.2.4 Biyokimyasal Analizler:

Bu çalışmalar üç aşamalıdır. Değişik aşamalarda kullanılan deneysel yöntemler aşağıda verilmektedir.

##### 1.2.2.4.1. Protein İzolasyonu:

Proteinler sıvı nitrojende dondurulmuş yaprak dokusundan Damerval ve arkadaşları (4) yöntemine göre izole edilir. Doku toz haline gelinceye kadar sıvı nitrojen altında havanda öğütülür. 10 % trikloroasetik asit ile 20 µl β-merkaptöetanol içeren aseton çözeltisi ile ekstrakte edilir. Santrifuj tüplerine konulup -20 derecede bekletilir. Proteinler 12000 g'de 20 dakika santrifüjlenerek çöktürülür. Süpernatant dökülerek çökelti yaklaşık %0.07 β-Mercaptoetanol içeren aseton çözeltisi içerisinde süspansiyon haline getirilir ve bir saat bekletilir. Proteinler 12000 g'de 20 dakika sentrifüjlenerek toplanır. Süpernatant dökülür. Çökelti %0.07 β-Merkaptoetanol içeren aseton çözeltisi içinde süspansiyon hale getirilir ve 1 saat beklenir. Proteinler 12000 g'de 20 dakika sentrifüj edildikten sonra toplanır. Çökelti vakum altında kurutulur ve -20 derecede saklanır.

##### 1.2.2.4.2. 1D SDS-PAGE

Protein numuneleri 200-500 µl Laemmli numune tamponunda (0.0625 M Tris pH:6.8, %10 gliserol, %2 SDS ve 0.65 M β-Merkaptoetanol) çözülür. Numuneler 3-5 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Çözülmeyen kısım 13000 g'de 10 dakika sentrifüj edilerek çöktürülür. Süpernatant temiz ependorf tüplere alınarak -20 derecede saklanır. Numunelerin protein derişimleri BSA standart kullanılarak Bradford (1976) yöntemine göre tayin edilir.

Proteinler Laemmli (1970) yöntemi kullanılarak elektroforez edilir. Protein numuneleri (40 mg'a kadar) %5'lik staking ve %12'lik ayırıcı poliakrilamid jel kullanılarak hazırlanmış 1 mm kalınlığında ve 16-20 cm uzunluğundaki dikey jele (Biorad Jel Elektroforez sistemi) uygulanır. Jel'e 25mA olacak şekilde yaklaşık 6 saat süre ile sabit akım uygulanır. Bromfenol blue boyası jelin sonuna geldiğinde elektroforez işlemi durdurulur. Ayırıcı tampon olarak 1.5 mM Tris pH:8.8, %0.02 SDS ve 38.4 mM glycine kullanılır.



Elektroforez işlemi sonunda jeller 1 saat kadar %12 asetik asit ve %50 metanol içeren solusyonda fikse edilir. Jeller gümüş boyama tekniği ile boyanarak (Blum 1985) oluşan protein bantları fotoğraf ile tespit edilir. Jeller daha sonra selofan filimler arasında kurutulup saklanır.

#### 1.2.2.4.3. 2D SDS-PAGE

Bu yöntemde proteinler ilk olarak isoelektrik noktalarına göre izoelektrik odaklama elektroforezi (IEF) ile ayrıştırılıp ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına göre standart SDS-PAGE ile aydıştırılırlar. IEF elektroforezi Hochstrasser ve arkadaşlarının (1988) yönteminin laboratuvarımızda modifiye edilmiş şekli ile (Naqvi ve arkadaşları 1994) uygulanmıştır.

IEF jel solusyonu, üre (10 g), 5-8 amfolin (0.2 ml), 3-10 amfolin (0.8 ml), CHAPS/NP-40 (1 ml), TEMED (5 µl) ve amonyum persulfat (APS)(10 ul), %30/0.8 akrilamit/bisakrilamit (3 ml) ve distile su (6.5 ml) ve daha önceden hazırlanıp IEF solusyonunda çözülmüş 100 µg tekabül edecek proteinden numunelerinden oluşturulur. Bu solusyon 1.5 mm iç çapında 160 mm uzunluğundaki altı parafilm ile kaplanmış cam tüplerin içine dökülür. Polimerleşme sırasında jel üzerine 5ul kadar 1:2 sulandırılmış TEMED ve APS içermeyen IEF jel solusyonu konur.

Polimerleşmeyi takiben, tüplerin alt kısmındaki parafilm çıkarılır ve tüpler elektroforez cihazına yerleştirilir (Biorad). Katod solusyonu olarak 20 mM NaOH ve anod solusyonu olarak 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> kullanılır. Elektroforez işlemi başlatılır ve 2 saat süre ile 400V voltaj uygulanır. Daha sonra 800V 14 saat (toplam 12,000 Volt-Saat) olacak şekilde elektroforez işlemine devam edilir. Elektroforez sonunda jeller tüplerden çıkartılır ve ikinci boyut için SDS-PAGE jel sistemine tabi tutulurlar.

İkinci boyut için %12 SDS-PAGE jelleri (160x160x1.5 mm) bir önceki bölümde (1.2.2.4.2) izah edildiği şekliyle hazırlanır ve tüp jeller SDS-PAGE jellerinin üstüne yatay bir şekilde oturtulur. Elektroforez işlemi 10 derecede 20mA/jel olacak şekilde 6-7 saat süre ile yapılır. Elde edilen jeller bir önceki bölümde açıklandığı gibi muamele edildikten sonra gümüş boyama ile görüntülenir.

#### 1.2.2.4.4. Gümüş Boyama Tekniği

Jellerdeki proteinler gümüş nitrat kullanılarak Blum (1987) metoduna göre belirlenmişlerdir. Metodun detayları aşmalar halinde aşağıda verilmektedir. Proteinler Comassif mavisi kullanılarak da boyanabilir. Ancak bu çalışmada bu yöntem kullanılmadığı için verilmemiştir.

<sup>35</sup>S-Methionine ile işaretlenmiş proteinlerin profilleri ise fluorografik analizle belirlenmiştir. Fluorografik analiz için fiksatif solusyonla muamele edilmiştir. Jeller glaysial asetik asit içerisinde 5 dakika süre ile bırakılırlar. Daha sonra 1 saat süre ile glaysial asetik asit solusyonu içerisinde hazırlanmış %20 PPO (2,5 Difenylokzazole) ile muamele edilir. Bir saat sonunda solusyon dökülür ve jellerin üzerine damıtık su ilave edilerek PPO'nun kristalleşmesi sağlanır. (Jeller beyaz kalın tabaka görünümünü alır). Jeller daha sonra iki selofan tabaka arasında fan karşısında kurutulur. Kurutulmuş jellerin üzerine film kaseti içerisinde ve karanlık odada X-Ray filmleri (Agfa CurixXP) yerleştirilir. Bu şekilde -70 derecede 10-15 gün bekletilirler. Daha sonra karanlık odada Agfa G-350 fiksatif ve Agfa G-150 developer kullanılarak banyo yapılır. Elde edilen filimlerin fotoğrafları çekilir.

Aşama	Kullanılan Solusyon	Uygulama Süresi <sup>a</sup>
1. Fiksasyon	50 % Metanol, 12 % Asetik Asit 0.5 ml of 37% Formaldehid	> 1 saat
2. Yıkama	50 % Etil Alkol	3 × 20 dakika
3. Ön muamele	Sodyum tiyosulfat.5H <sub>2</sub> O (0.2 g/l)	1 dakika <sup>b</sup>
4. Durulama	Distile su	3 × 20 saniye <sup>b</sup>
5. Uygulama	Gümüş nitrat (2 g/l) 0.75 ml 37 % Formaldehid	20 dakika
6. Durulama	Distile su	3 × 20 saniye
7. Görüntüleme	Sodyum bikarbonat (60 g/l) 0.5 ml 37% Formaldehid Sodyum thiosulfat.5H <sub>2</sub> O (4 mg/l)	10 dakika <sup>c</sup>
8. Yıkama	Distile su	2 x 2 dakika
9. Durdurma	50 % Metanol, 12 % Asetik Asit	10 dakika
10. Yıkama	50 % Metanol	> 10 dakika <sup>d</sup>

a) 1'den 10'a kadarki aşamalar oda sıcaklığında sallayıcı üstünde yapılır.

b) Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için belirtilen sürelerle kesinlikle uyulması gerekir.

c) Proteinlerin bantlarının görüntülerinin oluşma süresi jeldeki miktarlarına bağlıdır.

d) 10'uncu aşamadan sonra jeller saklanmak amacı ile 4 dereceye alınabilir.

### 1.3. BULGULAR

#### 1.3.1. Sıcaklık Stresinin Fotosistem-II Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sıcaklık stresinin fotosistem-II (PS-II) aktivitesi üzerine etkisi materyal ve metodlarda anlatıldığı gibi DCPIP elektron tutucusu kullanılarak thylakoid zarlar üzerinde yapılmıştır. DCPIP nin absorbansında 590nm de meydana gelen azalma zamana karşı kaydedilmiş, çizilen eğrilerin eyimlerinden başlangıç hızı hesaplanmış ve PS-II aktivitesi olarak ifade edilmiştir. Şekil 1.1 de Tosun çeşidi için aktivite ölçümleri verilmiştir. Ölçümler beş ayrı set deneyle tekrarlanmıştır. Grafikten görüldüğü gibi en yüksek aktivite kontrol numunelerinde ( $C_{RT}$ ) sıcaklık stresi uygulanmamış) gözlenmiştir. En düşük aktivite kontrol numunelerinden izole edilen thylakoid zarların 40 derecede 10' süre ile muamelesinden sonra alınan ölçümlerde gözlenmiştir. ( $C_{40}$ ). Öncül sıcaklık stresi uygulanmış numuneler (37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulaması sonunda thylakoid zar izole edilmiş, ikinci sıcaklık stresi thylakoid zarlar üzerinde 40 derecede 10' olmak üzere uygulanmış ve ölçümler kaydedilmiştir ( $HS_{40}$ ) ve ikinci stres uygulanmamış numunelerden ölçümler oda sıcaklığında alınmıştır. ( $HS_{RT}$ ). Deneyler diğer buğday çeşitlerinden, Kharcia, Bezostaya, Çakmak ve Gerek için aynı şekilde tekrarlanmıştır. Sonuçlar kontrol yüzdesi olarak, % koruma şeklinde Tablo 1.I de verilmiştir. PS-II aktiviteleri hem kontrol (C) hemde sıcaklık stresi uygulanmış numunelerde (HS) aşağıda belirtilen şekilde hesaplanmıştır :

$$(C_{40}/C_{RT}) * 100 \quad \text{ve} \quad (HS_{40}/HS_{RT}) * 100$$

$C_{40}$  : Kontrol numunelerinden izole edilen thylakoid zarlar 10' 40 derecede sıcaklık stresi uygulandıktan sonra PS-II ölçümleri alınmıştır.

$C_{RT}$  : Kontrol numunelerin PS-II ölçümleri oda sıcaklığında alınmıştır.

$HS_{40}$  : 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerin thylakoid zarları izole edilmiş ikinci sıcaklık stresi 40 derecede 10' uygulanmış ve PS-II ölçümleri yapılmıştır.

HS<sub>RT</sub> : 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerin thylakoid zarları izole edilmiş ve PS-II ölçümleri ikinci stres uygulaması yapılmadan oda sıcaklığında ölçülmüştür.

### 1.3.2. Sıcaklık Srtesinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi

Hücre zarı geçirgenliği iyon kuvveti ölçümleri ile Marsch ve arkadaşları (1985) yöntemine göre yapılmıştır. 37 derecede 20 saat sıcaklık stresi uygulanmış yaprak numuneleri kullanılmıştır. Yaprak numuneleri dH<sub>2</sub>O su içerisinde 50 derecede (HS) veya oda sıcaklığında (C) 1 saat bekletilirler. Numuneler daha sonra 4 derecede 24 saat bekletilir ve iyon kuvveti ölçülür R<sub>1</sub> : (hücre zarından sızan iyonların derişimi). Aynı numuneler -20 derecede 24 saat bekletilir ve iyon kuvveti ölçülür R<sub>2</sub> :(toplam iyon kuvveti). R<sub>1</sub>/ R<sub>2</sub> değeri hesaplanır, difüz eden iyonların hücre içindeki toplam iyonlara oranını göstermektedir. Her çeşit için yedi ayrı deney yapılmıştır. Hücre zarında meydana gelen yaralanma aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ yaralanma} : \left\{ 1 - \frac{(1 - (T_{R_1}/T_{R_2}))}{(1 - (C_{R_1}/C_{R_2}))} \right\}$$

Yedi ayrı deneyin ortalaması alındıktan sonra sonuçlar Şekil 1.2 de gösterilmiştir.

### 1.3.3. TTC Canlılık Testi

Bu test canlı hücrelerin 2,3,5 triphenyl tetrazolium (TTC) tuzunun mitokondrial elektron zincir sistemi tarafından redüklenmesi esasına dayanmaktadır. TTC solusyonu orjinal olarak renksiz olup, redüklenme sonunda kırmızı-kahverengine dönüşmekte, buda spektrofotometrik olarak 485 nm de kaydedilebilmektedir. Absorbansdaki artış mitokondrial aktivite olarak ifade edilmektedir.

Her bir çeşit için % canlılık metodlarda izah edildiği gibi hesaplandı ve deneyler beş kere farklı zamanlarda ve aynı koşullarda büyütülen bitkiler üzerinde tekrarlandı. Deney sonuçlarının ortalama değerleri Şekil 1.3 de verilmektedir.

#### 1.3.4. 1D-SDS-PAGE

Proteinler 37 derecede 20 saat sıcaklık stresi uygulanmış ve kontrol bitkilerin yapraklarından izole edildi. %12 lik SDS-PAGE jelleri üzerinde ayrıldıktan sonra gümüş boyama ile protein bantları belirlendi (Şekil 1.4). Bir boyutlu 1D SDS-PAGE ve gümüş boyama ile sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinlerin gözlenemediği görüldü. Deneylere iki boyutlu 2D SDS-PAGE çalışmaları ile devam edildi.

#### 1.3.5. 2D-SDS-PAGE

Buğday bitkilerinin yaprak numunelerinden izole edilen protein numuneleri materyal ve metodlarda belirtildiği gibi ilk önce isoelektirik focuslama (IEF) ile daha sonrada moleküler ağırlıklarına göre SDS-PAGE kullanılarak ayrıldılar. Protein profilleri gümüş boyama ile belirlendi. Protein elektroforez sonuçları sonuçları sırası ile Tosun, Karchia, Bezostaya, Gerek, Çakmak, ES-91 çeşitlerinde a) Kontrol, b) Sıcaklık stresi olmak üzere Şekil 1.4 den Şekil 1.9 a kadar verilmiştir. Sıcaklık stresi sonunda düşük moleküler ağırlıklarında (16-18 kD) ve pI değerleri 6.0-7.0 civarında yaklaşık 16 farklı sıcaklık stresi proteinlerinin sentezlendiği görülmüştür. Bu proteinler şematik olarak Şekil 1.10 da gösterilmiştir. Proteinlerin buğday çeşitlerine göre dağılımı Tablo 1.II de gösterilmektedir.

### 1.4. TARTIŞMA

Çalışmanın bu kısmında sıcaklık stresi altında buğday bitkisinin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tanımlanması ve dayanıklı çeşitlerin seçilmesi amaçlanmıştır. Fotosentez aktivitesi bitkinin yaşamı için en önemli kısım teşkil etmekte olup, PS-II aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin saptanması farklı laboratuvarlarda da kullanılmaktadır

(Pearcy ve arkadaşları 1977, Chetti ve Nobel 1987; Gombos ve arkadaşları 1994) Simillie ve Hethelpton 1987 yılında yaptıkları çalışmada yaprakta değişen floresans ölçümlerinin sıcaklık stresine dayanıklılığın tespiti için potansiyel bir çeşit seçme tekniği olduğunu önesürmüşlerdir. Klorofil floresans tekniği daha sonra farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Bruke 1990, Chasompongpan ve arkadaşları 1990, Yücel ve arkadaşları 1992).

Bu çalışmada PS-II aktivite ölçümleri sıcaklığa dayanıklı bitkilerin tespitinde kullanılmıştır. Öncül sıcaklık muamelesi ile 37 derecede PS-II nin ikinci bir sıcaklık stresinden korunduğu gözlenmiştir (Tablo 1.1). Beş değişik buğday çeşidi içinde en yüksek korunma Tosun çeşidinde görülmüştür.

Kontrol değerlerindeki yüksek olması nedeniyle Tosun çeşidinin genetik olarak dayanıklı bir çeşit olduğu görüşüne varılmıştır. Öncül sıcaklık muameleleri ile Bezostaja ve Kharachia da PS-II aktivitelerinde ikinci sıcaklık uygulamasında önemli bir artış gözlenmiştir. Gerek çeşidinde de belirli bir artış vardır ancak Çakmak da (Durum çeşidi) herhangi bir korunma gözlenmemiştir.

Hücre zarı hücrelerin en önemli kısımlarından birini teşkil etmekte olup sıcaklık stresi hücre zarı akışkanlığını ve geçirgenliğini etkilemektedir. Sıcaklık stresini takiben yaprak parçacıkları damıtık suda bırakıldığında açığa çıkan ionların kuvveti hücre zarının dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir. Hücre zarlarının sıcaklığa dayanıklılık testi olarak domates , soya fasülyesi, patates, buğday, bezelye ve sorghum gibi bitkilerde farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Martineau ve arkadaşları 1979, Blum ve Ebercan 1981, Chen ve arkadaşları 1982, Len ve arkadaşları 1984).

Bu çalışmada Kharchia hücre zarı dayanıklılığı açısından %81'e varan bir değerle en dayanıklı çeşit olarak görülmektedir. Diğer taraftan bir durum çeşidi olan Çakmak en hassas çeşit olarak bulunmuştur. Tosun, Bezostaja ve Gerek sıcaklık stresi altında orta derecede dayanıklılık sergilemektedir. Bu deneylerden sıcaklık stresi altında buğday çeşitlerinin hücre zarı dayanıklılığı bakımından genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiş ve bu metodun tarama yöntemi olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Sıcaklık stresinin mitokondrial aktivite üzerine etkisi TTC yaşam testi ile gösterilmiştir. Kontrol numuneler (sıcaklık stresi uygulanmamış) TTC tuzunu redükleme özelliğine sahipken 50 derecede sıcaklığa maruz kaldıktan sonra bu özelliklerini kaybetmektedirler. Diğer taraftan 37 derecede öncül sıcaklık stresine tabi olan numuneler hem 50 derecede hemde oda sıcaklığında yüksek TTC redükleme başka bir deyişle mitokondriyel aktivite göstermektedirler. Bu çalışma ile iki önemli nokta vurgulanmaktadır :

- Mitokondriyel aktivite sıcaklık stresine karşı lethal olmayan öncül sıcaklık muameleleri ile dayanıklılık kazanmaktadır.
- Sıcaklık stresi altında dayanıklı çeşitlerin seçilmesinde TTC canlılık testinin de tarama yöntemi olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Bu çalışmada Şekil 1.3 de görüldüğü gibi Tosun çeşidi % 80 değerle sıcaklığa dayanıklı çeşit olarak tespit edilmiştir. Kharachia %71 değerle onu takip etmektedir. Bezostaya %55 ile çalışılan buğday çeşitleri içinde en hassas olarak görülmüştür. Ancak Çakmak (Durum çeşidi) diğer testlerde sıcaklığa karşı hassas bir çeşit olarak tespit edilmiş olmasına rağmen TTC deneylerinde %69 gibi bir değerle oldukça dayanıklılık göstermiştir. Deneyler farklı zamanlarda aynı koşullarda büyütülen bitkiler üstünde 5-6 kez tekrarlandığı için deneysel hata yoktur.

Çalışmalarımızda fizyolojik tarama yöntemlerinin yanısıra sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinlerin profilleride elektroforetik yöntemlerle tespit edilmiştir. Bitkiler sıcaklık stresi altında yüksek molekül ağırlığında bir grup sıcaklık stres proteinleri sentezledikleri halde düşük moleküler ağırlıklarında sentezlenen proteinlerin (15-25 kD) tür ve çeşitlere göre farklılık göstermeleri açısından önem kazanmışlardır. Bu proteinlerin sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinler oldukları farklı tahıl bitkilerinde 2 boyutlu SDS-PAGE elektroforez sistemi ile işaretlenmiş amino asitler ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) kullanılarak fluorografik yöntemlerle gösterilmiştir. (Ziv 1987, Sanchez ve Lindquist 1990, Kato ve arkadaşları 1993).

Çalışmalarımızda düşük moleküler ağırlığındaki sıcaklık stresi proteinleri 2 boyutlu SDS-PAGE kullanılarak ve gümüş boyama ile gösterilmiştir. Bu teknikle sıcaklık stresi altında sentezlenen proteinlerin çeşitler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ve sonuçlarımız



literatürlede uyum halindedir (Nguyen 1989). Şekil 1.10 da da görüldüğü gibi 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulanması sonucunda farklı buğday çeşitlerinin farklı sıcaklık stresi proteinleri sentezledikleri gözlenmiştir.

Bazı araştırmacılar sentezlenen sıcaklık stresi proteinleri ile hücre zarı dayanıklılığı arasında ilişki kurmaya çalışmışlardır. Ottaviano ve arkadaşları (1991) hücre zarı dayanıklılığı ile HSP17 arasında ilişki olup olmadığına bakmışlar ancak herhangi bir ilişki tespit edememişlerdir. Bizim çalışmalarımızda da Tosun ve Kharachia sığağa dayanıklı çeşitler olarak tespit edilmiş olmalarına rağmen sıcaklığa dayanıklılık özel bir proteine bağlanamamıştır. Bu da, farklı HSPlerin sıcaklık stresi altında hücre aktivitelerini korumada farklı fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir. Buna rağmen Tablo 1.II de de görüldüğü gibi sıcaklık stresi proteinleri çeşitlerin ve varyetelerin tanımlanmasında kullanılabilir.

## 1.5. KAYNAKLAR

Armond, D.I., Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, 24, 1-15, (1949).

Barraclough R., and Ellis, R.J., Protein synthesis in chloroplasts IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulosebiphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts., *Biochim. Biophys. Acta.*, 608, 19-31, (1980).

Beaulieu, E.E., Steroid hormone antagonists at the receptor level: A role for the heat shock protein MW 90,000 (hsp 90) , *J. Cell Biol.*, Vol. 35, 161-174, (1987).

Berry, J.A., Fork, D.C., and Garrison, S., Mechanistic studies on thermal damage to leaves., *Carnegie Inst. Washington Yearbook* 74, 751-759, (1975).

Berry, J., and Bjorkman, O, Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, 491-543, (1980).

Blum, A., and Ebercon, A., Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat, *Crop Sci.*, 21, 43-47, (1981).

Burke, J.J., Ditto, C.L., and Amtzen, C.J., Involvement of the light harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts, *Archs. Biochem. Biophys.*, 187, 252-263, (1978).

Burke, J.J., Variation among species in the temperature dependence of reappearance of variable fluorescence following illumination, *Plant Physiol.*, 93, 652-665, (1990).

Chasompongpan N., Li P.H., Davis D.W., Markhart A.H., Photosynthetic responses to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimation potential, *Crop Science*, 30, 100-104, (1990).

Chetti, M.B., and Nobel P.S., Recovery of photosynthetic reactions after high temperatures of a heat tolerant cactus, *Photosynth. Res.*, 18, 277-286, (1988).

Chirico, W.J., Waters, M.G., and Blobel, G., 70 KD heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes., *Nature.*, 332, 805-810, (1988).

Chen, Q., Lauzon, L., DeRocher, A., and Vierling, E., Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein., *J. Cell. Biol.*, 110, 73-1883, (1990).

Cooper, P., and Ho, T.H.D., Intracellular localization of heat shock proteins in maize., *Plant Physiol.*, 84, 1197-1203, (1987).

DiDomenico, B.J., Buqaisky, G.E., and Lindquist S., The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell.*, 1, 593-603, (1982).

Gombos, Z., Wada, H., Hideg, E., and Murata, N., The unsaturation of membrane lipids stabilizes photosynthesis against heat stress., *Plant Physiol.*, 104, 563-567, (1994).

Hurkman WJ, Tanaka CK, Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: A comparison using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 9, 781-787, (1988).

Hurkman WJ, Tanaka CK, DuPont FM., The effect of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots, *Plant Physiol.* 88, 1263-1273, (1988).

- Hurkman WJ, Fornari CS, Tanaka CK. A comparison of the effect of salt on polypeptides and translatable mRNA in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of barley. *Plant Physiol.* 90, 1444-1456, (1989).
- Kelley, P.M., and Schlesinger, M.J., The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblast. *Cell*, 15, 1277-1286, (1982).
- Key, J.L., Lin, C.Y., and Chen, Y.M., Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 526-3530, (1981).
- Key, J.L., Kimpel, J., Vierling, E., Lin, C.Y., Nagao, R.T., Czamecka, E., and Schoffl, F., Physiological and molecular analyses of the heat shock response in plants. In: *Changes in eucaryotic gene expression in response to environmental stress.*, (Atkinson, B.G., and Walden, D.B., eds Academic Press, Orlando, (1985).
- Kloppstech, K., Meyer, G., Schuster, G., and Ohad, S.G., Synthesis, transport and localization of nuclear coded 22 KD heat shock protein in the chloroplast membrane of peas and chlamydomonas. *EMBO J.*, 1, 1901-1909, (1985).
- Krause, G.H., Santarius, K.A., Relative thermostability of the chloroplast envelope. *Planta*, 127, 285-299, (1975).
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R.B., Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kD heat shock protein. *EMBO J.*, 4, 3137-3143, (1985).
- Lin, C.Y., Chen, Y. M., and Key, J.L., Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes. *Plant. Cell. Physiol.*, 26, 1493-1498, (1985).
- Lindquist, S., The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 39-72, (1986).
- Lindquist, S., and Craig, E.A., The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 631-977, (1988).
- Mansfield, M.A., and Key, J.L., Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. *Plant Physiol.*, 84, 1007-1017, (1987).
- Martineau, J.R., Specht J.E., Williams, J.H., and Sullivan, C.Y., Temperature tolerance in soybeans I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop. Sci.*, 19, 75-78, (1979).
- McAlister, L., Strausber, A., Kulaga, A., and Finkelstein, D.B., Altered patterns of protein synthesis induced by heat shock of yeast. *Curr. Genet.*, 1, 63-74, (1979).
- Nachlas, M.M., Marguiles, S.I., and Seligman, A.M., Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. *J. Biol. Chem.*, 235, 2739-2743 (1960).
- Nanba, O., and Satoh, K., Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 109-112, (1986).
- Neumann, D., Nover, L., Parthier, B., Rieger, R., Scharf, K.D., and Wollfieh, R., Nieden, U.Z., Heat shock and other stress response systems of plants. *Biol. Zentrabl.*, 108, 1-156, (1989).
- Nishiyama, Y., Kovacs, E., Lee, C.B., Hayashi, H., Watanabe, T., and Murata, N., Photosynthetic adaptation to high temperature associated with thylakoid membranes of *Synechococcus* PCC7002. *Plant Physiol.*, 34, 337-343, (1993).
- Nover, L., Scharf, K.D., and Neuman, D., Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of m-RNA's. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1298-1308, (1989).

- Pearcy, R.W., Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* ( Torr ) Wats . *Plant Physiol.*, 61, 484-486, (1978)
- Raison, J.K., Berry J.A., Armond P.A., and Pike C.S., "Membrane properties in relation to the adaptation of plants to temperature stress.", In: *Adaptation to water and high temperature stress*, (Turner N.C., Kramer P.J. Eds), 261-273, John Wiley & Sons, New York, (1980).
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M., and Berry J.A., Correlations between the thermal stability of chloroplast membranes and the composition of fluidity of their polar lipids upon accumulation of the higher plant *Nerium oleander* to growth temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 218-228, (1982).
- Ramagopal S., Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 94-98, (1987a).
- Ramagopal S., Salinity stress induced tissue specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol.* 84, 324-331, (1987b).
- Sanchez, Y., and Lindquist, S.L., HSP 104 required for induced thermotolerance, *Science*, 258, 1112-1115, (1990).
- Schuster, G., Even, D., Klopstsch, K., and Ohad, I., Evidence for protection by heat shock proteins against photoinhibition during heat shock, *EMBO J.*, 7, 1-6, (1988).
- Shirata K., Takagishi H Salt-induced accumulation of 26 and 27 kD proteins in cultured cells of rice plant, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36, 153-157, (1990).
- Steponkus, P.L., and Lanphear, F.O., Refinement in the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury, *Plant Physiol.*, Vol. 42, 1423-1426, (1967).
- Steponkus P.L., "Responses to extreme temperatures. Cellular and sub-cellular bases.", In: *Physiological Plant Ecology. I. Responses to the Physical Environment*. (Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H., Eds), 371-414, Springer-Verlag, Berlin, (1981).
- Sullivan, C.Y., "Mechanism of heat and drought resistance in grain sorghum and methods of measurement." In: *Sorghum in Seventies*. (Rao, N.G.P., and House, L.R., eds), Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, India, (1972).
- Sundby, C., and Andersson, B., Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of PS II regulates its dissociation with LHC II, *FEBS Lett.*, 191, 24-27, (1985).

Tissières, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M., Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* relation to chromosome puffs, *J. Mol. Biol.*, 84, 389-398, (1974).

Towill, L.E., and Mazur, P., "Studies on the reduction of 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures.", *Can. J. Bot.*, Vol. 53, 1097-1102, (1975).

Vermaas, W., Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 44, 457-481, (1993).

Vierling E., Nagao R.T., Rocher D.A.E., and Harries L.M.. A heat shock protein localized to chloroplast is a member of eucaryotic superfamily of heat shock proteins. *EMBO J.* 7:575-581, 1988.

Vierling, E., The roles of heat shock proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 79-620, (1991).

Yardanov I., Goltsev V., Stoyanova T., Venediktov P., High temperature damage and acclimation of photosynthetic apparatus, *Planta*, 170, 471-477, (1987).

## 1.6. ŞEKİLLER

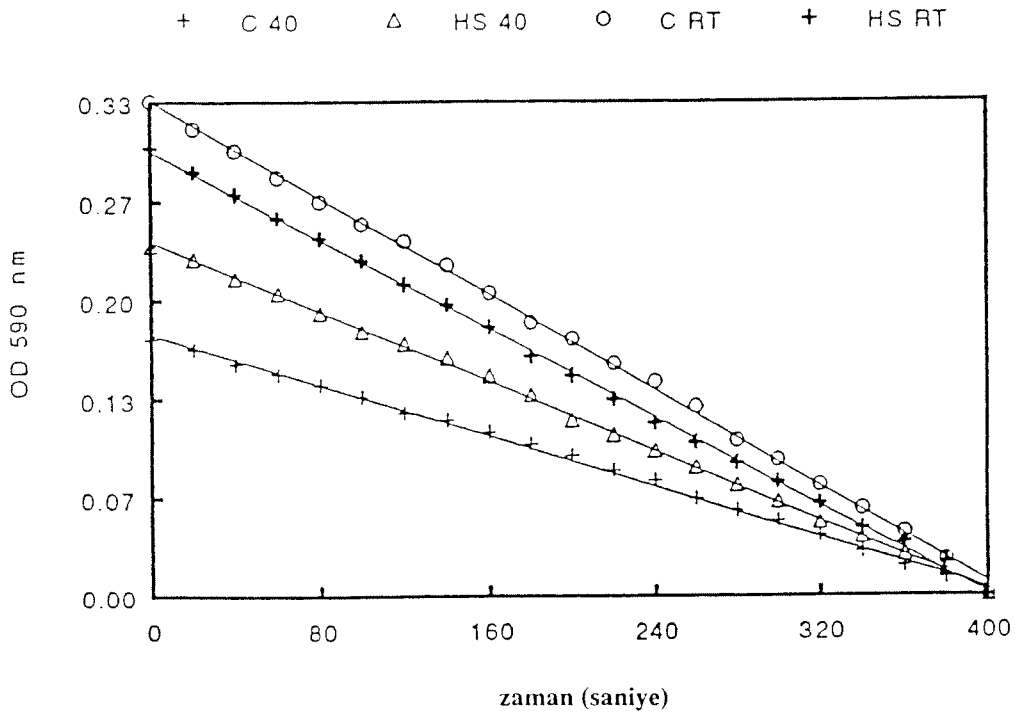
Tablo 1.1. 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresine tabi tutulmuş buğday çeşitlerinde fotosistem-II aktivitesinin ikinci bir sıcaklık şokundan (40 derece 10') korunması

BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	% KORUMA	
	KONTROL	SICAKLIK STRESİ
TOSUN	55	68
GEREK	34	50
BEZOSTAYA	30	58
KHARACHIA	34	57
ÇAKMAK	40	43

TABLO 1.II. Sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinlerin çeşitlere göre dağılımı.

Şekil 1.10 da gösterilip numarandırılan HSP ler çeşitlere göre gösterilmektedir. (+) Bahsi geçen HSP nin sentezlendiğini, (-) HSP nin bahsi geçen çeşitte sentezlenmediğini göstermektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Tosun	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Gerek	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Bezostaja	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Karchia	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Cakmak	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
ES-91	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-



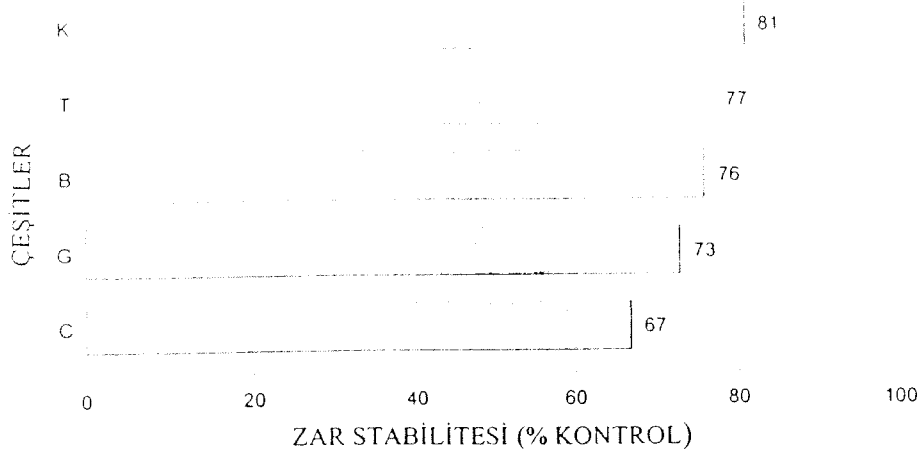
Şekil 1.1. Tosun çeşidinin PS-II aktivite grafikleri.

C<sub>40</sub>: Kontrol numunelerinden izole edilen thylakoid zarlar 10' 40 derecede sıcaklık stresi uygulandıktan sonra PS-II ölçümleri alınmıştır.

C<sub>RT</sub>: Kontrol numunelerin PS-II ölçümleri oda sıcaklığında alınmıştır.

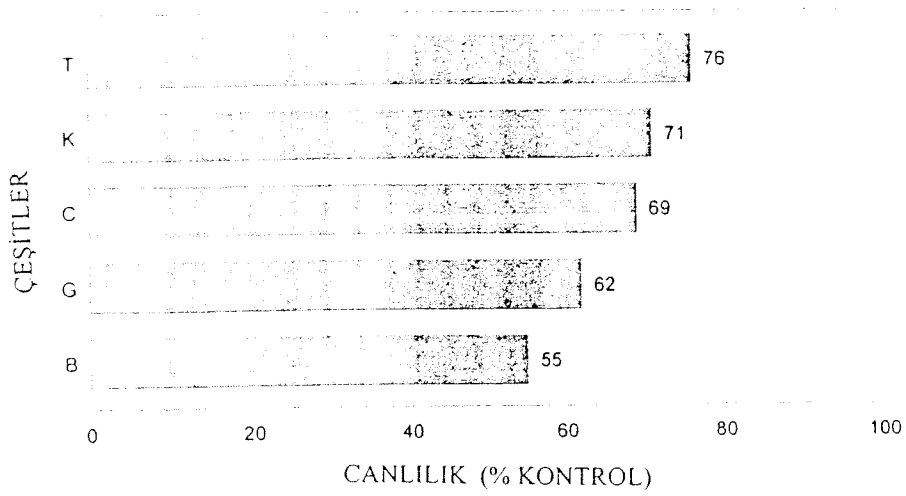
HS<sub>40</sub>: 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerin thylakoid zarları izole edilmiş ikinci sıcaklık stresi 40 derecede 10' uygulanmış ve PS-II ölçümleri yapılmıştır.

HS<sub>RT</sub>: 37 derecede 20 saat süre ile sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerin thylakoid zarları izole edilmiş



Şekil 1.2. Hücre zarı geçirgenlik testinin sonuçları..

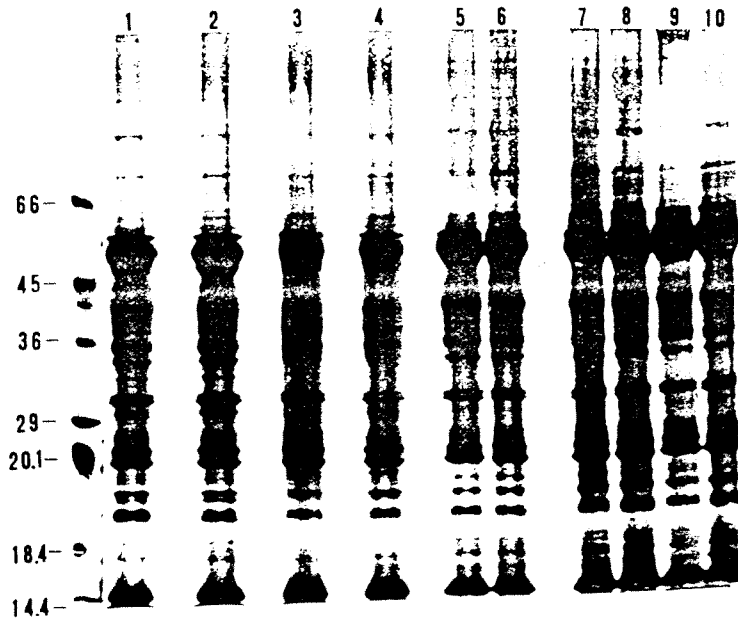
T: Tosun, K: Kharachia, B: Bezostaya, G: Gerek, Ç: Çakmak. Sonuçlar farklı zamanlarda aynı koşullar altında büyütülmüş bitkilerden yapılan yedi ayrı deney sonuçlarının ortalaması olarak verilmiştir.



Şekil 1.3. TTC canlılık testinin sonuçları.

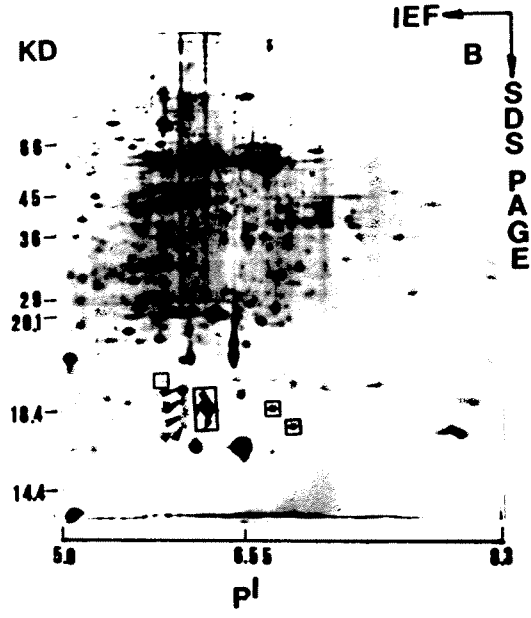
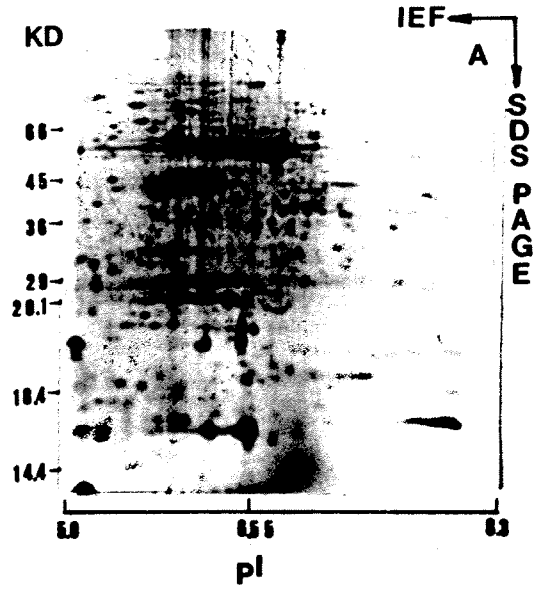
T: Tosun, K: Kharachia, B: Bezostaya, G: Gerek, Ç: Çakmak. Sonuçlar farklı zamanlarda aynı koşullar altında büyütülmüş bitkilerden yapılan beş ayrı deney sonuçlarının ortalaması olarak verilmiştir.





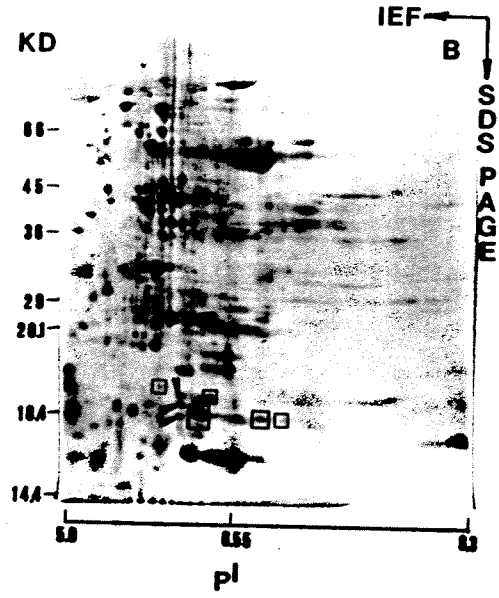
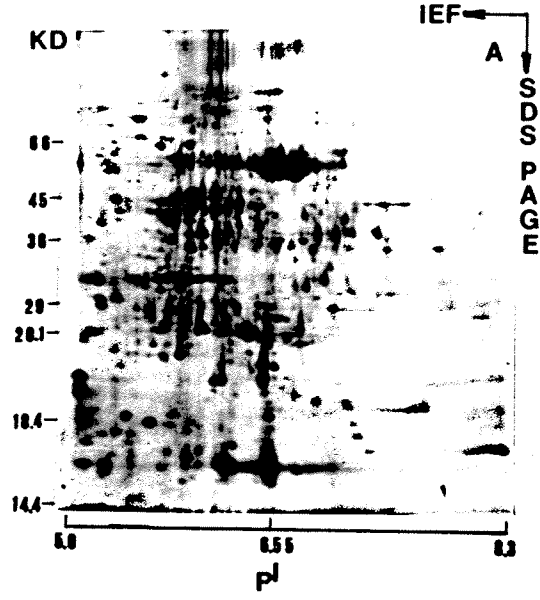
Şekil 1.4. Deneylerde kullanılan değişik buğday çeşidinin yaprak proteinlerinin 1D-SDS-PAGE profilleri.

Soldan sağa kolan sıralaması:- Moleküler ağırlık markörleri (Yukarıdan aşağı:94, 66, 45, 30, 21.1 kD), İlk 7 kolon : Çakmak, Bezostaya, Kharachia, Tosun, Gerek ve Yayla kontrol numuneler; Sonraki 7 kolon aynı çeşitlerin 37 derecede 20 saat sıcaklık stresi uygulanmış numunelerinin protein profillerini göstermektedir. Jeller gümüş boyama ile görüntülenmiştir.



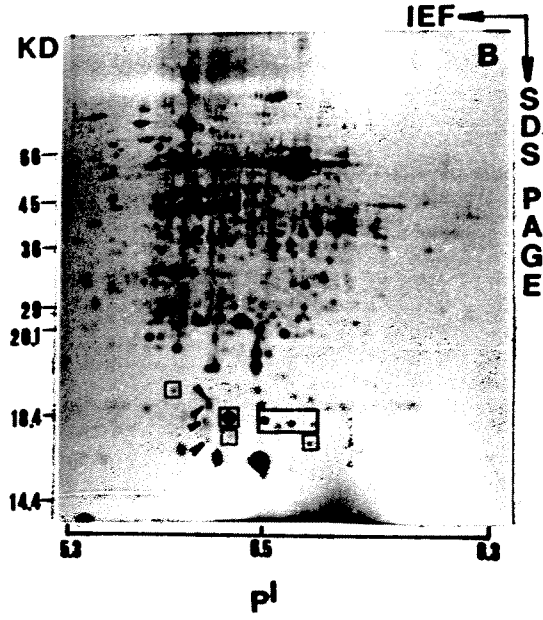
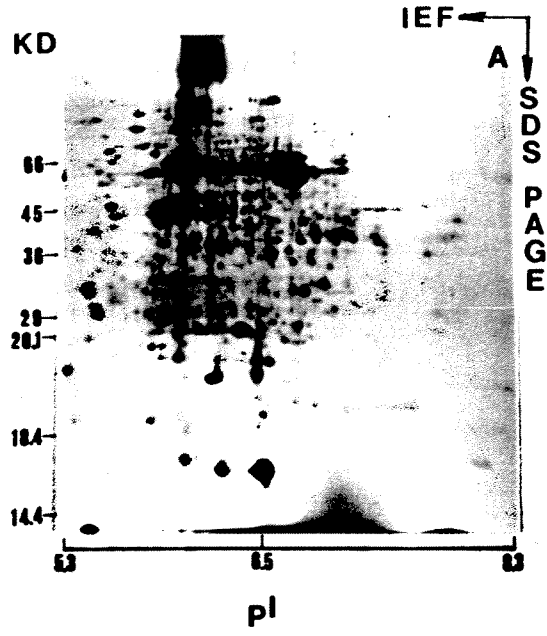
Şekil 1.5. Tosun çeşidinin 2D SDS-PAGE protein profilleri.

A: Kontrol, B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler.



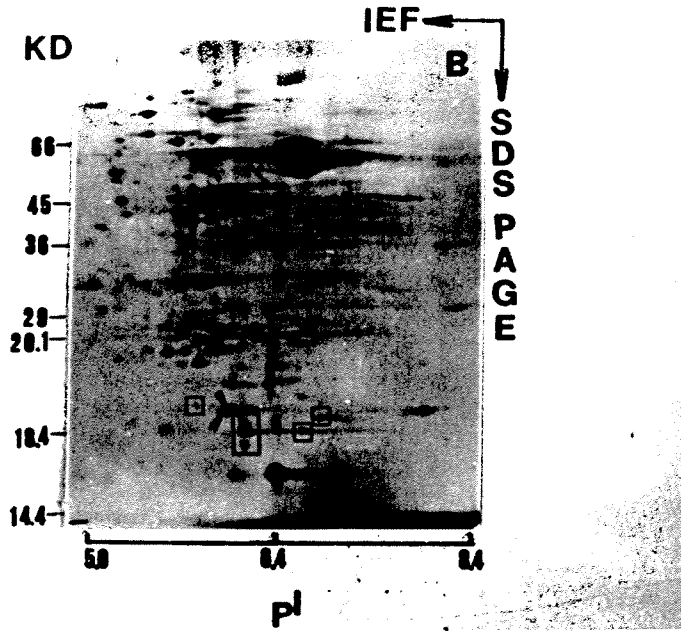
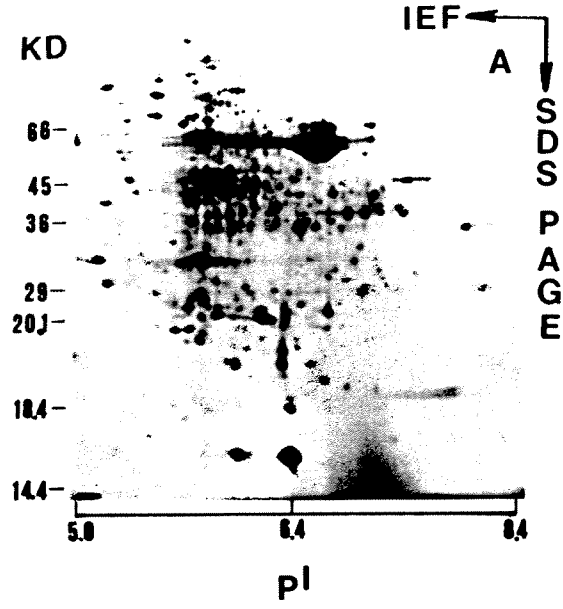
Şekil 1.6. Kharachia çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.

A: Kontrol,B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler.



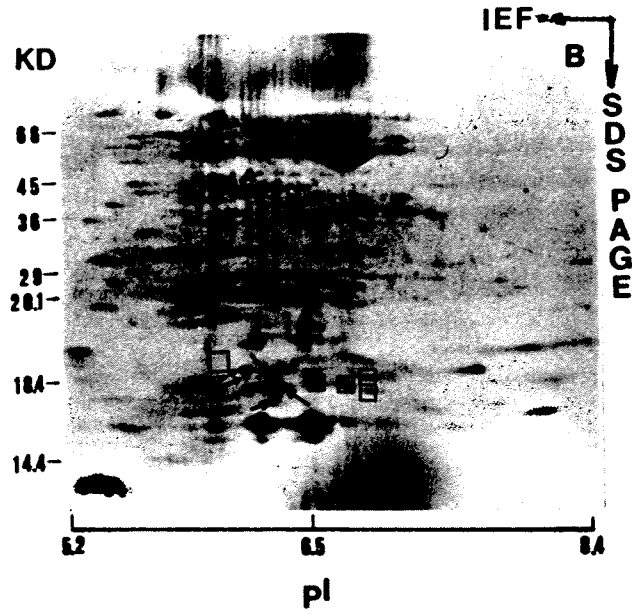
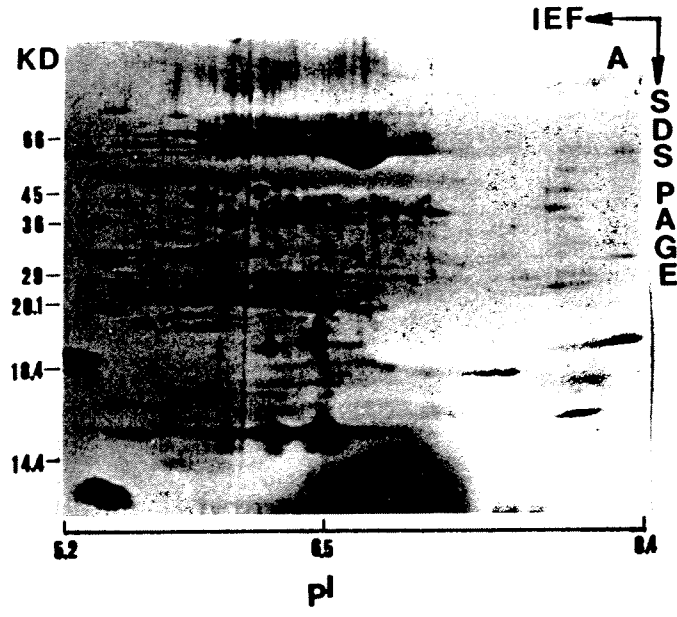
Şekil 1.7. Bezostaya çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.

A: Kontrol, B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler.



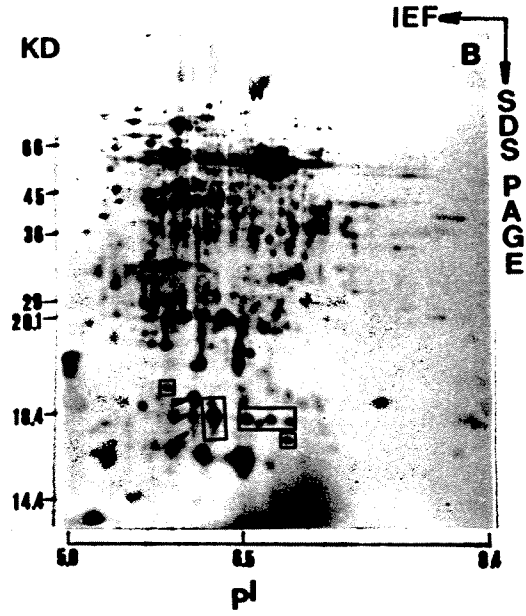
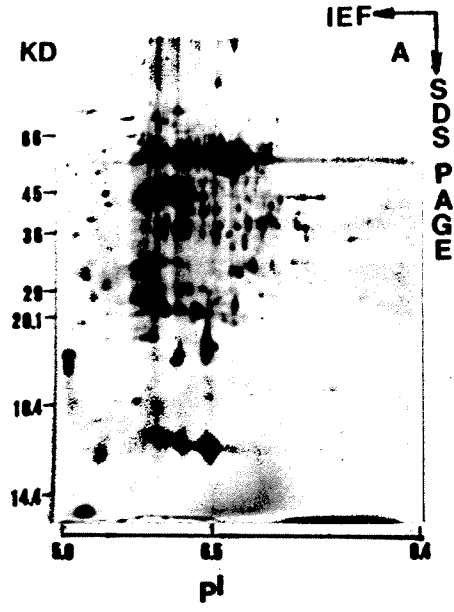
Şekil 1.8. Çakmak çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.

A: Kontrol, B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler.

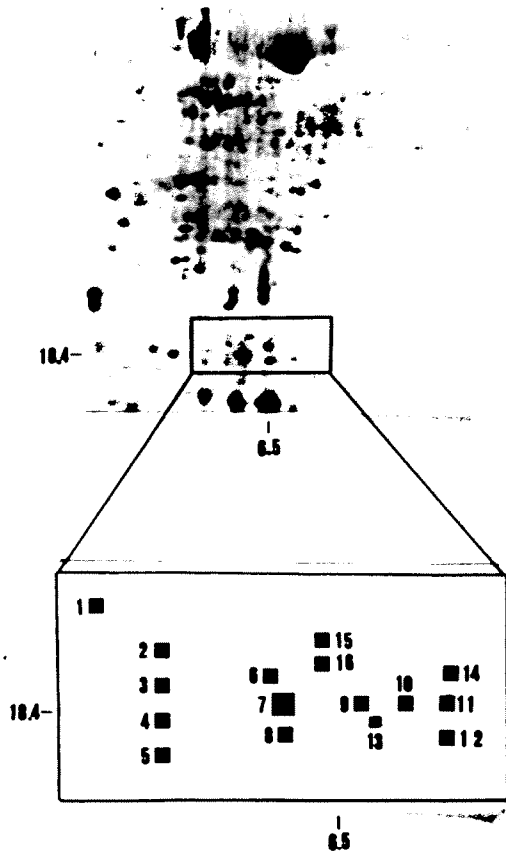


Şekil 1.9.A. ES-91 çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri.

A: Kontrol, B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler.



Şekil 1.9. Gerek çeşidinin 2D SDS PAGE protein profilleri  
 A: Kontrol, B: 20 saat 37 derece sıcaklık stresine tabi tutulmuş bitkiler



Şekil 1.10. Farklı buğday çeşitlerinde sıcaklık stresi altında sentezlenen yeni proteinler.

Tüm çeşitlerde sıcaklık stresi altında sentezlenen proteinler şematik olarak gösterilmiştir. Sentezlenen her yeni protein bir sayı ile işaretlenmiş ve bu sayılar Tablo 1.II de kullanılmıştır.



## 2. BÖLÜM TUZ STRESİ

### 2.1. GİRİŞ

#### 2.1.1. Tuz Stresinin Bitkilerde Oluşturduğu Etkiler

Tuz stresi bitkilerin büyümesini ve verimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Tuz stresi toprağın yapısına ve neme bağımlı olduğu kadar, ışık şiddeti, yüksek sıcaklık, rüzgar hızı gibi diğer çevre koşullarınada bağlıdır. Tuzluluk genel olarak suda ve toprakta çözülmüş belirli mineral tuzlarının derişimi olarak ppm veya mol/lit olarak ifade edilir. En belirgin tuz katyonları :  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $K^+$  olup anyonlar ise  $Cl^-$ ,  $SO_4^{-2}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $CO_3^{-2}$ , ve  $NO_3^-$  dir. Yüksek tuz derişimli sular ise Si, Li,  $SiO_2$ , Rb, Mo, Mn ve Al ihtiva ederler (Tanj 1989). Sulardaki ve topraktaki tuzun kaynağı öncelikle kayaların ve toprağın kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Örneğin sodalı toprak, doğal tuz yatakları, jeolojik oluşumlar, tuzlu yeraltı suları, suni sulama sonucu çözülebilir tuzların açığa çıkması, yağışlar (yağmurlar ve karların erimesi), yüzey buharlaşması gibi, tuz derişimini etkileyen en önemli faktörlerdir.

Kurak ve yarı kurak tarım alanlarında tahıl verimini arttırmak amacıyla yönelik olarak başlatılan suni sulama projeleri bir süre sonra toprakta tuz problemini meydana getirmektedir. Bilindiği gibi fazla tuz bitkilerin büyüme hızını azaltmakta ve verimin düşmesine neden olmaktadır. Bitkiler tuzlu ortamlarda gelişmeleri için gerekli olan enerjinin büyük bir kısmını topraktan su alabilmek ve tuza dayanıklı hale gelebilmek için biyokimyasal ayarlamalarda harcamaktadırlar. Tuza dayanıklılık bitkinin enerjisini etkin bir şekilde kullanabilme kapasitesine bağlıdır.

Bitki türlerinin büyük bir kısmı ve tahıl bitkilerinin bazıları (örneğin şeker pancarı, şeker kamışı, pamuk, kışkonmaz, ispanak gibi) tuza dayanıklı türlerdir. Ancak bu türler ekolojik açıdan farklı yörelerde farklı davranışlar göstermekte ve verimi etkilemektedir. Dolayısı ile tarım ekonomisi açısından tuza dayanıklı çeşitlerin seçilmesi önemlidir. Literatürde çimlenme ve büyümenin farklı evrelerinde tuza karşı hassasiyetle ilgili olarak tahıl bitkileri üzerinde çok az

bilgi mevcuttur. Tuza dayanıklılık hakkında gen seviyesinde ve genetik farklılık olarak çok az bilgi birikimi olması nedeniyle tuza dayanıklı tür ve çeşitlerin geliştirilmesinde bir gelişme kaydedilememiştir.

Şimdiye kadar literatürde yapılan çalışmalarda tuza dayalı tür ve çeşitler klasik dölleme yöntemleri kullanılarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu tür çalışmalarda tuza dayanıklılık kriterleri sırası ile şöyledir. Tuzlu topraklarda yaşamı devam ettirebilmesi, büyümenin durması, verimin azalması, yaprak sayısı, yaprak ve kök kuru ağırlığı, çiçek alma ve meyva tane sayısı gibi. Ancak bazı durumlarda verimle belirgin bir ilişki kurulamamıştır.

Tuza dayanıklı verimi yüksek bitki türlerinin geliştirilmesi için öncelikle tuza dayanıklılık mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması gerekmektedir.

### **2.1.2. Bitkilerin Tuz Stresine Karşı Gösterdiği Fizyolojik ve Biyokimyasal Tepkiler**

Tuz stresi karmaşık bir stres çeşidi olup kuraklık ve su stresi gibi diğer abiyotik stres faktörleri ile ilgilidir. Tuz stresi altında bitkiler değişik problemlerle karşılaşmaktadırlar. Bunlar,

- suyun azalması
- ozmotik basıncın artması
- tuz iyonlarının toksik etkileri

olarak sıralanabilir.

Bitkilerde meydana gelen hasarın derecesi stresin süresi, toksik iyonların derişimi, bitkinin dayanıklılığı veya hassasiyeti, veya su kaybına bağlıdır. Stres altında bitkilerde meydana gelen ve gözle görülebilir değişiklikler ise organ seviyesinde farklılıklar, örneğin kök/yaprak oranındaki değişimler, kök dokusunda farklı büyüme, fotosentezdeki yavaşlama şeklinde özetlenebilir.

Tuz stresi altında bitkilerde hücre seviyesinde ki değişikliklere baktığımızda;

- DNA metilasyonu,
- mRNA stabilitesinde kontrol,

- ozmoregülatant maddelerin (örneğin manitol, pinitol, gibi su tutucu şeker alkollerini, ve/veya prolin, glutamik asit, poliglisin gibi amino asit ve türevleri) depolanması
- Hücrede toksik etki gösteren  $\text{Na}^+$  iyonlarının hızla uzaklaştırılması : Bu olay kök hücre zarlarında veya tonoplast zarlarında bulunan kuvvetli bir  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  veya  $\text{Ca}^{2+}$  pompalama sistemleri veya  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport sistemleri ile gerçekleştirilir.
- Hücre zarı yapısında meydana gelen değişimler,
- Doymuş/Doymamış yağ asitlerinin oranlarındaki değişimler,
- Hücre zarı proteinlerinin dayanıklılığında gözlenen değişimler,
- Hücre zarı akışkanlığı ve geçirgenliğindeki değişimler
- Hücre içi haberleşme sistemlerindeki değişimler :  $\text{IP}_3$  reseptörleri ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarını etkileyen faktörler.
- Hormon düzeyinde meydana gelen değişiklikler
- Hücre içinde ubiquitin ve proteaz enzim seviyesinde gözlenen artışlar
- Fotosentez aktivitesindeki ve yollarındaki değişimler ( $\text{C}_3 \rightarrow \text{C}_4$ ) gibi olaylar gözlenebilmektedir.

Bütün bu metabolik olayların ışığında bitkiler tuza dayanıklı veya hassas olarak ayrılabilir. Son zamanlarda kullanılan model bitkilerle örneğin *ice plant*, *arbidopsis* ve maya üstünde yapılan çalışmalarla strese hassasiyet veya dayanıklılık mekanizmalarının çözüme ulaşabileceği düşünülmektedir (Bohnert 1995, Bohnert ve arkadaşları 1995).

Tuza dayanıklılık mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması ve ilgili genlerin tespiti tuza dayanıklı ve verimi yüksek bitkilerin gen mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmesi açısından önemlidir. Biyokimyasal tanımlamalar sonunda (Tarczynski ve arkadaşları 1993) bakterilerden mannitol 1-fosfat dehidrogenaz enziminin sentezinden sorumlu genin tütüne aktarılması normalde tuza karşı hassas olan bitkilerin tuza dayanıklı hale gelmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada ozmoregülatant maddelerin koruyucu etkileri gözönünde bulundurularak ,bu maddelerin hücre içiinde akümüülasyonunun bitkiyi tuza karşı dirençli hale getirdiği gözlenmiştir. Bu tip çalışmalar devam etmektedir. Benzeri şekilde Superoksid dismutaz (SOD) enziminin sentezinden sorumlu genin tütüne aktarılması ve elde edilen transgenik bitkilerin herbisit ve oksidatif strese karşı dayanıklılı hale geldikleri gösterilmiştir (Herouart ve arkadaşları 1993).

Bu çalışmalara hız kazandırmak amacı ile dayanıklı tür ve çeşitlerde bazı karakterlerin gen seviyesinde tanımlanması gerekmektedir. Bunun yanısıra dayanıklı türlerin hızlı bir şekilde taranabilmesi de önemlidir.

Projenin bu kısmında tuz stresinin fizyolojik ve biyokimyasal etkileri iki farklı tahıl bitkisinde çeltik (*Oryza sativa* L.) ve buğday (*Triticum aestivum*) da çalışılmıştır. Öncelikle tuz stresine dayanıklılık mekanizmasının anlaşılmasına yönelik olarak stres altında sentezlenen proteinlerin karakterizasyonuna ve hücre içindeki dağılımlarına bakılmıştır. Diğer çalışmalar ise Fotosistem-II aktivite testi, hücre zarı geçirgenliği gibi tekniklerle dayanıklı ve hassas çeşitlerin seçilmesine yöneliktir. Yürütülen çalışmalar raporun bundan sonraki bölümlerinde “Çeltikte Tuz Stresi” ve “Buğdayda Tuz Stresi” olmak üzere iki ayrı bölüm halinde verilecektir.

## **2.2. ÇELTİKTE TUZ STRESİ**

### **2.2.1. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

Çalışmalarımızda orijini Güney Doğu Asya olan *Oryza sativa* nın farklı çeşitleri kullanılmıştır. (Nona Bokra, Basmati, Taichung Native, IR28 ve IR29). Tohumlar Pakistan'dan Dr. Saqlan M.S. Naqvi tarafından getirilmiştir.

#### **2.2.1.1 Bitkilerin Büyütülmesi**

Tohumlar 15' süre ile %33 NaClO<sub>4</sub> içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur ve daha sonra steril su içerisinde yıkanır. Steril tohumlar MS ortamlarına (Murashige ve Skoog 1968) alınır. İhtiyaca göre ortam %3 sukroz ve %0.25 agar ihtiva eder. Ortamların pH'ı NaOH ile 5.8'e ayarlanır. Ortamlar otoklavlanarak steril edilmiştir. Tohumlar 5 ml MS ortamı içeren 20x1.5 cm cam tüpler içerisinde önce üç gün karanlıkta bırakılır ve daha sonra 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde 26 derecede 10 gün süre ile büyütülür.

### 2.2.1.2. Stres Uygulaması

Stres uygulaması 10 günlük bitkiler üstünde yapılır. Bitkiler MS ortamlarından alınır, köklere yapışık agar parçacıkları steril su ile yıkanır, fazla su filtre kağıdı ile alındıktan sonra stres ortamına transfer edilir. Tuz stresi % 0.5, 1.0 ve 2.0 derişimli NaCl içeren MS ortamlarında uygulanır. Stres uygulaması 24 saatden 120 saate kadar değişik zaman aralıklarında uygulanır. Stres uygulanmış ve kontrol bitkiler inkübatörde normal büyüme şartlarında bırakılırlar.

Uygulanan NaCl Tuz stresi sonunda sentezlenen proteinlerin diğer stres koşullarında sentezlenen stres proteinlerinden farklı olduğunun gösterilebilmesi amacıyla bitkiler Polietilen glikol (PEG), metal ionları, absisik asit (ABA) gibi diğer stres koşulları altında da çalışılmıştır.

- *PEG Stresi* : Çalışmalarda 8000 Moleküler ağırlıklı PEG kullanılmıştır. PEG %2 ve %5 olacak şekilde MS ortamına ilave edilerek, bitkiler yukarıda belirtildiği şekilde strese maruz bırakılırlar.
- *Metal Stresi*: Stres  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 $\mu\text{M}$ -10mM) ve CdCl (1 $\mu\text{M}$ -10mM) kullanılarak verilmiştir. Sözkonusu ionlar belirtilen derişimlerde MS ortamlarına eklenmiş ve bitkiler önceki bölümlerde belirtildiği şekilde strese maruz bırakılmışlardır.
- *ABA Stresi* : Stres 1mg/lt ve 3 mg/lt ABA derişimlerinde yukarıda belirtildiği şekliyle uygulanmıştır.
- *Sıcaklık Stresi* : Stres 40 derecede 48 saat olarak inkübatölerde uygulanmıştır.

Tüm stres uygulamalarından sonra yaprak ve kök numuneleri alınıp sıvı azot içerisinde dondurulur. Dokular -20 derecede kullanılıncaya kadar saklanır.

### 2.2.1.3. Protein İzolasyonu

Proteinler sıvı azotta dondurulmuş kök ve yaprak dokularından Damerval'ın yöntemine göre izole edilir. Metodun detayları daha önce 1.2.2.4.1. bölümünde verilmiştir. İzole edilen numunelerin protein derişimleri BSA protein standartları kullanılarak Bradford yöntemine göre tayin edilir.

#### 2.2.1.4. Protein Karakterizasyonu

Bu çalışmalarda daha öncede belirtildiği gibi 1D-SDS PAGE ve IEF jel elektroforez sistemleri kullanılır. Proteinler gümüş boyama ile gözlenir. Bu metodların detayları önceki bölümlerde verilmiştir (1.2.2.4. Biyokimyasal Analizler). Buna ek olarak tuz stresi altında sentezlenen yeni proteinler işaretlenmiş <sup>35</sup>S-Methionin kullanılarak da saptanmıştır. Ayrıca, stres proteinlerinin hücre içi dağılımının saptanmasına yönelik olarak bitki hücrelerinden farklı organel zar fraksiyonları hazırlanmış ve protein analizleri daha önce belirtildiği şekli ile yapılmıştır. İşaretleme ve hücre fraksiyonlarının hazırlanmasına yönelik kullanılan metodlar aşağıda verilmektedir.

##### 2.2.1.4.1. Proteinlerin in-vivo İşaretlenmesi

Yeni sentezlenen proteinler aynı zamanda radyoaktif <sup>35</sup>S-Methionin (1000Ci/mmole) kullanılarak işaretlenmiştir. İşaretleme işlemleri Hurkman ve Tanaka (1987) yöntemine göre bazı değişikliklerle yapılmıştır. Beş saat süre ile MS ortamlarında stres uygulandıktan sonra bitkiler 2 ml MSS, 100 mg kloramfenikol ve 75 mCi <sup>35</sup>S-Methionin içeren solusyonda 3 saat daha bekletilir. Üç saatin sonunda bitkiler solusyondan çıkartılırlar ve soğutulmuş 1mM methionin ile üç kere yıkanılır. Kök numuneleri sıvı azotta dondurularak kullanılana kadar -70 derecede saklanırlar. Numunelerden protein izolasyonu daha önce belirtildiği gibi (1.2.2.4.1) Damerval ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılır.

##### 2.2.1.4.2. Hücre Fraksiyonlarının Hazırlanması

Kontrol bitkiler ve 48 saat %2 NaCl tuz stresi uygulanmış bitkilerin kök numuneleri 10ml/g doku olacak şekilde 0.3 mannitol, 5 mM potasyum dihidrojen fosfat, 1mM kalsium klorid, 5 mM EDTA ve 50 mM Tris-HCl pH:7.4 solusyonu içerisinde, "Warning Blender" ile homogenize edilir. Homogenizasyon işleminden önce ortama %0.1 β-merkapttoethanol ve %0.2 PVP ilave edilir.

Homojenizasyon işlemi ilk önce 2x10" hız 4'te yapılır daha sonra 2x10" en yüksek hızda 30" aralıkla tekrarlanır. Homojenat 4 katlı tülbentten süzülür ve solusyon 3000 g'de 5' sentrifüj

edilir. Çökelti çekirdek fraksiyon olarak saklanır. Supernatant (solusyon) 13,000 g'de 15' sentrifüj edilir. Çökelti mikrozomal fraksiyon ve supernatant da sitozol olarak ayrılır.

Her fraksiyonda ayrı ayrı protein ekstraksiyonu yapılır. Protein ekstraksiyonu daha önce belirtildiği gibi 10% TC solusyonu 0.007% Beta-mercaptoetanol aseton içerisinde kullanılarak yapılır. Proteinler 12,000 g'de sentrifüj edilerek toplanır. Çökelti IEFGS solusyonunun içerisinde çözülür, çözülmeyen kısım 14,000 g'de mikrofüjde sentrifüj edilerek ayrılır. Proteinler 2 boyutlu SDS-PAGE elektroforez yöntemine göre ayrılır. Protein profilleri gümüş boyama ile belirlenir.

#### 2.2.1.4.3. Mikrozomal Zarların Fraksiyonu

Yukarıda belirtildiği gibi hücre fraksiyonu sırasında 80,000 g'de çöktürülmüş olan hücre zarları 0.5 ml/g olacak şekilde 0.25 M sukroz, 3 mM EDTA, 25 mM Tris, 25 mM MES, 2.5 mM DTT pH:7.2 solusyonu içerisinde suspansiyon haline getirilir ve 45, 34, 30, 20 % (w/w) 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM DJJ ve 1 mM Tris-MES pH 7.2 ihtiva eden sukroz gradienti üzerine konur. Mikrozomal zarlar 95,000 g'de 120 dakika açılan rotorla sentrifüj edilir. Numunelerin 20%, 20/30 %, 30/34 % ve 34/35 % ara fazlar halinde ayrıldığı görülür. Her fraksiyon pastör pipet kullanılarak dikkatli bir şekilde toplanır ve potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) içerisine alınır. 80,000 g'de 60' sentrifüj edilir. Proteinler çöktürülmüş pelletlerden izole edilir. IEFGS solusyonu içerisinde çözülür 2-D SDSPAGE ile ayrılır ve gümüş boyama ile tanımlanır.

#### 2.2.1.5. PS-II Aktivite Ölçümleri

Bu kısımda iki farklı çeltik çeşidi kullanılmıştır. Nona bokra tuza dayanıklı ve Taichung native tuza dayanıksız. Tohumlar daha önce belirtildiği gibi 26 derecede 10 gün süre ile 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde MS ortamında büyütülür. Stres uygulaması 1 %, 2 % ve 4 % NaCl ile farklı zaman aralıklarında 3, 5 ve 8 gün süre ile uygulanır. Bölüm 1.2.2.3.1 de belirtildiği gibi PS-II ölçümleri kontrol ve stres uygulanmış bitkiler üzerinde yapılır.

## 2.2.2. BULGULAR

### 2.2.2.1 Tuz Stresi Altında Çeltikte Protein Sentezi

On gün süre ile MS ortamda büyütülmüş olan bitkiler 48 saat süre ile farklı tuz stresine tabi tutulmuşlardır. Şekil 2.2.1'de 1-D SDS PAGE protein profilleri gümüş boyama sonuçları verilmiştir. Kolon 2,4 ve 5; %2, %1 ve %0.5 NaCl stresini 1, 3 ve 6 kontrol numunelerini göstermektedir. Okla işaretlenmiş proteinler 25.5 ve 27 kD molekül ağırlığına tekabül edip %2 ve %1 NaCl stresi sonunda gözlenmiştir. %0.5 NaCl derişiminde 25.5 kD proteinin sentezi görülmekte ancak sentezlenen miktar daha azdır. Bu tuz derişiminde 27 kD proteini gözlenmemiştir.

Daha sonra bitkiler %2 NaCl stresine 48, 72 ve 120 saat maruz bırakılmış sonuçları Şekil 2.2.2'de verilmiştir. Kolon 1'den 9'a kadar tek sayılar kontrol numunelerini göstermektedir. Kolon 2: 24 saat tuz stresi uygulanmış, kolon 4: 72 saat kolon 6: 48 saat, kolon, 8: 120 saat, kolon 10: 24 saat recovery, kolon 11: 48 saat recovery sonuçları görülmektedir. En fazla akumulasyon 120 saat sonunda gözlenmiş olup 24 saat recovery (tuz ortamından normal ortama geçirilmesi) sonunda proteinlerin hala dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

2% NaCl'de 48 saat süre ile strese tabi tutulmuş bitkilerin köklerinden izole edilen proteinler 2 boyutlu elektroforez sistemi ile karakterize edildi. Şekil 2.2.3 (a) Kontrol, (b) tuz stresi uygulanmış numunelerde okla işaretlenmiş 27 ve 25.6 kD ağırlığındaki proteinler çok net olarak görülmektedir.

2% NaCl 48 saat süre ile uygulandıktan sonra bitkilerin yaprak dokularından izole edilen protein profilleri incelenmiştir; Şekil 2.2.4 (a) Kontrol, 2.2.4 (b) 24 saat, 2.2.4 (c) 48 saat tuz stresi uygulanmış numuneler görülmektedir. 24 saat sonunda bazı yaprak proteinlerinin sentezlerinde kaydedilir bir artış gözlenmiş 48 saat tuz stresi sonunda azalma olmuş ancak kalitatif bir farklılık tespit edilememiştir.



Tuz stresi sonunda kökte sentezlenen 25.6 kD ve 27 kD proteinlerin tuza spesifik olup olmadığını anlamak için deneyler 5% ve 2% PEG, 1 mg/l ve 3 mg/l ABA, 1-10 mM Cu ve 1 mM-10 mM Cd kullanılarak tekrarlanmış kök proteinleri izole edilmiş ve sonuçlar Şekil 2.2.5'de verilmiştir. Kolon 1: Kontrol, Kolon 2: 2% NaCl+ 1mg/l ABA, Kolon 3 sıcaklık stresi, Kolon 4 ve 5 3 mg/l ve 1 mg/l ABA, Kolon 6 ve 7 10 mM ve 1 µM Cd, Kolon 8 ve 9 10 µM ve 1 µM Cu, Kolon 10 ve 11 5% ve 2% PEG sonuçları gösterilmiştir.

ABA muammesi sonucunda, bazı araştırmacılar pirinç bitkisinde 23, 21 ve 20 kD civarında proteinlerin sentezlendiğini göstermişlerdir. Bizim sonuçlarımızda bu doğrultudadır ancak bu proteinler 25 kD-27 kD tuz stres proteinlerinden farklıdır.

PEG su potansiyelini azaltarak kuraklık stresini taklit eder. Bazı araştırmacılar kuraklık stresi için PEG kullandılar. Şekil 2.2.5 (Kolon 10, 11) de %2-%5 PEG derişimlerinde ki protein profilleri %2 NaCl proteinlerinden farklı olup tuz stresi sonunda sentezlenen iki özgün protein (25.5 ve 27 kD) PEG uygulaması sonunda gözlenmemiştir.

Sıcaklık stresi sonucunda sentezlenen protein profilleri incelendiğinde yine bu iki protein bandı gözlenmemiştir. Metal stresi Şekil 2.2.5 Kolon 6, 7 (Cd), Kolon 7,8 Cu stres protein profilleri kontrol numusi ile karşılaştırıldığında (Kolon 1) oldukça farklılık gözlenmiş olup daha düşük molekül ağırlığında 16-14 kD proteinlerin sentezlendiği gibi gözlenmiş ancak 25.5 ve 27 kD proteinleri gözlenmemiştir. Bu deneylerin sonunda 25.5 ve 27 kD proteinlerin tuz stresi sonucunda sentezlendiği tesbit edilmiştir.

#### **2.2.2.2. Tuz Stresi Proteinlerinin Hücre İçinde Dağılımı**

Hücre fraksiyonlarından çöktürülen proteinler SDS PAGE ile ayrılmış ve gümüş boyama ile proteinler belirlenmiştir. Şekil 2.2.6 da görüldüğü gibi yeni sentezlenen proteinler sadece sitozolik fraksiyonda görülmüştür. Sitozolik fraksiyona tekrar iki boyutlu SDS-PAGE ile

bakıldığında 25.5 ve 27 kD civarında iki protein tuz stres uygulanmış numuneler de gözlenmiş ancak kontrol numunelerin de görülememiştir (Şekil 2.2.7).

Materyal ve metodlarda bahsedildiği gibi sukroz gradienti üzerinde (%20, 30, 34 ve 45 sukroz derişiminde) mikrozomal fraksiyonlar ayrılmıştır. Bu fraksiyonlar ve ihtiva ettikleri hücreesel yapılar aşağıdaki şekildedir.

1. faz 20 % Endoplazmik Retikulum (ER)
2. faz 20 % / 30 % Tonoplast, Golgi (TG)
3. faz 30 % / 34 % Tonoplast (TG) ve Plazma Membran (PM) (TG & PM)
4. faz 34 % / 45 % Plazma Membran (PM)

Bu fraksiyonlardan hazırlanan proteinler 2 boyutlu SDS PAGE üzerinde ayrılmış ve gümüş boyama ile tesbit edilmiştir. Hiç bir mikrozomal fraksiyonda 27 ve 25.5 kD proteinlerine rastlanmamıştır (Şekil 2.2.8).

### *2.2.2.3 Tuz Stresi Altında Çeltikte PS-II Aktivite Ölçümleri*

Bu kısımda farklı tuz derişimlerinin (%1, 2% ve %4 NaCl) farklı zaman aralıklarında (3, 5 ve 8 gün) iki farklı çeltik çeşidi üzerine etkisi çalışılmıştır. Şekil 2.2.9 da %1 ve %2 NaCl stresinin Nona Bokra çeşidinin PS-II aktivitesi üzerine etkisi gösterilmiştir. Başlangıç hızları hesaplanmış ve Şekil 2.2.10'da verilmiştir. Kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında PS-II aktivitelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Şekil 2.2.11'de %2 ve %4 NaCl derişimlerinin 5 gün süre ile Nona Bokra ve Taichung native çeşitlerine uygulanması sonucunda PS-II aktivitelerinde meydana gelen değişiklik verilmiştir. Sonuçlar başlangıç hızları cinsinden ifade edildiğinde (Şekil 2.2.12) Nona Bokra çeşidinde %2 NaCl stresinin 5 gün süre ile uygulanması PS-II aktivitesinde %50'ye varan bir azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan tuza dayanıksız olarak belirtilen TN çeşidinde kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında PS-II aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Aynı şekilde %4 NaCl

5 gün süre ile uygulanmasında TN çeşidinde PS-II aktivitesi %2 NaCl ile gözlenenin altında olmasına rağmen kontrol numunelerinin üzerinde bir aktivite gözlenmiştir.

Şekil 2.2.13 ve 2.2.14'de %2 NaCl stresinin 8 gün süre ile uygulanmasının NB ve TN çeşitlerinin PS-II aktiviteleri üzerine etkileri gösterilmiştir. Nona Bokra çeşidinde 8. günün sonunda %60 a varan bir aktivite görülmüştür. TN çeşidinde ise 8. günün sonunda PS-II aktivitesi %50 in altına düşmüştür. Elde edilen tüm sonuçlar Şekil 2.2.14'de kontrol numunelerinin yüzdesi olarak özetlenmiştir. Bu deneylerin sonucunda dayanıklı çeşitlerde PS-II aktiviteleri uzun stres uygulamalarında fazla değişmemekte olup aktivitenin %60 korunmaktadır.

### 2.2.3. TARTIŞMA

Bu çalışmada Nona Bokra (*Oryza sativa*) Asya orijinli çeltik çeşidi kullanılmıştır. Nona Bokra çeltik çeşitleri arasında tuza en dayanıklı olarak bilinmektedir (Yeo ve arkadaşları 1990, Akika ve Cabulay 1991). Tuz stresi 10 günlük fideler üzerinde farklı NaCl derişimleri kullanılarak uygulanmıştır. Tuz stresi ilk önce kökte başladığı için öncelikle kök dokusunda sentezlenen proteinler incelenmiştir. Tuz stres proteinleri 1D ve 2D SDS PAGE kullanılarak ayrılmış gümüş boyama veya fluorografik analizlerle tesbit edilmiştir. Tuz stresi altında normal protein sentezinde kontrole göre azalma gözlenirken yeni sentezlenen proteinler de görülmüştür. Bu proteinler 1D SDS PAGE ve gümüş boyama ile (Şekil 2.2.1) farklı tuz derişimlerinde (0.5, 1 ve 2 % NaCl) 48 saat süre ile uygulanması sonunda görülmüştür. Yeni sentezlenen proteinler molekül ağırlıkları 25.5 ve 27 kD civarında olup 2 boyutlu SDS PAGE ve gümüş boyama ile daha belirgin olarak gösterilmiştir. (Şekil 2.2.3). Tuz stresi burada %2 NaCl 48 saat süre ile uygulanmıştır. Tuz stresinin uzaklaştırılmasından 48 saat sonra protein profilleri tekrar incelendiğinde (Şekil 2.2.4) bu proteinlerin miktarlarında azalma görülmüş ancak hala görüntülenebilmiştir. Bu proteinlerin pI değerleri yaklaşık 7.0 civarında bulunmuştur.

Tuz stresi altında sentezlenen diğerk bir protein yüksek molekül ağırlığında olup ancak <sup>35</sup>S-Methionine kullanılarak gözlenebilmiştir. Yüksek molekül ağırlığında tuz stresi altında sentezlenen protein hassas çeşitlerde gözlenmemiştir. Bu proteinin tuza dayanıklılık mekanizmasında önemli olduğu görüşü belirmiştir. Bu protein bu çalışma için özgün olmayıp Hurkman 1981 tarafından da tuz stresi altında görülmüştür. Düşük moleküler ağırlığında sentezlenen proteinler %2 NaCl tuz stresinin 8 saat uygulanması sonunda radyoaktif aminoasit kullanılarak gözlenebilmesi önemlidir. Ancak radyoaktif maddelerin pahalı olması, atıkların uzaklaştırma problemleri ve çalışma sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskleri gözönünde bulundurularak deneylerde daha sonra kullanılmamıştır. Düşük molekül ağırlığındaki proteinlerin (Şekil 2.2 ve 2.3) gümüş boyama ile de görüntülenebilmesi ekonomik açıdan da önemlidir.

Tuz stresi altında diğerk bitkilerde de farklı proteinlerin sentezlendiği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. (Ramagopal 1987 a, 1987 b, Naqvi ve arkadaşları 1994). Tuza dayanıklı CM 72 arpa çeşidinde kök dokusunda altı yeni proteinin sentezlendiğini göstermiştir.

Takagishi ve Shirara (1990) ve Naqvi ve arkadaşları (1992) çeltikte doku kültüründe tuz stresi altında yeni proteinler olduğunu göstermiş ancak bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 26 ve 27 kD olup pI değerleri farklıdır. Arpada sentezlenen 26 kD proteinin pI değeri 6.3-6.5 civarında, tütünde ise pI değeri 8.2 olarak gösterilmiştir (Singh 1987). Bizim çalışmamızda da bu proteinler (25.5 ve 27 kD) pI değerleri 7.0 olarak bulunmuştur.

Bu proteinler hücre içi dağılımları için hücre fraksiyonları hazırlanmış ve bu proteinlerin sitozolda olduğu gösterilmiştir. (Şekil 2.2.7). Bu proteinler aynı zamanda PEG, ABA, Cu, Cd ve sıcaklıkla da sentezlenmediği gösterilmiştir. (Şekil 2.2.5). Ancak tuza hassas çeşitlerde IR101198-66-2, Taichung native ve Basmati 370'de, 48 saat 2 % NaCl verildiğinde kök protein analizleri yapılmış ve 25.5 ve 27 kD ağırlığındaki proteinler gümüş boyama ile tesbit edilmiştir.

Ancak Nona Bokra çeşidinde yüksek molekül ağırlığında tuz stresi altında sentezlenen (70 kD) protein hassas çeşitlerde radyoaktif analizlerle de görülememiştir.

Düşük moleküler ağırlığında sentezlenen 25 ve 27.5 kD proteinlerin hassas çeşitlerde de görülmesi bu proteinlerin tuz stresinden korunma mekanizmalarında, başlangıçta sinyal protein rolleri olabileceği görüşü önem kazanmıştır.

Bu proteinlerin aminoasit sıralarının tanımlanması ve bunları sentezleyen genlerin belirlenmesi, tuz stres mekanizmasının anlaşılması açısından olduğu kadar tuza dayanıklı transjenik bitkilerin hazırlanması açısından da önemlidir.

PS-II aktivite ölçümleri iki ayrı çeltik çeşidi üzerinde çalışılmıştır. Tuza dayanıksız çeşitlerinde stres uygulamalarının ilk günlerinde belirgin bir korunma gözlenmiştir (Protection). Daha uzun süreli tuz stres uygulamalarında ise bu çeşitlerde PS-II aktiviteleri %50 nin altına düşmektedir. Hassasiyet derecesinin farklı fizyolojik karakterlerle de belirlenmesi gerekmektedir. Yüksek tuz derişimi %4 NaCl kısa süreli uygulandığında PS-II aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. (Korunma veya sonradan kazanılan tolerans). Ancak uzun süre de aktivite minumuma inmektedir. Deneylerimizin sonucunda %4 NaCl, toksik sınır olarak ifade edilmiştir.

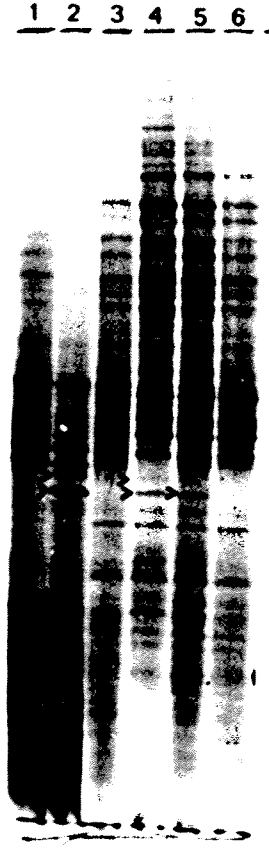
#### 2.2.4. KAYNAKLAR

- Bohnert, H.J., Nelson, D.E, Jensen, R.G. Adaptations to environmental stresses, *The Plant Cell*, 7:1099-1111, (1995).
- Damerval, C., De Vienne, D., Zyvi, M., Thiellement, H. "Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins" *Electrophoresis*, 7:52-54, (1986).
- Herrouart, D., Bowler, C., Willekens, H., VanCamp, V., Stooten, L., VanMontague, M., Inze, D. Genetic engineering of oxidative stress resistance in higher plants. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, 342:235-240, (1993).
- Hurkman WJ, Tanaka CK. The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 83: 517-524, (1987).
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, (1967).
- Naqvi SMS, Özalp VC, Öktem HA, Yücel M Study of the proteins synthesized in rice roots in response to salt stress. *Int. Rice Res. Newslet.* 17(6): 15-16, (1992).
- Naqvi, SMS, Özalp, VC, Öktem, HA, Yücel, M.. Two-dimensional Electrophoresis of Proteins with a Different Approach to Isoelectric Focusing. *Analyst*, 119: 1341-1344., (1994)
- Ramagopal S. Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 94-98, (1987a).
- Ramagopal S. Salinity stress induced tissue specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol.* 84: 324-331, (1987b).
- Shirata K., Takagishi H Salt-induced accumulation of 26 and 27 kD proteins in cultured cells of rice plant. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36(1): 153-157, (1990).
- Tanji K.K., *Nature and extent of agricultural salinity assesment and mannegement*, ed: Tanji K.K., American Society for Civil Engineering, New York, (1990).

Tarcynski, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. Stress protection in transgenic tobacco producing a putative osmoprotectant, mannitol. *Science*, 259:508-510, (1993).

Yeo AR, Teo ME, Flowers TJ. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. *Theor. Appl. Genet.* 79, 377-384, (1990).

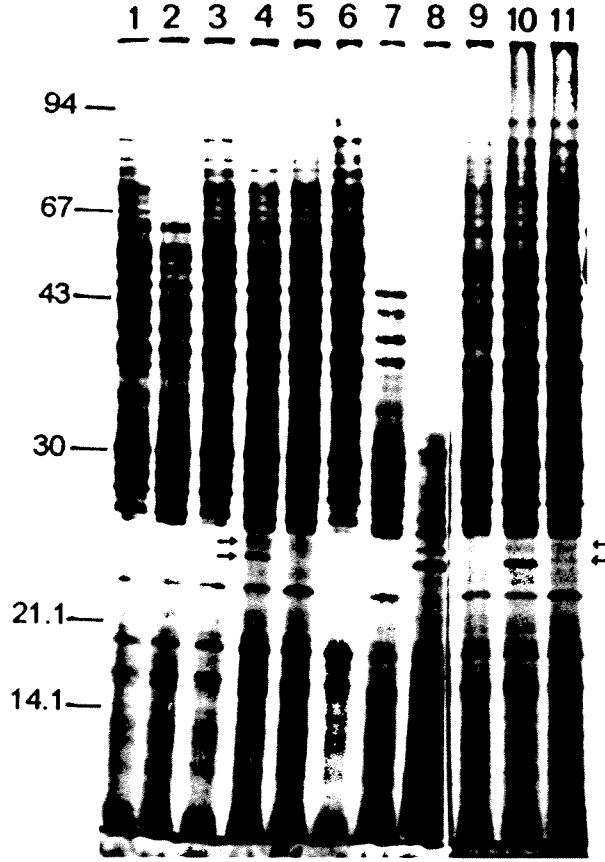
## 2.2.5. ŞEKİLLER



Şekil 2.2.1. Değişik tuz derişimlerinin Nona Bokra kk protenleri üzerine etkisi.

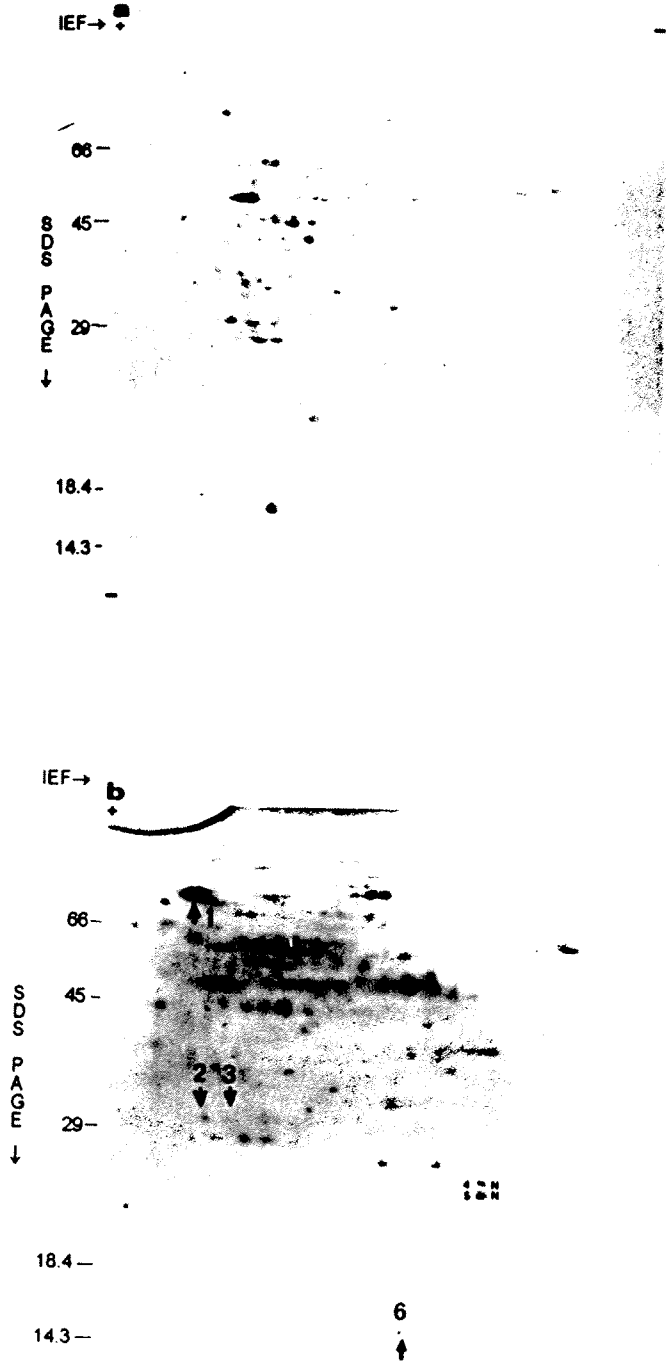
Kolon 2,4 ve 5; 2 %, 1 % ve 0.5 % NaCl stresini 1, 3 ve 6 kontrol numunelerini göstermektedir.





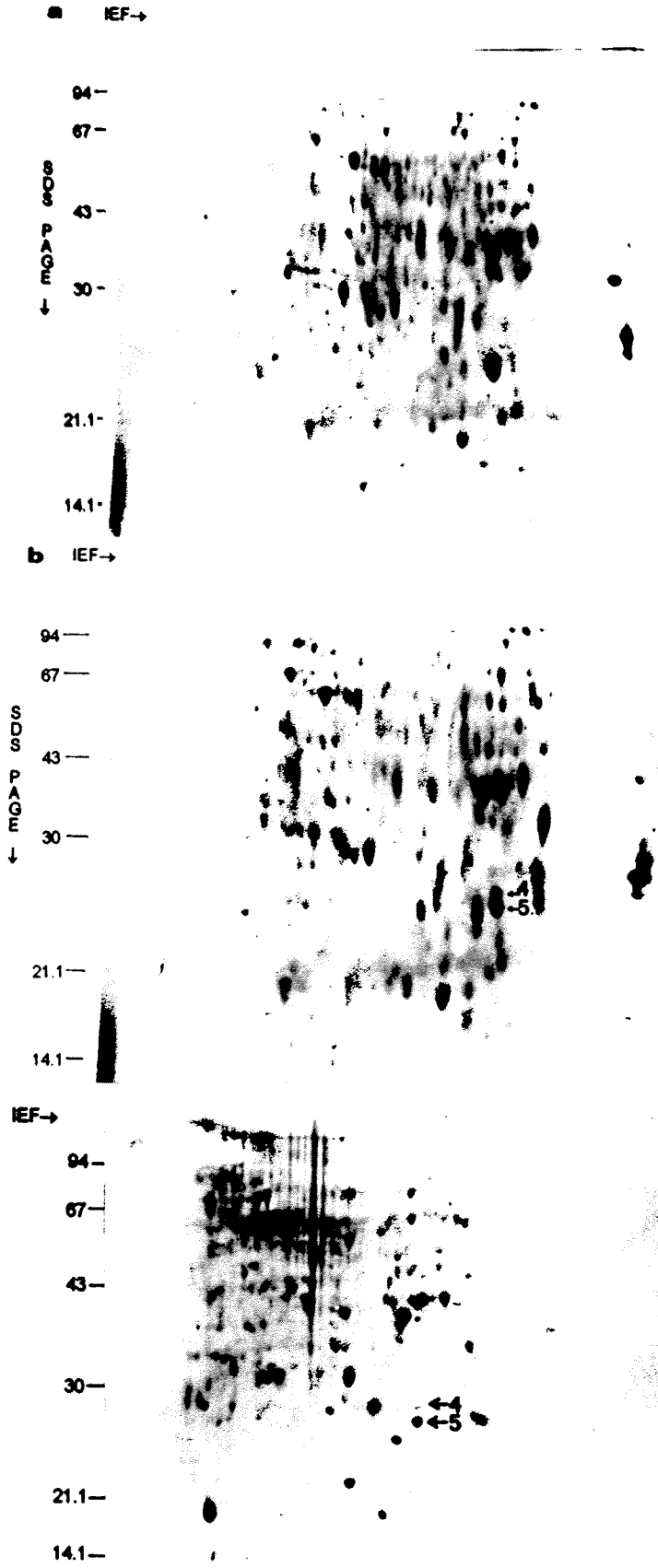
Şekil 2.2.2. Değişik sürelerle uygulanmış tuz stresinin Nona Bokra kök proteinleri üzerine etkisi

Kolon 1'den 9'a kadar tek sayılar kontrol numunelerini göstermektedir. Kolon 2: 24 saat tuz stresi uygulanmış kolon, 4: 72 saat kolon, 6: 48 saat kolon, 8: 120 saat kolon, 10: 24 saat recovery kolon, 11: 48 saat recovery sonuçları görülmektedir.



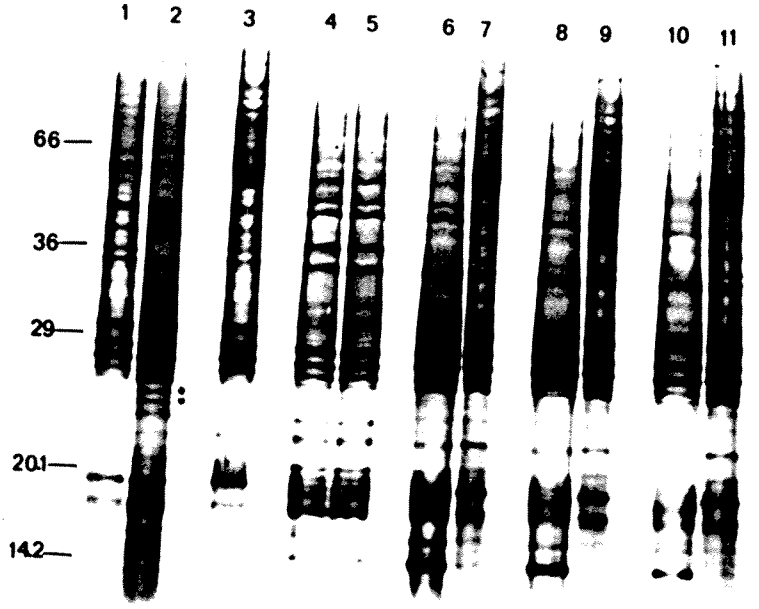
Şekil 2.2.3. 2% NaCl'de 48 saat süre ile strese tabi tutulmuş bitkilerin kök proteinleri.

(a) Kontrol, (b) tuz stresi uygulanmış numuneler. Tuz stresi sonucu sentezlenen yeni proteinler okla işaretlenmiştir.



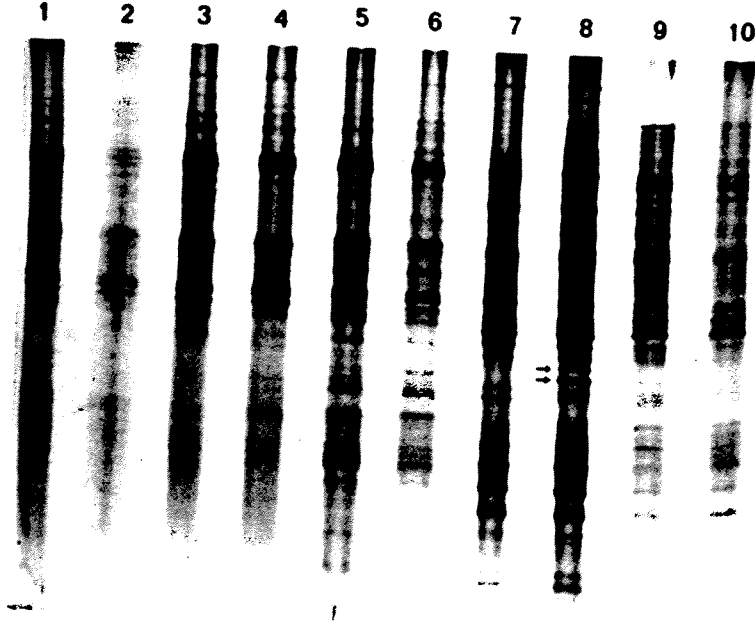
Şekil 2.2.4. %2 NaCl 48 saat süre ile uygulandıktan sonra bitkilerin yaprak dokularının protein profilleri.

(a) Kontrol, (b) 24 saat, (c) 48 saat tuz stresi uygulanmış numuneler.



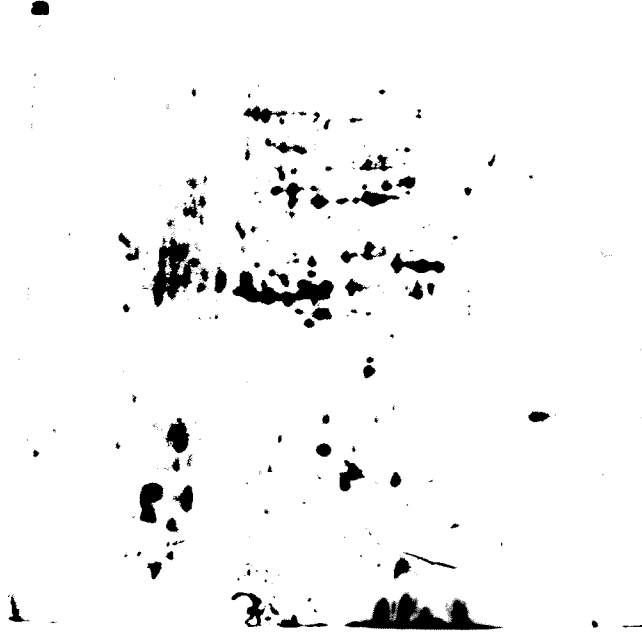
Şekil 2.2.5. Değişik stres faktörlerinin kök proteinleri üzerine etkileri.

Kolon 1: Kontrol, Kolon 2: 2% NaCl+ 1mg/l ABA, Kolon 3: sıcaklık stresi, Kolon 4 ve 5: 3 mg/l ve 1 mg/l ABA, Kolon 6 ve 7: 10 µM ve 1 µM Cd, Kolon 8 ve 9: 10 µM ve 1 µM Cu, Kolon 10 ve 11: 5% ve 2% PEG muamelesi sonuçları



Şekil 2.2.6. Hücre fraksiyonlarından alınan proteinlerin SDS-PAGE sonuçları.

Tek sayılar stres uygulanmış, çift sayılar kontrol numuneleri göstermektedir. Kolonlar soldan sağa çekirdek, mitokondri, sitoplazma ve hücre duvarı fraksiyonlarını göstermektedir.

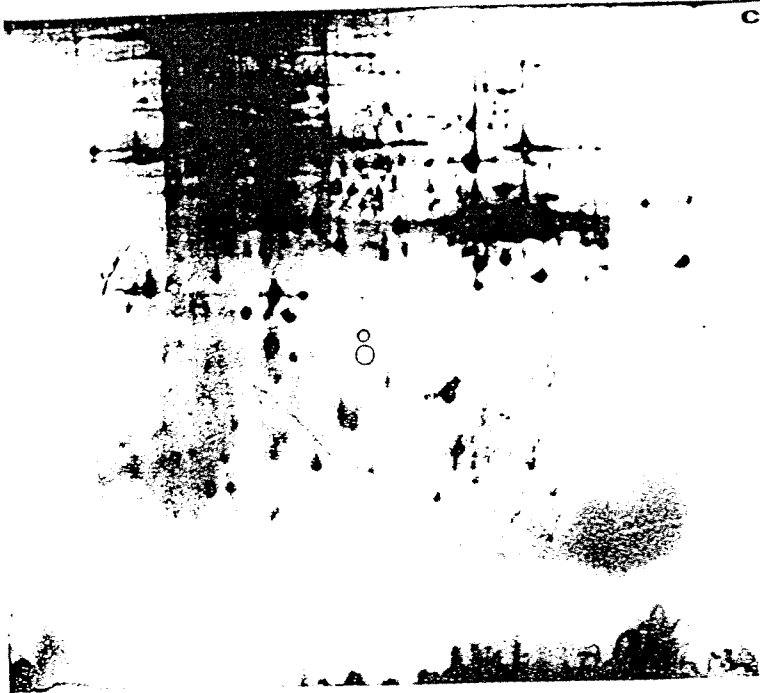


Şekil 2.2.7. Nona bokra kök dokusu sitozolik proteinlerinin 2D SDS-PAGE profilleri.

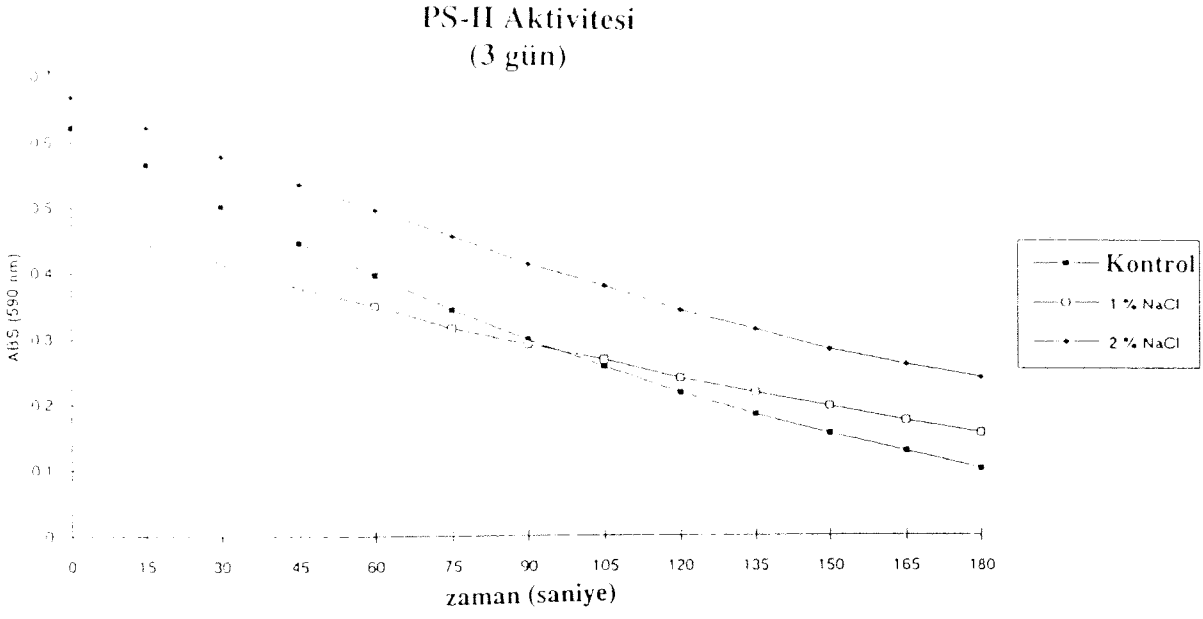
(a) Kontrol proteinlerin sitozolik proteinleri, (b) %2 NaCl stresi uygulanmış bitkilerin sitozolik proteinleri.



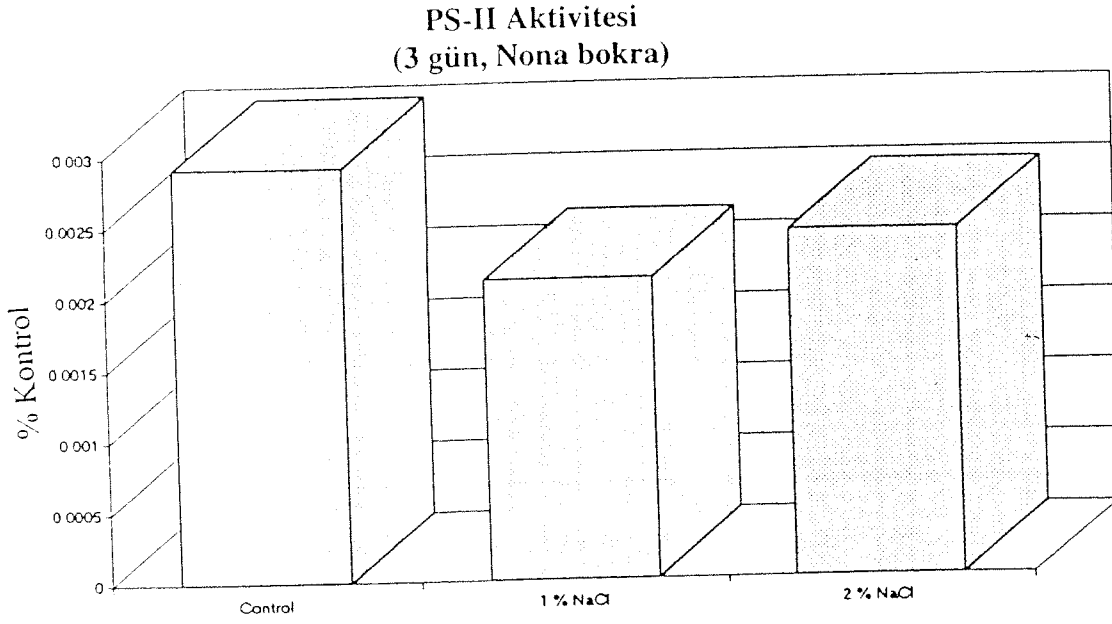
Şekil 2.2.8. %2 NaCl stresi uygulanmış kök dokusundan hazırlanan mikrosomal fraksiyonların protein profilleri. (a) Hücre zarı, (b) Tonoplast/golgi zarları, (c) Endoplasmik reticulum zarları.





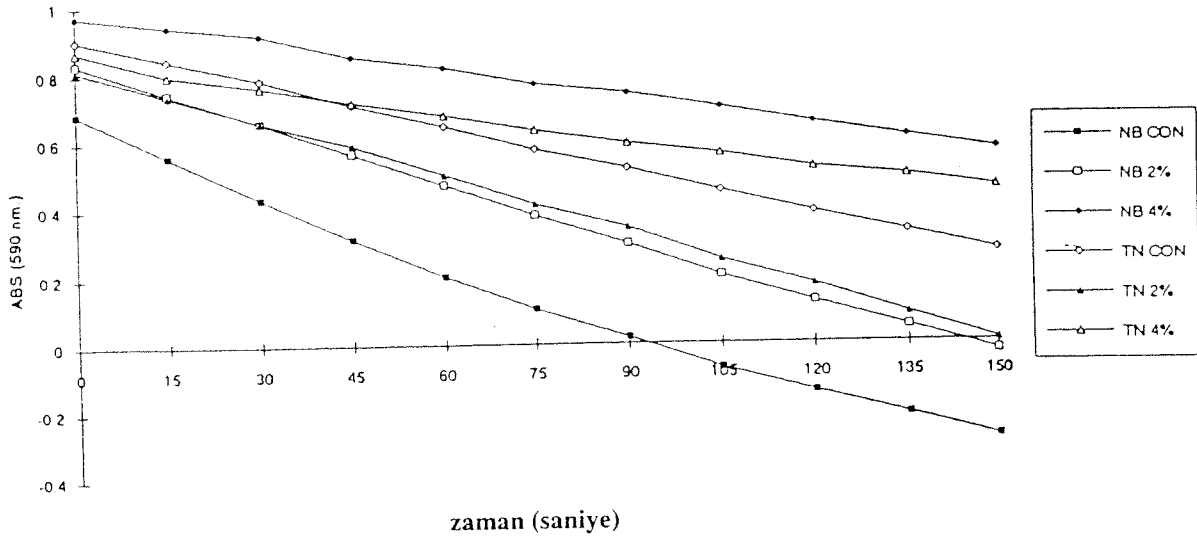


Şekil 2.2.9. %1 ve %2 NaCl stresinin Nona Bokra çeşidinin PSII aktivitesi üzerine etkisi.

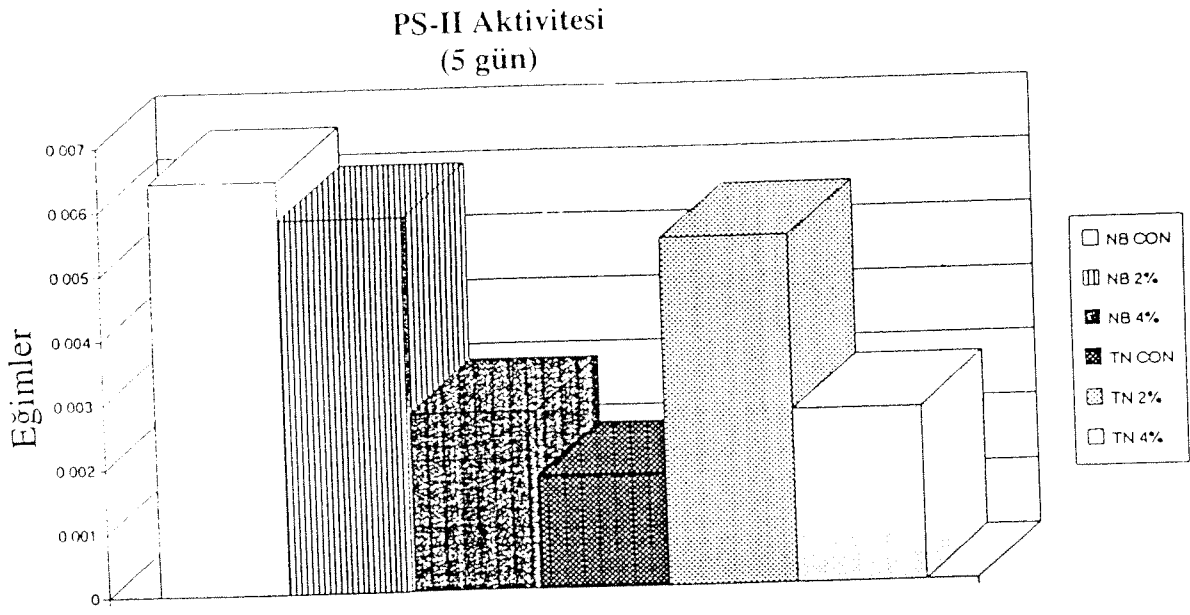


Şekil 2.2.10. Nona bokra çeşidinde PS-II aktivitesinin başlangıç hızları.

### PS-II Aktivitesi (5 gün)



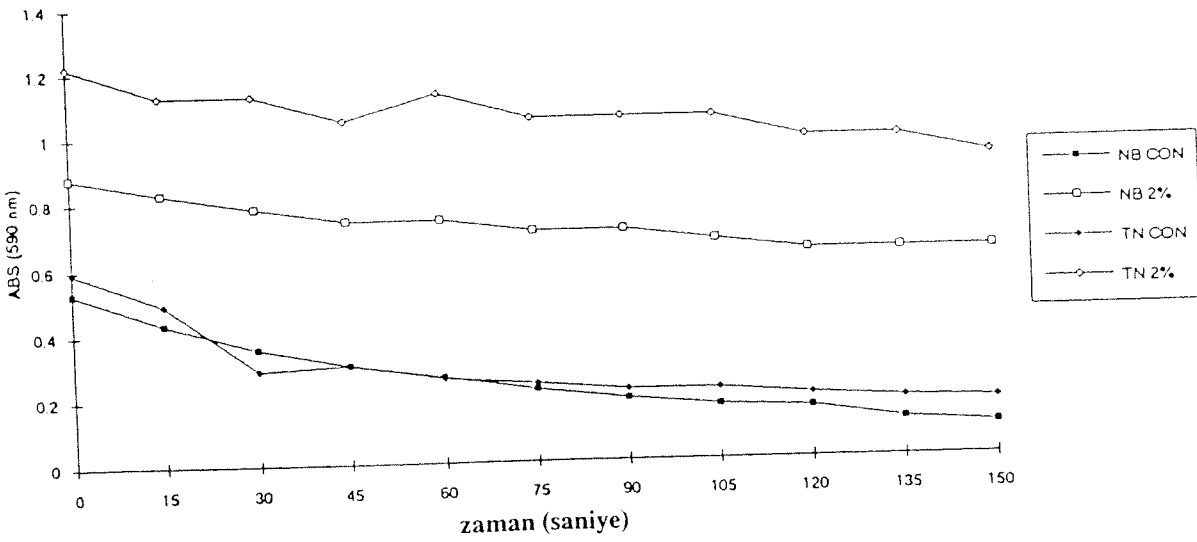
Şekil 2.2.11. %2 ve %4 NaCl derişimlerinin 5 gün süre ile Nona Bokra ve Taichung native çeşitlerine uygulanması sonucunda PS-II aktivitelerinde meydana gelen değişiklik.



Şekil 2.2.12. İki farklı çeşitte 5 gün süre ile %2 NaCl uygulanması sonucu PS-II aktivitelerinin başlangıç hızı.

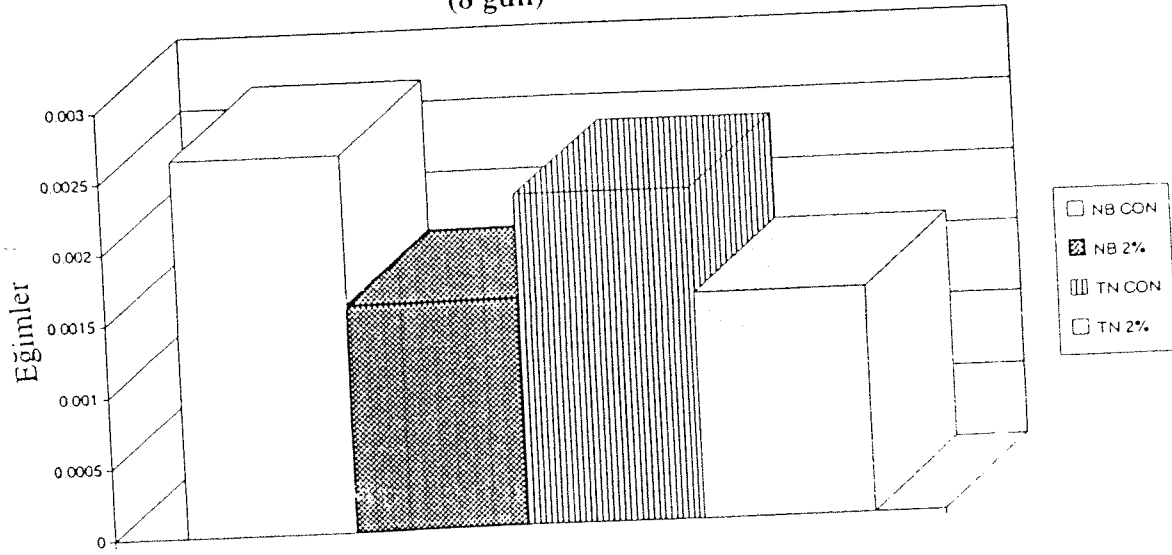
NB: Nona bokra, TN: Taichung native, CON: Kontrol

### PS-II Aktivitesi (8 gün)



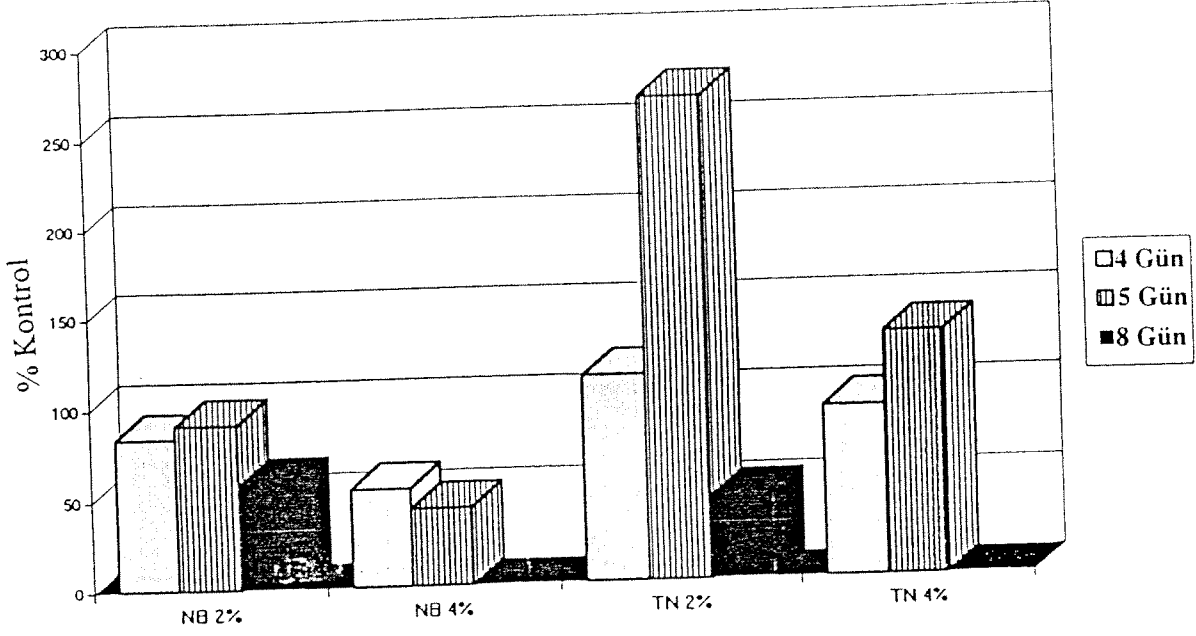
Şekil 2.2.13. %2 NaCl stresinin 8 gün süre ile uygulanmasının Nona Bokra ve Taichung Native çeşitlerinin PS-II aktiviteleri üzerine etkileri.

PS-II Aktivitesi  
(8 gün)



Şekil 2.2.14. İki farklı çeşitte 8 gün süre ile %2 NaCl uygulanması sonucu PS-II aktivitelerinin başlangıç hızı.

NB: Nona bokra, TN: Taichung native, CON: Kontrol



Şekil 2.2.15. Nona Bokra ve Taichung Native çeşitlerinde %2 NaCl stresinin 4,5 ve 8 gün uygulanması sonucu PS-II aktivitelerindeki değişiklik.

Sonuçlar kontrol numunelerin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

## 2.3. BUĞDAYDA TUZ STRESİ

Çalışmanın bu bölümünde dört farklı buğday çeşidinin (Bezostaja, Gerek, Kharchia ve Tosun) tuz stresi altında biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri incelendi.

### 2.3.1. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 2.3.1.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Buğday tohumları % 4 NaClO<sub>4</sub> ile 20 dakika sterilize edildikten sonra musluk suyu altında yıkanır. Tohumlar 500 ml sterilize edilmiş distile su içeren tülbentle kaplanmış kapların üst kısmına yerleştirilir ve iklim dolabında 22± 3 derecede 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde 6 gün süre ile büyütüldü.

#### 2.3.1.2. Stres Uygulaması

Altı gün süre ile büyütülmüş olan buğday filizleri % 0.2, %1, %4 ve %20 NaCl içeren büyüme ortamlarına alınır ve 5 gün süre ile büyümeleri takip edilir. Farklı zaman aralıklarında yaprak ve kök numuneleri toplanarak gerkli fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılır. Fotosentez aktivite ölçümleri ve hücre zarı geçirgenlik testleri toplanan numunelerde hemen yapıldığı halde protein analizleri için numuneler sıvı azotta dondurulup -70 derecede kullanılıncaya kadar saklandı. Yapılan tüm analizler ile ilgili deneysel metodlar daha önceki bölümlerde (1.2.2.3 ve 1.2.2.4) verildiği şekliyle uygulandı.

### 2.3.2. BULGULAR

#### 2.3.2.1. Tuz Stresinin PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi

Buğdayda tuz stresinin fotosentez aktivitesi üzerine etkisi Şekil 2.3.1 de verilmiştir. Şekildende görüldüğü gibi tuz derişimi arttıkça PS-II aktivitesi azalmaktadır. PS-II aktivite hızı  $\Delta A_{590}$  / saniye olarak ifade edilmiştir. Şekil 2.3.2 de Bezostaja, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) bir günlük stres sonucu PS-II aktivitelerindeki değişim kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.

Tuz stresi uygulaması üçüncü ve beşinci günlerde devam ettirilmiş ve PS-II aktiviteleri şekil 2.3.3 ve 2.3.4'de verilmiştir. Beşinci gün sonunda %4 NaCl altında Tosun ve Kharachia en dayanıklı çeşitler olarak gözlenmiş ancak beşinci gün %20 NaCl stresinde Kharachia en dayanıklı olarak tespit edilmiştir.

### **2.3.2.2. Tuz Stresinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi**

Hücre zarı geçirgenliği de bir önceki bölümde belirtilen stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) ve farklı zaman aralıklarında (1, 3 ve 5 gün) stres uygulanmış buğday çeşitleri üzerinde çalışılmış ve sonuçlar kontrol numunelerde saptanan hücre zarı yaralanmasının yüzdesi (% Kontrol) olarak ifade edilmiştir. Şekil 2.3.5, 2.3.6 ve 2.3.7 de sırası ile %0.2, %1.0, %4.0 ve %20 NaCl stresinin bir, üç ve beş gün süre ile muameleleri sonucunda Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun buğday çeşitlerinin kök dokuları hücre zarlarında meydana gelen yaralanma gösterilmektedir. Sonuçlar kontrol numunelerde gözlenen yaralanmanın yüzdesi olarak (% Kontrol) ifade edilmiştir.

Bu çalışmalarda çeşitler arası farklılık %1 ve % 4 NaCl stresine 1 gün boyunca muamelesi sonucunda gözlenebilmiştir. Düşük (%0.2) ve yüksek (%20) NaCl derişimlerinde ise farklılık gözlenememiştir. Çeşitler arası farklılık %1 NaCl stresinin bir gün uygulanmasında en yüksek yaralanmanın görüldüğü çeşitten en düşük değere göre sıralandığında Gerek %58, Bezostaja %34, Kharchia %32 ve Tosun %29 şeklinde olmuştur. %4 NaCl 5 gün süre ile uygulandığında yine Gerek, Bezostaya, Kharcia ve Tosun şeklinde aynı sıralama gözlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda Tosun ve Kharchia tuz stresi açısından çalışılan çeşitler içinde en dayanıklı çeşitler olarak belirlenmiştir.

### **2.3.2.3. Tuz Stresi Altında Buğday Çeşitlerinde Sentezlenen Proteinler**

Çalışmanı bu kısmında fizyolojik testlerle tuz stresine en dayanıklı olarak tespit edilen Tosun ve hassas olan Gerek çeşidi kullanılmıştır. Şekil 2.3.8 de Tosun ve Gerek çeşitlerinde %2 NaCl stresinin 3 gün süre ile uygulanması sonucunda kök protein profillerindeki değişimler gösterilmektedir.



Tosun çeşidinde 25 kD, 44 kD ve yüksek moleküler ağırlıkta (70 kD) kontrol numunelerde gözlenmeyen yeni proteinlerin sentezlendiği tespit edilmiştir. Ancak Gerek çeşidi ile karşılaştırıldığında normal protein sentezinde tuz stresi altında kayda değer azalma görülmüştür.

Çalışmalar işaretlenmiş <sup>35</sup>S-Methionin kullanılarak tekrarlanmıştır. Tosun ve Gerek çeşitleri %4 NaCl stresine 1 gün süre ile maruz bırakılmış ve yeni sentezlenen proteinler tuz stresinin son üç saatinde işaretlenmiştir. Şekil 2.3.9 da görüldüğü gibi Tosun çeşidinde 13, 14, 23, 25, 27 kD civarında yeni proteinler tespit edilmiştir. Gerek çeşidinde de 13, 14, 23, 25, 27 kD civarında yeni proteinler gözlenmiş ancak bu proteinlerin miktarlarında Tosuna nazaran farklılık vardır.

Tosun çeşidi dayanıklı çeşit olarak tespit edildiğinden, yaprak numunelerinde de tuz stresi sonucunda sentezlenen proteinlere bakılmıştır. Şekil 2.3.10 da (a) Kontrol (b) %4 NaCl derişiminde 1 gün süre ile tuz stresi uygulanmış Tosun çeşidinde yaprak dokusu proteinlerinin 2D-SDS-PAGE ile ayrıştırılıp gümüş boyama ile muamelesi sonucu elde edilen protein profilleri gösterilmektedir. Tuz stresi altında genelde normal protein sentezinde bir azalma gözlenmesine rağmen 44 kD civarlarında yeni bir protein tespit edilmiştir.

#### 2.3.4. TARTIŞMA

Bu çalışmada Bezostaya, Kharachia, Gerek ve Tosun buğday çeşitlerinin tuz stresine dayanıklılığı hücre zarı geçirgenliği, PS-II aktiviteleri ve protein profilleri göz önünde bulundurularak incelenmiştir.

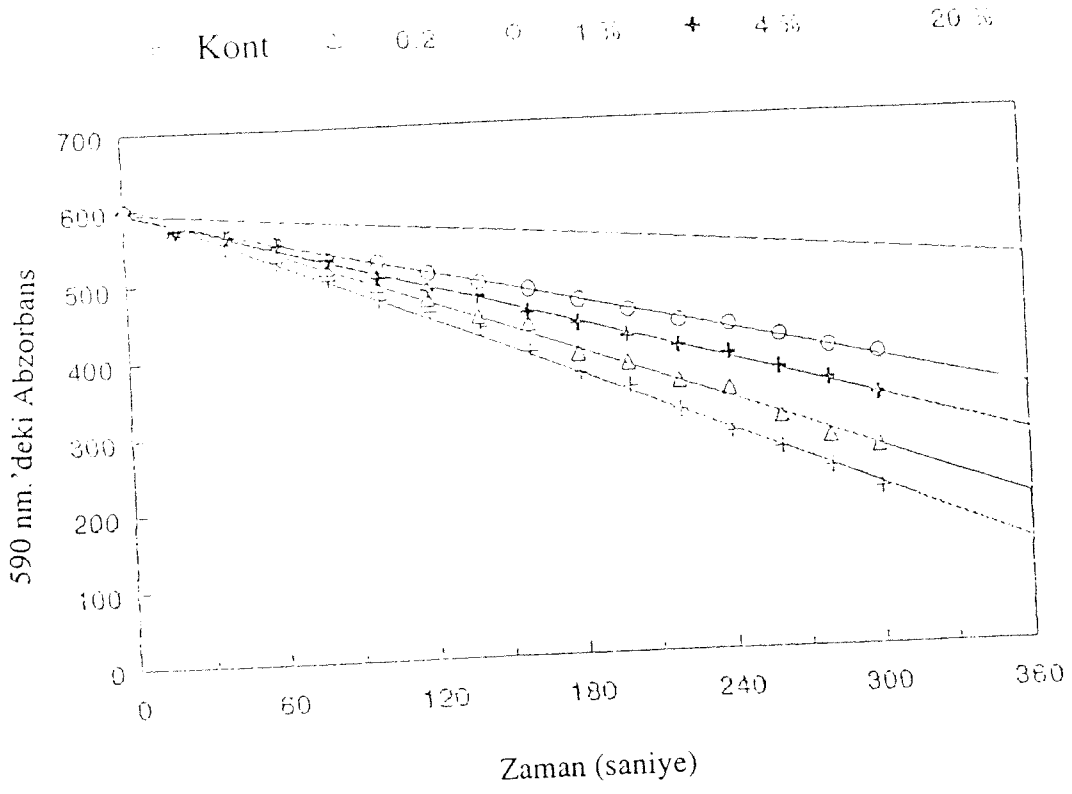
Hücre zarı geçirgenliği açısından incelendiğinde %1 NaCl stresinin 1,3 ve 5 gün süre ile uygulanması sonunda çeşitler arası farklılık gözlenmiştir. %20 NaCl tuz stresi ölümcül doza girmesine rağmen en dayanıklı çeşidin tespitinde kullanılmıştır. Hücre zarında meydana gelen yaralanmaya göre buğday çeşitleri sıralandığında en dayanıklıdan en hassasa doğru Kharacia, Tosun, Gerek ve Bezostaya görülmektedir.

PS-II aktivite sonuçlarında %4 NaCl nin etkisi 1,3 ve 5 gün incelenmiş ve çeşitler arası farklılık gözlenmiştir. %0.2,%1 ve %20 tuz derişimi ile karşılaştırıldığında %4'lük tuz stresinin çeşitler arası farklılığın tespiti için en uygun stres koşulu olduğu gözlenmiştir. PS-II aktivite deneylerine göre en dayanıklı çeşitten en dayanıksıza, Tosun, Kharchia, Gerek ve Bezostaja olarak bir sıralama gözlenmiştir. Kulanan iki değişik fizyolojik metordan paralel sonuçlar elde edilmesi bu metodların tuz stresine yönelik çeşitler arası farklılığın tespitinde kullanılabilir olması açısından önemlidir.

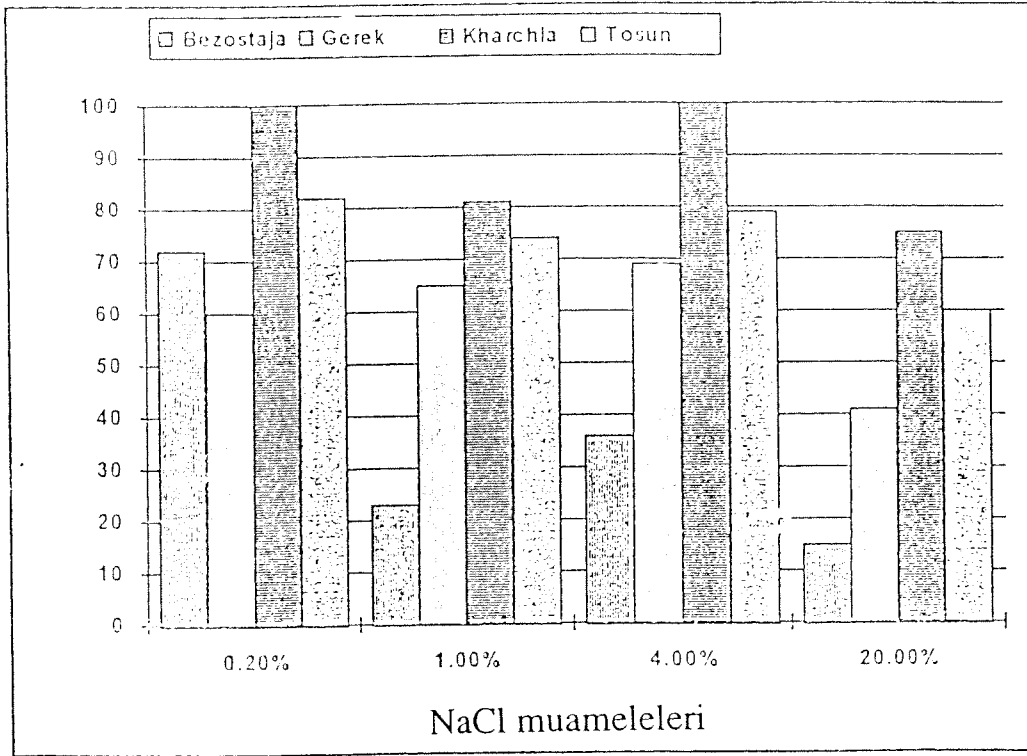
Bütün bu deneyler sonunda Tosun çeşidinin tuz stresine dayanıklı olarak bulunması tuz stresi altında bu çeşitte sentezlenen yeni proteinlerin karakterizasyonuna önem kazandırmıştır. 2D-SDS-PAGE ve gümüş boyama ile üç özel protein tespit edilmiştir. 24, 25 ve 34 kD'lik bu proteinlerin sadece tuz stresi altında sentezlenmiş olmaları, bu proteinlerin tuz stresine dayanıklılık mekanizmasında önemli görevleri olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Tuz stresinin tek boyutlu bir stres olmayıp kuraklık stresi ilede yakından ilgili olması nedeniyle, proje kapsamında bu çeşitlerin kuraklık stresi altındaki davranışlarıda araştırılmıştır.

### 2.3.5. ŞEKİLLER

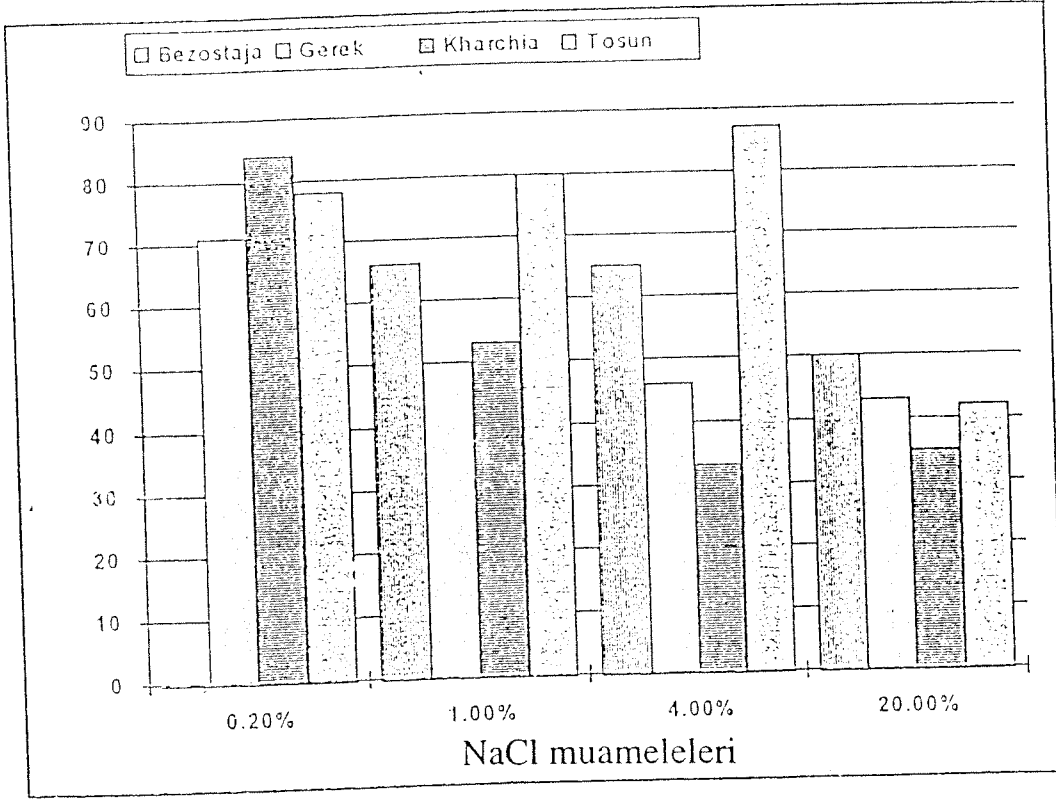


Şekil 2.3.1. Tosun çeşidinin 5 gün süre ile değişik derişimlerde verilen NaCl stresi sonucu gözlenen PS-II aktiviteleri.



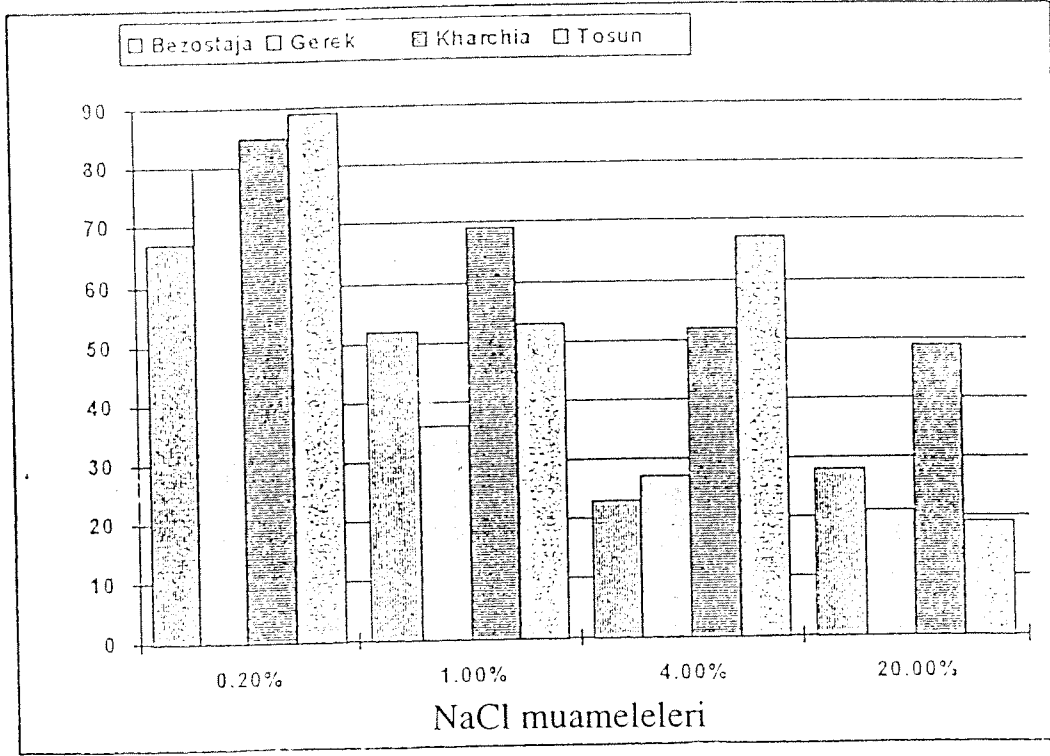
Şekil 2.3.2 Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) bir günlük stres sonucu PS-II aktivitelerindeki değişim.

Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.



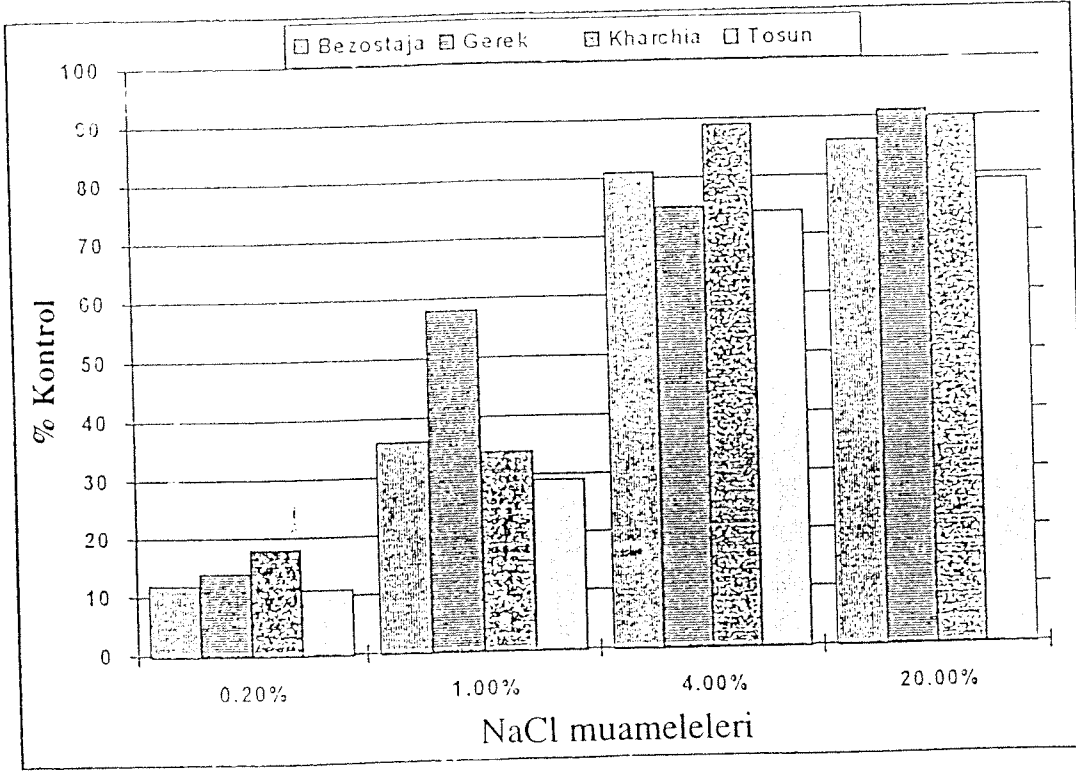
Şekil 2.3.3. Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) üç günlük stres sonucu PS-II aktivitelerindeki değişim.

Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.



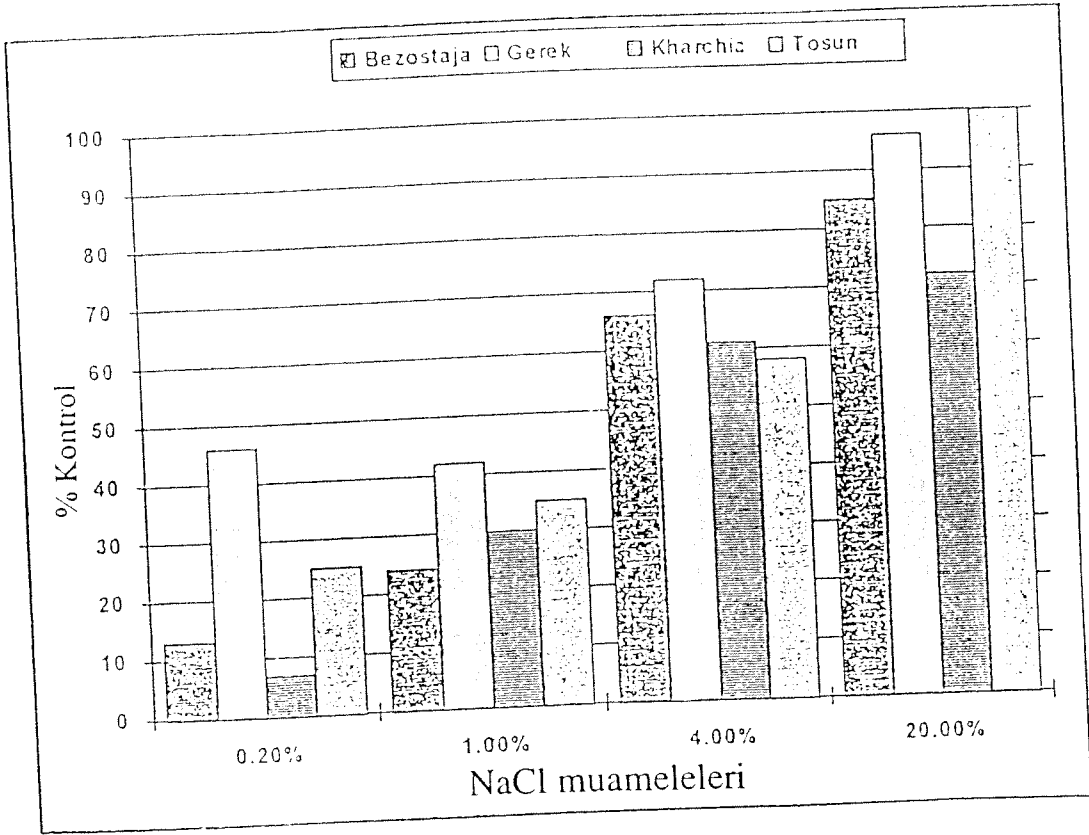
Şekil 2.3.4 Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) beş günlük stres sonucu PS-II aktivitelerindeki değişim.

Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3.5 Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) bir günlük stres sonucu hücre zarlarında meydana gelen yaralanma.

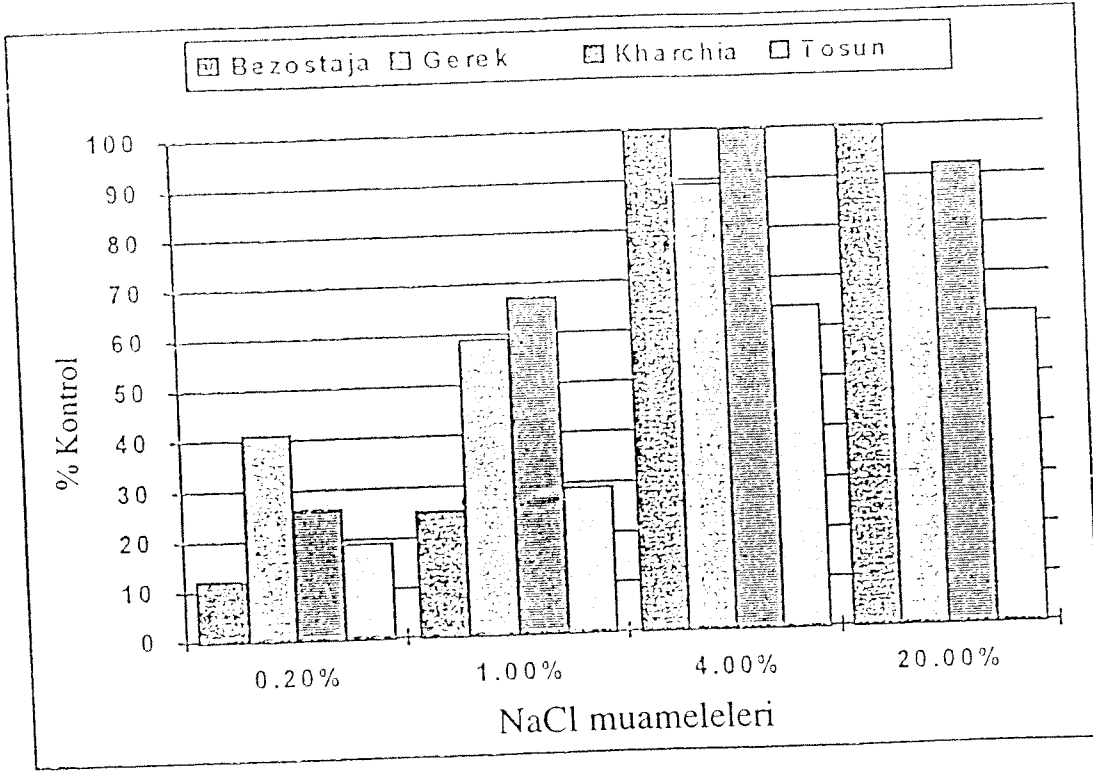
Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3.7. Bezostaya, Gerek, Kharchia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) beş günlük stres sonucu hücre zararında meydana gelen yaralanma.

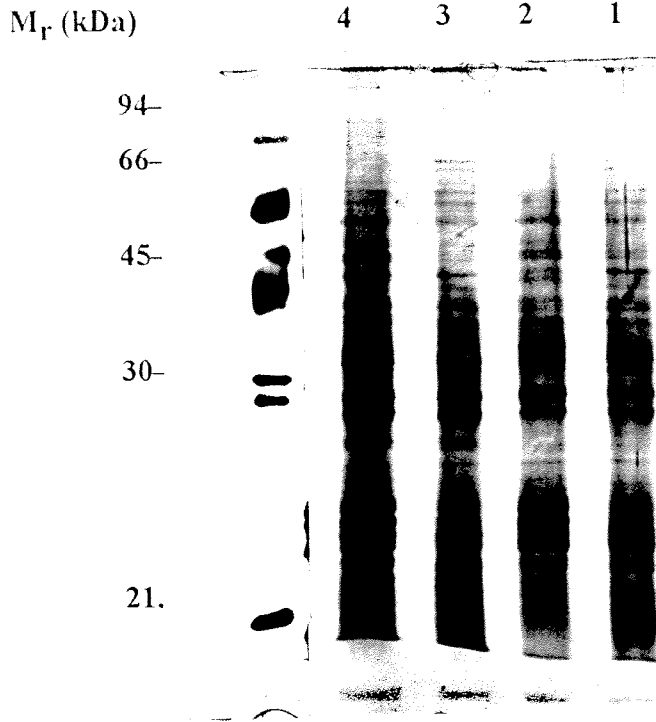
Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.





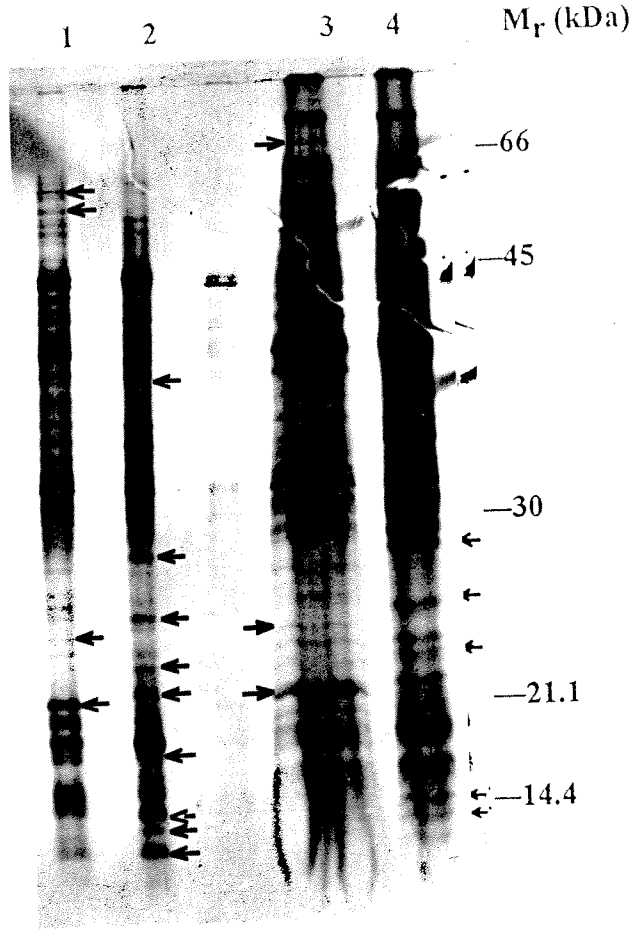
Şekil 2.3.6 Bezostaya, Gerek, Kharachia ve Tosun çeşitlerinde farklı stres koşullarında (% 0.2, 1, 4 ve 20 NaCl) üç günlük stres sonucu hücre zarlarında meydana gelen yaralanma.

Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir.

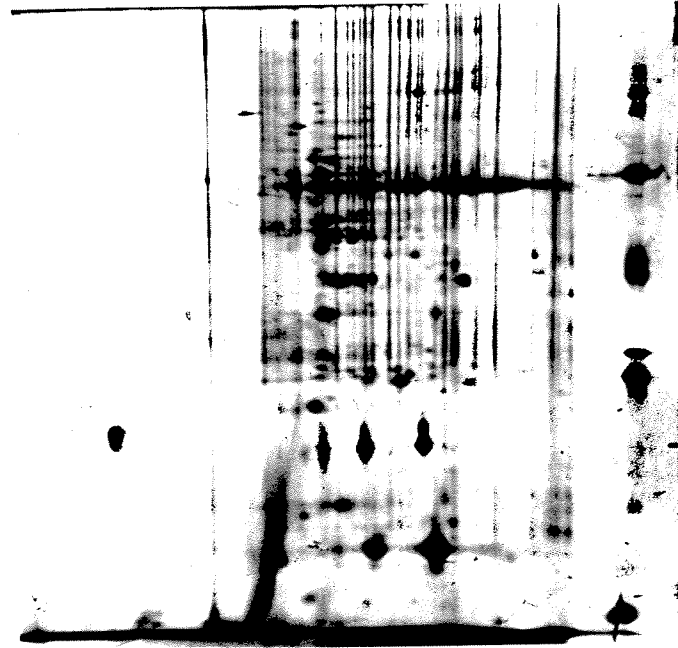
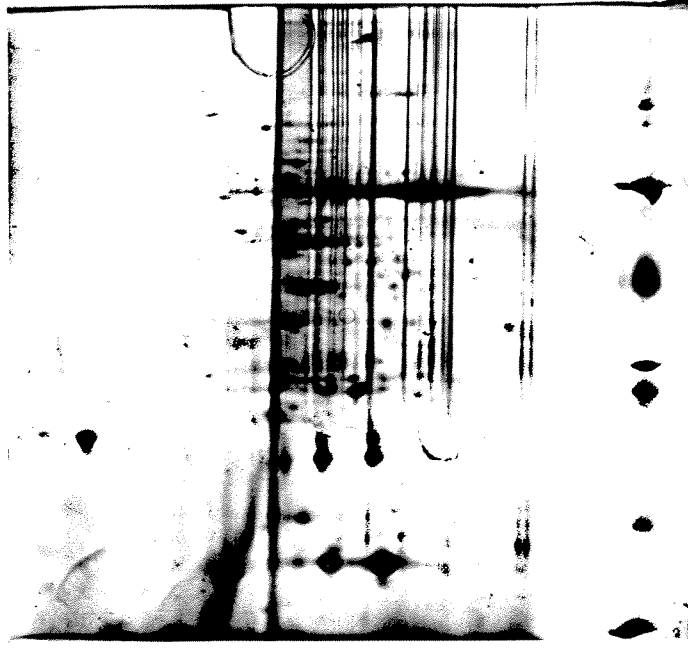


Şekil 2.3.8. Tosun ve Gerek çeşitlerinde %2 NaCl stresinin 3 gün süre ile uygulanması sonucunda kök protein profillerindeki değişimler.

Soldan sağa kolon sıralaması: Moleküler ağırlık markörleri (Yukarıdan aşağı: 94, 66, 45, 30, 21.1 kD), Gerek kontrol, Gerek %2 NaCl-3 gün, Tosun kontrol, Tosun %2 NaCl-3 gün.



Şekil 2.3.9. Tosun çeşidinde <sup>35</sup>S-Methionin ile işaretleme sonucu NaCl stresi altındaki kök protein profilleri. Soldan sağa kolon sıralaması: Tosun kontrol, Tosun %4 NaCl-1 gün, Gerek kontrol, Gerek %4 NaCl-1 gün.



Şekil 2.3.10. Bir gün süre ile NaCl stresi uygulanmış Tosun çeşidinde yaprak dokusu proteinlerinin 2D-SDS-PAGE ve gümüş boyama profilleri.

(a) Kontrol (b) %4 NaCl

### 3.1 Giriş

Kuraklık stresi diğer stres faktörleri gibi kurak ve yarı kurak alanlarda bitkinin verimini ve kalitesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Son zamanlarda kuraklığa dayanıklılık mekanizmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. (Morgan 1984, Blum 1988, Ludlow and Muchow 1990). Bu çalışmalarda amaç kuraklığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve verimdeki sapmaların azaltılmasıdır. Bitkilerin kuraklık stresi karşısındaki fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini incelediğimizde genel olarak iki davranışla karşılaşmaktadır.

- Kuraklıktan kaçma
- Kuraklığa dayanıklılık kazanma.

Kuraklıktan kaçma hızlı yaşam döngüsü ve plastisity ile ifade edilir. Kuraklığa dayanıklılık kazanma ise tekrar iki kısımda incelenir.

(i) Su kaybının önlenmesi, köklerin sayılarında artış ve derinlere uzama (Buğday ve sorgumda gözlenir); yaprakların yer değiştirmesi, kıvrulması, stomatal kapanma, yüzey buharlaşmasının azalması, hızlı su alımı.

(ii) Su kaybına karşı dayanıklılık ozmotik ayarlama ile mümkün olmakta, iyonların hücre içinde dağılımı, tonoplasta alınması veya uzaklaştırılması, pinitol manitol gibi şeker alkollerinin hücre içinde depolanması, absisik asit (ABA) miktarında artış ve "rab" proteinlerinin sentezi. Son zamanlarda tahıl bitkilerinde ozmotik ayarlama kuraklık stresine dayanıklılık mekanizmasında önem kazanmıştır. (Girma ve Krieg 1992). Sorgum ve çeltikte bu tip çalışmalar yapılmıştır. Ozmotik ayarlama Şeker alkollerin sentezinden, iyon kanallarına tonoplast zarların yapısından, hücre zarı yapısına ve  $H^+$ /ATPase sistemlerine kadar birden fazla parametreyi içermektedir. Dolayısı ile bu olayların fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılmasının yanısıra gen seviyesinde de belirli moleküler markörlere ihtiyaç vardır. Bu tip çalışmalar Henry Nguyen; (Texas Tech Üniversitesi, Lubbock ,USA) ve Abraham Blum (The Volcani Center, İsrail) tarafından buğdayda başlatılmıştır.

Kuraklığa dayanıklılık kriteri olarak ozmotik ayarlama ile ilgili moleküler markörlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Diğer taraftan kuraklık stresi altında (yüksek sıcaklık, yüksek ışık şiddeti) bitkilerin en çok etkilenen kısımları fotosentetik ünitelerdir. Kuraklık stresi altında fotosentetik aktivitede azalma, Ritchi S.W, Henry T. Nguyen ve A. S. Holaday tarafından 1990'da buğdayda gösterilmiştir. Çalışmanın bu kısmında kuraklığın Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Doğu Anadolu daki tarım alanlarının en önemli problemlerinden biri olduğu gözönünde bulundurularak bu yörelerde ekimi yapılan buğday çeşitlerinin kuraklık stresine dayanıklı olanlarının PSII Aktivite ölçümleri ve hücre zarı geçirgenlik teknikleri ile laboratuvar şartlarında kısa zamanda seçimi amaçlanmıştır.

## **3.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.3.1. Bitki materyali**

Bu kısımda Yayla, Gerek, Bolal, Tosun ve Bezostaja kullanılmıştır. Tohumlar 40 % lik  $HClO_4$  içerisinde 20 dakika süre ile sterilize edildikten sonra musluk suyunda yıkanır ve perlit üzerinde iklim dolabında  $23\pm 3$  derecede 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde gün aşırı sulanarak 7 gün süre ile büyütülür.

### **2.3.2. Kuraklık Stresinin Uygulanması**

Kuraklık stresi 7. gün itibari ile sulama işlemini keserek başlatılır. Kontrol numuneler için sulama işlemine devam edilir. Suyun kesilmesi işleminden itibaren 3., 6. ve 9. günlerde yaprak numuneleri toplanır. Sıcaklık stres kısmında belirtildiği gibi fizyolojik analizler PS-II ölçümleri ve hücre zarı geçirgenlik testleri hemen . Kullanılan deneysel yöntemler 1.2. Bölüm'ünde verilmiştir.

### 3.3. Bulgular

#### 3.3.1. Kuraklık Stresinin PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kuraklık stresi uygulanmış buğday çeşitlerinde PS-II aktivite ölçümleri farklı zaman aralıklarında yapılmıştır. 3. ve 6. günün sonunda PS-II aktivite sonuçları Şekil 3.1'de bar grafik ve kontrol bitkilerden elde edilen aktivitenin yüzdesi halinde gösterilmiştir. PS-II aktiviteleri kontrolün yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Kuraklık stres uygulamasının 3. gününde Gerek (%77), Yayla (%71), Tosun (%61), Bezostaja (%59) ve Bolal (%52) aktivite göstermişlerdir. Stres uygulamasının 6. günündeki ölçümlerde bazı çeşitlerde belirgin düşüşler görülmektedir, örneğin Yayla (%37), Tosun (%33). Bezostaja hemen hemen değişmemiş, Bolal (%73) ve Gerekte (%90) artışlar gözlenmiştir. Ancak 9 günlük bir kuraklık stresi sonunda en yüksek aktivite Tosunda (%83) ve Gerekte (%77) gözlenmiş olup Bezostaja (%36) ile en düşük aktiviteyi vermiş, Yayla (%53) ve Bolal (%52) fazla değişmemişlerdir. Tosun çeşidinin 9. gününde gösterdiği aktivite oldukça yüksek olup sıcaklık stres sonuçları ile paralellik vardır.

#### 3.3.2. Kuraklık Stresinin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerine Etkisi

Hücre zarı geçirgenlikleri kuraklık stresinin 3. ve 7. gününde farklı buğday çeşitlerinin yaprak dokusunda ölçülmüş olup sonuçlar Şekil 3.2'de bar grafikleri halinde gösterilmiştir. 3. günün sonunda Tosun çeşidinde görülen yaralanma %4 civarında olup oldukça düşüktür. Diğer buğday çeşitlerinden Yayla, Gerek, Bolal ve Bezostaja'da %15 civarındadır. Kuraklığın 7. gününde yapılan ölçümlerde Tosun çeşidinde gözlenen yaralanma %15 civarında olduğu halde Bezostaja'da %18, Gerekte %33, Yaylada %35 ve Bolalda %45 dir. Tosun bu sonuçlar ışığında yine en dayanıklı çeşit olarak gözlenmiştir. Kuraklık stresine yönelik çalışmaları iki kere tekrarlanmıştır.

(i. Perlit üzerinde verilen data, ii. Toprak üzerinde verilen data). Sonuçların güvenilirliği açısından çalışmaların tekrarı gereklidir.

#### 4. TARTIŞMA

Kuraklık stresi diğer bitkilerde olduğu gibi tahıl bitkilerinde de fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olmakta ve verimi düşürmektedir. Kuraklık su azlığı veya su stresi ile direkt ilgili olduğu için tuz stresi ve yüksek sıcaklıkla da ilgilidir.

Su kaybını önlemek için bitkilerin izlediği genel tutum, yaprakların alanlarının küçülmesi, kıvrılmaları, stomatanın kapanması, yüzey solunumunun azalması ve daha az CO<sub>2</sub> tutması, dolayısı ile fotosentez aktivitesinde azalma şeklindedir.

Kuraklığa dayanıklılık mekanizması üzerinde çalışmalar olmasına rağmen (Blum 1990), kurağa dayanıklı bir bitki genotipi henüz belirlenememiştir. Bitkiler daha ziyade kuraklığa adaptasyon göstermektedirler. Kuraklık sırasında tuz stresinde olduğu gibi ozmotik ayarlamamanın önemli olduğu görülmüştür. Aynı şekilde, yapılan çalışmalarda ozmoregülatant maddelerin; örneğin manitol, pinitol, sorbitol gibi şeker alkollerini veya prolin, betain-alanin gibi amino asitlerin; sentezinde ve hücre içi derişimlerinde artış gözlenmiştir.

Bu maddeler su moleküllerini taklit etmekte, su tutucu özelliklerinin yanısıra suyun olmadığı ortamda hücre zarı proteinleri veya hücre içerisindeki bazı enzimlerle birleşerek, onların parçalanmasını engellemektedirler. Uzun süreli stres durumlarında ise karbon kaynağı olarak kullanılabilirler (Bohnert 1995).

Kuraklık stresi altında dolayısı ile kök hücre zarı geçirgenliği de önem kazanmaktadır. Hücre zarı lipid yapısı, doymuş/doymamış yağ asitlerinin oranı, hücre zarı akışkanlığı dolayısı ile geçirgenliği önemli parametrelerdir. Kuraklık stresi altında kök hücre zarı lipid kompozisyonlarına yönelik çalışmalar birbirleri ile oldukça çelişkili sonuçlar vermiştir (Ferrari ve Illion 1984, Caldwell ve Whitman 1987, Liljenberg 1992).



Bu farklılıklar stres sırasında lipid peroksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Dolayısı ile dayanıklı çeşitlerde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzim aktivitelerinin yüksek olması beklenmektedir (Quartacci ve Navam 1992). Lipid peroksidasyonu kloroplast zarlarını dolayısı ile de fotosentez aktivitesini etkilemektedir. Bu nedenlerden dolayı kurağa dayanıklı çeşitlerin seçilmesinde hücre zarı geçirgenliği ve fotosentez aktivitesinin belirlenmesi önem kazanmıştır.

Çalışmanın bu kısmında kuraklık stresi altında farklı buğday çeşitlerinin fotosentez II (PS-II) aktivitesine ve hücre zarı geçirgenliğine bakılmıştır. Şekil 3.1'görüldüğü gibi PS-II ölçümleri kuraklık stresinin 3, 6 ve 9'uncu günlerinde yapılmıştır. Üç günlük kuraklık stresi sonucunda buğday çeşitlerinin en yüksek aktiviteden en düşük aktiviteye göre sıralaması şöyledir : Gerek (%77), Yayla (%71), Tosun (%61), Bezostaja (%59) ve Bolal (%52).

Stres uygulamasını 6'ncı gününde ise sıralama Gerek (%90), Bolal (%73), Bezostaja (%62), Yayla (%37) ve Tosun (%61) şeklindedir. Ancak 9'uncu günde Tosun (%83) ve Gerek (%77) olarak gözlenmiş, Bezostaya (%36) ise en düşük aktiviteyi göstermiştir. Tosun çeşidinin 9'uncu günde gösterdiği aktivite oldukça yüksek olup sıcaklık stresi sonuçları ile aynı doğrultudadır.

Hücre zarı geçirgenliğine bakıldığında (Şekil 3.2), Tosun 3'üncü günün sonunda en az yaralanma(%5) ile en dayanıklı çeşit olarak görülmüştür. En yüksek yaralanma Bolal ve Yaylada gözlenmiştir. 7'nci günün sonunda en yüksek yaralanma Bolalda saptanmış onu Yayla, Gerek ve Bezostaya takip etmiştir. En az yaralanma yine Tosun çeşidinde gözlenmiştir.

Bu sonuçlardan, hem PS-II hem de hücre zarı geçirgenlik testlerinin sonunda Tosun en dayanıklı çeşit olarak bulunmuştur. Bu sonuçların sıcaklık ve tuz stresi ile de uyum halinde olması dikkat çekiçidir.

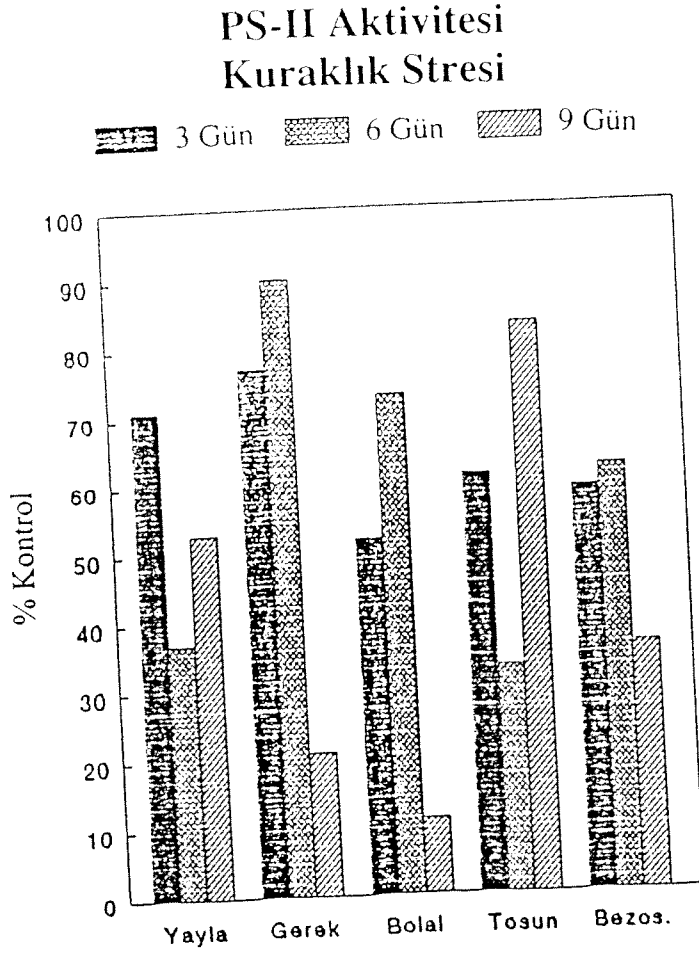
Yapılan bu çalışmalara ek olarak, aynı çeşitlerde tuz stresi altında kök dokusu toplam yağ asitlerinin kompozisyonuna da bakılmıştır (Soydan 1995). Tosun, Bolal, Gerek ve Bezostaja çeşitlerinde 8'inci gün kuraklık stresi sonucu doymamış yağ asitlerinin oranında belirgin bir artış gözlenmiştir.

Sonuç olarak, uygulanan PS-II aktivite ve hücre zarı geçirgenlik testlerinin kısa sürede dayanıklı çeşitlerin seçiminde kullanılabileceği gösterilmiştir.

### 3.5. KAYNAKLAR

- Blum A., *Plant breeding for stress environments*, CRC Press, Boca Rato Florida, (1988)
- Blum A., Pnuel Y., Physiological attributes associated with drought resistance of wheat cultivars in a medditerenian environment. *Aust. J. Agric. Res.*, 41, 799-810, (1990).
- Bohnert, H.J., Neldon D.E., Jensen R.G., Adaptations to environmental stresses, *The Plant Cell*, 7, 1095-1111, (1995).
- Caldwell C.R., Whitman C.E., Temperature induced Protein conformational changes in Barley root plasma membran enriched microsomes I. Effect of temperature on membrane protein and lipid mobility, *Plant Physiology*, 84, 918-923, (1987).
- Ferrari-Iliou R., PhamThi A.T., Da Silva J.V., Effect of water stress on the lipid and fatty acid composition of cotton (*Gossypum Hirsutum*), *Physiologia Plantarum*, 62, 219-224, (1984).
- Girna F.S., Krieg D.R., Osmotic adjustment in sorghum II. Relation to gas exchange rates, *Plant Physiol.*, 99, 583-585, (1992).
- Liljenberg C., The effect of water deficit stress on plant membrane lipids, *Prog. Lipid Research*, 31, 335-345, (1992).
- Ludlow M.M., Muchow R.C., Aeaitrual evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments, *Adv. Agron.*, 43, 107-152, (1990).
- Morgan J.M., Osmotic regulation and water stress in higher plants, *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 35, 289-319, (1984).
- Ritchie S.W., Nguyan H.T., Holaday, A.S., Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, 105-111, (1990).
- Quartacci M.F., Navari-Izzo F., Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings, *J. Plant Physiol.*, 139, 621-625, (1992).
- Soydan A., *Characterization of Lipid Composition of Wheat Varieties Under Stress Conditions*, (Yüksek Lisans Tezi), O.D.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, (1995).

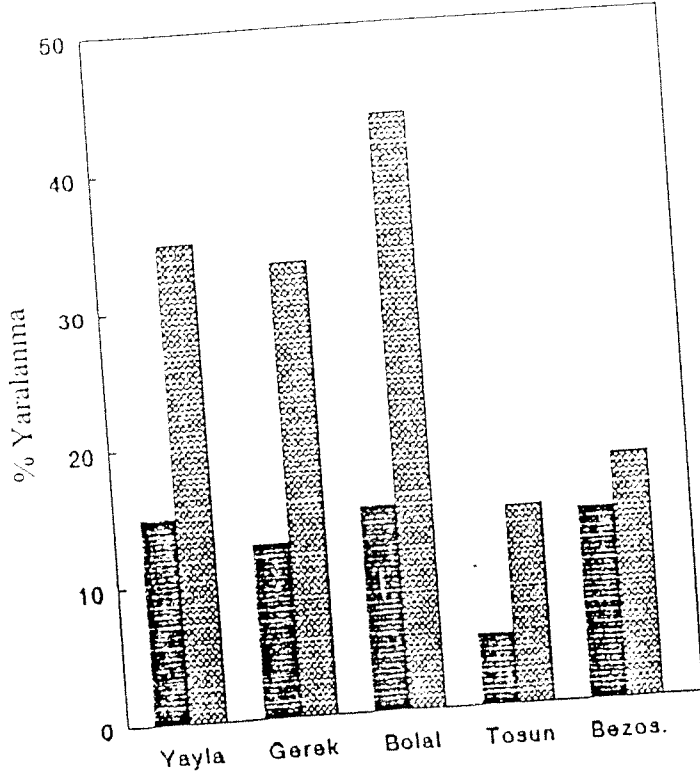
### 3.6. ŞEKİLLER



Şekil 3.1. Kuraklık stresinin farklı buğday çeşitlerinin fotosentez aktiviteleri üzerine etkisi. Sonuçlar kontrol numunelerden elde edilen PS-II aktivitelerinin yüzdesi olarak ifade edilmektedir.

## Kondaktivite Kuraklık Stresi

3 GÜN 7 GÜN



Şekil 3.2. Kuraklık stresinin farklı buğday çeşitlerinin hücre zarı geçirgenliği üzerine etkisi.

## 4. BÖLÜM SOĞUK VE METAL STRESİ

### 4.1. GİRİŞ

Soğuk ve metal stresi Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinde çalışıldığı için bir arada verilmiştir. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) endüstriyel açıdan oldukça önemli bir tahıl bitkisidir. İçerdiği morfin, kokein, dionin gibi opium alkaloidlerden dolayı, tıpta ilaç sanayinde geniş kullanım alanlarının olmasının yanısıra tohumdaki yağın cinsine bağlı olarak yemeklik olarak veya sabun, boya maddesi yapımında kullanılmaktadır. Haşhaş, Türk çiftçisi için önemli bir bitki olup M.Ö. 300'lerden beri Anadolu'da ekilmektedir. Diğer tahıl bitkileri gibi haşhaş da sıcak soğuk yüksek radyasyon ve metal kirliliği gibi çevre koşullarından etkilenmektedir. Çevre koşullarının neden olduğu stres faktörleri ürünün kalitesini etkilediği gibi verimi de oldukça etkilemektedir.

Çalışmanın bu kısmında soğuk ve metal stresinin haşhaş bitkisi üzerinde etkisi ve stres koşullarında sentezlenen proteinlerin profillerine ve PSII aktivitelere bakılarak çalışılmıştır.

#### 4.1.1 Soğuk Stresi

Birçok bitki düşük sıcaklıkta donma ve yaralanma problemleri ile karşı karşıya kalırlar. Bazı bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıktan sonra soğuğa dayanıklılık kazanmaktadırlar. Diğer stres koşullarında olduğu gibi bitkiler soğuk stresi altında fizyolojik ve biyokimyasal aktivitelerinde değişim görülür. Örneğin fotosentez aktivitelerinin azalması, hücre zarı lipid kompozisyonunda değişimler, desaturaz enzim aktivitesinde artış gibi (Howarth 1983, Scott 1986, Guy 1988).

Dela Roche ve arkadaşları (1972) buğday üzerinde yaptıkları çalışmada tohumlar farklı sıcaklıklarda 24° ve 2°de büyütüldükten sonra serbest yağ asitlerine ve fosfolipid kompozisyonlarına bakılmış, 2°de büyütülen tohumlarda fosfolipid miktarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde karbohidrat metabolizmasında değişiklikler görülmüş sukroz, fruktoz ve bazı şeker alkollerin miktarlarında artış gözlenmiştir.

Diğer stres faktörleri gibi soğuk stresi verimi düşürdüğü gibi bitkinin gıda değerinde ve kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Soğuğa dayanıklılık mekanizmasının anlaşılması soğuğa dayanıklı çeşitlilerin seçilmesinde önemli olduğu kadar soğuğa dayanıklı transjenik bitkilerin geliştirilmesinde de önemlidir. Haşhaş endüstriyel önemi olan bir bitki olduğundan biyokimyasal metabolizmasında meydana gelen değişiklikler sentezlenen alkaloidlerin miktarını ve cinsini etkileyeceği için biyokimyasal değişimlerin anlaşılması önemlidir. Bu kısımda soğuk stesi altında sentezlenen proteinlerin profillerine ve fotosentez aktivitesine (PS-II) farklı haşhaş çeşitlerinde bakılmıştır.

#### 4.1.2. Metal Stresi

Bitkiler ağır metal içeren toprakda büyüdüklerinde metale karşı dayanıklılık geliştirmektedirler. Dayanıklılık mekanizması moleküler seviyede anlaşılmaya çalışılmaktadır. Örneğin (i) Metal stresi altında metal bağlayan proteinlerin sentezlerinde artış (ii) Metallerin hücre içi dağılımı vakuolde toplanmaları (iii) Hücre zarında değişiklikler (iv) Yeni strese özgü metabolit veya protein sentezi gibi konular araştırılmaktadır.

(i) Metal bağlayan proteinlerin , polipeptidlerin ve moleküllerin sentezi: Yüksek bitkilerin metal stresi altında metal tutucu (Chelating) maddeleri örneğin aminoasitler (Reilly 1972) sitrik asit (Lee 1977, Thurman ve Rankin 1982); malik asit (Brookes ve arkadaşları 1981) ve fitokelatins (phytochelatins) (Grill ve arkadaşları 1987, 1989). Fakat sentezlenen bu molekül ve peptidlerin koruyucu özellik taşıdıklarına dair herhangi bir sonuç mevcut değildir (Ernst 1992). Buna sebep olarak hem hassas hem dayanıklı çeşitlerde aynı miktarda ve aynı tip fitokelatin sentezlenmiş olmasıdır.

(ii) Hücre içi dağılımı hücre fraksiyonları ile çalışılmış daha sonra D. Neumann ve arkadaşları(1994) Cd stresi altında *Lycopersicon perivianum* L. hücre süspansiyonlarında elektron mikroskop ve immunolabing teknikleri ile hücre içi dağılımlarına bakmıştır. Cd stresi altında sıcaklık stres proteinlerinin de sentezlendiği, HSP70'nin plazma zarında ağır metallerle bağlandığı ve koruyucu etkisi olduğu ileri sürmüştür.

(iii) Hücre zarında meydana gelen değişiklikler: Hücre zarının geçirgenliğinin etkilendiği (Veltrup 1978, Devos ve arkadaşları 1988) gösterilmiş ancak dayanıklı ve dayanıksız çeşitlerde ne tip farklılıklar olduğu gösterilmemiştir.

Diğer tip çalışmalar enzim seviyesinde olup  $Mg^{++}$ ,  $Al^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  gibi metal iyonlarının farklı bitki türlerinde kökte hücre zarının geçirgenliğini nasıl etkilediği (Çakmak&Marschner 1988) ve metal iyonlarının lipid peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi çalışılmıştır (Çakmak ve Horst 1991).

Çalışmanın bu kısmında 3mM  $Cd^{++}$  stresi altında sentezlenen proteinlerin soğuk ve sıcaklık stresi altında sentezlenen proteinlerden farklı olup olmadığına bakılmıştır.

## **4.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **4.2.1. Bitki Materyali ve Büyütülmesi**

Haşhaş 79, 119 ve 163 çeşitleri TMO-Alkasandan temin edilmiştir. Tohumlar 70% ethanol ile çalkalandıktan sonra 50% (V/V)  $NaClO_4$  solusyonunda 10 dakika bekletilir ve musluk suyu ile yıkandıktan sonra perlit üzerine ekilir. Tohumlar 22 derece sıcaklıkta 15 saat aydınlık 9 saat karanlıkta olacak şekilde büyüme dolabında 10 gün süre ile büyütülür. Onuncu günün sonunda stres uygulaması yapılır.

### **4.2.2. Stres Uygulaması**

#### **4.2.2.1. Soğuk Stresi**

Soğuk stresi 4 derecede 5 saat süre ile soğutmalı inkübatör de uygulanır. Sıcak stresi 40 derecede inkübatörde büyümeye bırakılır. Stres uygulaması sonunda yaprak numuneleri toplanır ve sıvı azotta dondurulur. Proteinlerin izolasyonuna kadar -20 derecede saklanır.



#### 4.2.2.2. Metal Stresi

On gün süre ile perlit üzerinde büyütülmüş olan haşhaş bitkileri farklı derişimlerde hazırlanmış  $Cd(NO_3)_2$  solusyonuna kökleri ile beraber geçirilir ve 3 gün süre ile bu konuda inkübatörde büyümeye bırakılır.

#### 4.2.2.3. PS-II Aktivite Ölçümleri

Stres uygulaması sonunda yaprak numuneleri alınır, fotosentez aktivite ölçümleri (PS II) için tyhlakoid zar izolasyonu Burke ve arkadaşları yöntemine göre (1978), izole edilen tyhlakoid zarlarda klorofil miktarı Arnon (1949) yöntemine göre yapılır PS-II aktivite ölçümleri 2,4 diklorofenolindo fenol (DCPIP) kullanılarak yapılır. Methodların ayrıntıları daha önceki bölümlerde (1.2.2.3.1) verilmiştir.

#### 4.2.2.4. Protein İzolasyonu

Proteinler sıvı azotta dondurulmuş yaprak dokusundan Damerval ve arkadaşları yöntemine göre izole edilir. Takip edilen protokol bölüm 1.2.2.4.1'de verilmiştir. Numunelerin protein derişimleri Bradford yöntemine göre bovine serum albumin (BSA) standart proteini kullanılarak yapılmıştır.

#### 4.2.2.5. Jel Elektroforez Yöntemi ile Proteinlerin Karakterizasyonu

Protein numuneleri bir boyutlu (SDS-PAGE) veya iki boyutlu (IEF) jel elektroforez sistemlerine tabi tutularak karakterize edilmiştir. Bir boyutlu SDS-PAGE de Laemli, iki boyutlu (IEF) jel elektroforeinde Hockshraisser, yöntemleri kullanılmıştır. Yöntemler bölüm 1.2.2.4.2 ve 1.2.2.4.3'de izah edilmiştir. Elektroforez sonucunda protein bantları bölüm 1.2.2.4.4'de verilen gümüş boyama tekniği ile tesbit edilmiştir

### 4.3. BULGULAR

#### 4.3.1. Soğuk Stresi ve Metal Stresi Altında Sentezlenen Proteinler

Şekil 4.1'de soğuk stresi sonucunda sentezlenen protein profilleri verilmiştir. 1.ci ve 2.ci kolonlarda sırası ile H163 ile soğuk stresi uygulanan ve kontrol numuneleri 3.cü ve 4.cü kolonlarda H70, soğuk stresi ve kontrol numuneler görülmektedir. 4 derecede 5 saat süre ile soğuk stresi uygulaması sonucunda haşhaş 163 çeşidinde 37 kD molekül ağırlığında bir yeni protein sentezlendiği ve düşük molekül ağırlığında <17kD proteinlerin sentezlerinde artış olduğu gözlenmiştir. Diğer tarafta haşhaş 70 çeşidinde kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında soğuk stresi sonunda sentezlenen protein profilleri ile herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Numuneleri iki boyutlu Jel elektroforez (IEF) sistemine tabi tutulduklarında 163 çeşidinde 90kD ve 37kD molekül ağırlığında sentezlenen proteinler net olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2, (a)kontrol, (b) stres uygulanmış numuneler).

Metal stresi 3mM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> kullanılarak üç gün süre ile uygulanmıştır. Sonuçlar Şekil 3'de verilmiştir. Metal stresi sonunda 8-10kD, 17kD, 28-33kD ve 44kD civarında birden fazla proteinin sentezlendiği gözlenmiştir.

#### 4.3.2. Soğuk Stresinin Haşhaş Bitkisinde PS-II Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.4 (a) da soğuk stresinin (4 derecede 4 saat süre ile) iki haşhaş çeşidinin PS-II aktiviteleri üzerine etkisi ve kontrol numuneler görülmektedir. Sistem ışıkla uyarılınca 590nm dalga boyunda meydana gelen değişiklik zamana göre kaydedilir. Reaksiyon hızı (PS-II aktivitesi) eğrinin eğiminden hesaplanır. ( $\Delta A_{590} / \Delta t$ ). Şekilden de görüldüğü gibi Haşhaş 119 çeşidinin DCPIP'lı redüklenme hızı (PSII aktivitesi) Haşhaş 131 çeşidinden daha yüksektir. Şekil 4.4 (b)'de sabaha kadar 4 derecede soğuk stresi uygulanmış Haşhaş çeşitlerinde PS-II aktivite ölçümleri verilmiştir. Stres uygulanmış numuneler kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında reaksiyon hızının her iki çeşitte de çok yavaş olduğu gözlenmiştir. PS-II aktiviteleri kontrol numunelerinin yüzdesi olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar şekil 4.4'de gösterilmiştir

$$\%PSII \text{ aktivitesi} = V_T / V_C \times 100$$

$V_T$ : Stres uygulanmış numunelerde reaksiyon hızı.

$V_C$ : Kontrol numunelerde reaksiyon hızı.

6 saat 4 derecede soğuk stresi uygulaması sonucunda Haşhaş 119 çeşidinin Haşhaş 131 çeşidine nazaran daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Ancak sabaha kadar 4 derecede soğuk stresi uygulaması sonucunda her iki çeşitte de PS-II aktivite minimum düzeye düşmüştür.

#### 4.4. TARTIŞMA

Bitkilerde stres proteinleri son on yıl içinde oldukça önem kazanmıştır. Bu proteinlerin stres tolerans mekanizmasındaki rolleri kabul edilmiş olmasına rağmen özgün fonksiyonları yavaş yavaş anlaşılmaktadır. Farklı stres koşullarında normal proteinlerin mRNA'larında azalma ve strese özgün mRNA'ların sentezlerinde artış bu proteinlerin korunma mekanizmasında rolleri olduğunu göstermektedir. Ancak stresten korunma mekanizması oldukça karışık olup bu proteinlerin hücre içinde dağılımı, diğer protein ve enzimlerle ilişkileri, proteinlerin yarı ömürleri gibi diğer faktörleri de içermektedir. Dolayısı ile protein çalışmalarının diğer fizyolojik ve biyokimyasal çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması gerekmektedir.

Bu kısımda soğuk stresi altında haşhaş bitkisinde sentezlenen proteinler 1 ve 2 boyutlu SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmış ve gümüş boyama ile belirlenmiştir. Şekil 4.1'de iki ayrı haşhaş çeşidinde sentezlenen proteinlerin profilleri gösterilmektedir. Kolon 1 ve 2'de 163 çeşidinin sırası ile soğuk stresi uygulanmış ve kontrol numuneleri; kolon 3 ve 4'de ise 70 çeşidinin soğuk stresi ve kontrol protein profilleri gösterilmektedir. 163 çeşidinde soğuk stresi altında 37kD civarında ve düşük molekül ağırlığında 17kD, yeni proteinlerin sentezlendiği gözlenmektedir. 70 çeşidinde kontrol ve soğuk stresi uygulanmış numuneler karşılaştırıldığında farklılık görülmemiştir.

Soğuk stresi uygulanmış ve kontrol 163 çeşidinin proteinleri 2D SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile tekrar karakterize edildiğinde (Şekil 4.2) 1D-SDS-PAGE de gözlenen 37kD'lik

protein daha belirgin olarak görülmüş, ve yüksek moleküler ağırlığında 90 kD civarında yeni bir proteinde saptanabilmiştir.

Şekil 4.3'de 3mM Cd<sup>++</sup> metal stresinin 163 çeşidi üstünde 3 gün süre ile uygulanması sonucunda sentezlenen proteinlerin 1D SDS-PAGE profilleri gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi düşük moleküler ağırlığında 8-10 kD, 17 kD, 28-33 kD ve 44 kD civarında çok sayıda yeni proteinin sentezlendiği görülmüştür. Sentezlenen proteinler soğuk stresi proteinlerinden farklı olup, Cd<sup>++</sup>'ya özgün görülmektedir. Karşılaştırma amacı ile haşhaş çeşitlerinde sıcaklık stresi sonucunda sentezlenen proteinlerin 1D ve 2D SDS-PAGE profillerine gümüş boyama tekniği ile bakılmış (sonuçlar konu ile ilgili olmadığından burada verilmemektedir ancak ikinci ara raporda ve konuyla ilgili yayınumuzda (Öktem ve arkadaşları 1992) verilmiştir ve sıcaklık stresi altında farklı proteinlerin sentezlendikleri gözlenmiştir.

Ancak yüksek moleküler ağırlığında 70 kD ve 90 kD civarında sıcaklık stresi sonucunda sentezlenen proteinler sıcaklık stres proteinleri olarak bilinmelerine rağmen, hücrede konstitutif olarak sentezlenen proteinlerden 70 kD; yeni sentezlenen proteinlerin taşınımında ve korunmasında rolü vardır (chaperon rolü). 90 kD proteinin aynı şekilde soğuk stresinde de sentezlenmiş olması, stres koşullarında sentezlenen miktarlarda artışla ifade edilmiştir.

Bu çalışmada da görüldüğü gibi farklı stres koşullarında sentezlenen stres proteinleri farklı olduğu gibi aynı stres koşullarında sentezlenen proteinler türler arası ve çeşitler arası farklılık göstermektedir.

Çalışmalarımızda haşhaş çeşitleri soğuk stresi altında PS-II aktivitelerine göre de sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Şekil 4.4' de iki haşhaş çeşidinin 4 derecede sabaha kadar soğuk stresi uygulanması sonucunda fotosentez aktivitelerindeki değişiklik gösterilmiştir. PS-II aktivite ölçümleri 6 saat soğuk stresi uygulanması ile tekrarlanmış ve kontrolün yüzdesi olarak ifade edildiklerinde (Şekil 4.5) çeşitler arası farklılık görülebilmektedir. Altı saat soğuk stresi uygulanması ile PS-II aktivitelerine bakarak 119 çeşidinin 131 çeşidine göre daha dayanıklı olduğu söylenebilmektedir. Ancak uzun süreli soğuk stresi uygulanması her iki çeşit içinde ölümcül olmuştur. Bu çalışma uygulanan stresin süre ve şiddetinin de önemli olduğunu

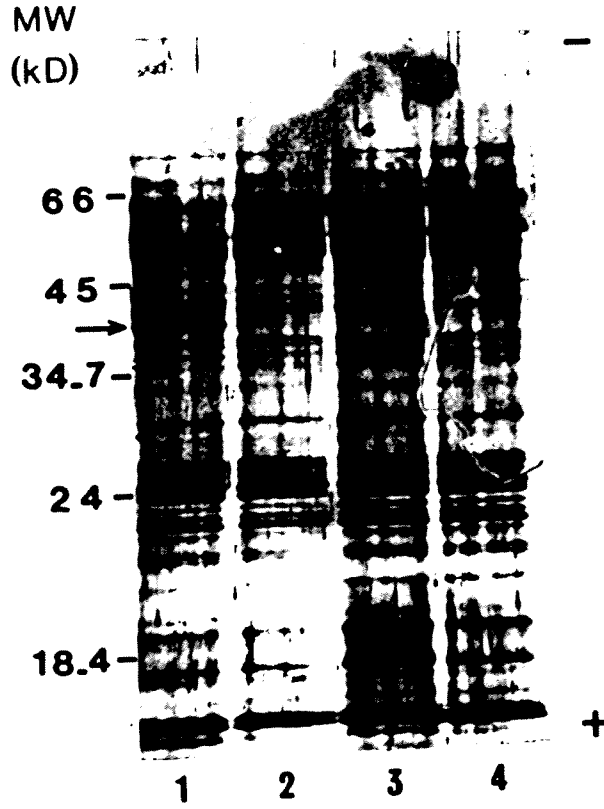
göstermektedir. Ancak strese dayanıklı çeşitlerin seçilebilmesi için daha fazla haşhaş çeşidinin taranması ve diğer parametrelerde (örneğin hücre zarı geçirgenliği, TTC mitokondri canlılık testi gibi) bakılması gerekmektedir.

#### 4.5. KAYNAKLAR

- Blum H., Improved Silver Staining of plant proteins : RNA and DNA in Polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99,
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation a microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254, (1976)
- Brookes A.J., Collins, J-C., Thurman D.A., Mechanism of zinc tolerance in grasses, *J.Plant Nutrition*, 3, 695-699, (1981).
- Çakmak, I., Marschner H., Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc defficient plants, *J Plant Physiol.*, 132, 356-361, (1988).
- Çakmak, I., Marschner H., Effect of aliminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activativities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Phisiologia Plantarum*, 83, 463-468, (1991).
- Damerval C., Vienne D., Zivy M., Thiellement H. Technical improvements in two dimensional ilectrophoresis increases the level of genetic variation dected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* , 7, 52-54, (1986)
- De Vos C.M., Schat H., Ernst W.H.O., Cupper mediated changes in membrane permeability, *J. Cell Biochem.*, 12A, Su 1, 48, (1988).
- Deka Roche I.A, Andrews C.J., Pomeroy M.K., Weinberger P., Lipid chenges in winter wheat seedlings (*Triticum aestivum*) at temperatures in cold hardines, *Canadian J. Botany*, 50,2401-2109, (1972)
- Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat M., Metal tolerance in plants, *Acta. Bot. Neerl.*, 41, 229-248, (1992).
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.M., Phytochelating a class of heavy metal binding peptides from plants are functionally analogues to metallothionines. *PNAS USA*, 84, 439-443, (1987).
- Grill E., Loffler L.S., Winnacker E.L., Zenk M.M., Phyto chelating a class of heavy metal binding peptides of plants are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamyl cystein dipeptidyl trans peptidase (Phytochelatin synthase). *PNAS USA*, 86, 6838-6842, (1989).

- Guy C.L., Haskell D., Detection of polypeptides associated with the cold acclimation process in spinach. *Electrophoresis*, 9, 787-796, (1980).
- Hochstrasser D.F., Harrington M.G., Hochstrasser A.C., Miller M.I., Merrill C.R., Methods of increasing the resolution of two dimensional Electrophoresis. *Anal Biochem.* 173:424-435, (1988).
- Horvartt I., Vigh L., Van Hasselt P.R., Woltejes I., Kurper P.J.C., Lipid composition in leaves of Cucumber genotypes as affected by different temperature regime and grafting, *Plant Physiology*, 57, 532-536, (1983).
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- Lee J., Reeves K.D., Brooks R.R.T., Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel accumulating plants, *Phytochemistry*, 16, 1503-1505, (1977).
- Mundy J. and Chua N.H. (1988) Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.*, 7, 2279-2286, (1987).
- Neumann D., Lichtenberger O., Günther D., Tshiersch K., Nover L., *Planta*, 194, 360-367, (1994).
- Öktem H.A., Özalp V.C., Nalbant D., Özkan F., Naqvi S.M.S., Memon A.R., Yücel M., Identification of stress induced proteins in different varieties of poppy (*Papaver Somniferum L.*), *Doğa Botanik Dergisi*, 16, 395-403, (1992).
- Reilly C., Amino acids and amino acid copper complexes in water soluble extracts of copper tolerant and non tolerant *Becium homblei Z.*, *Pflanzenphysiol*, 66, 294-296, (1972).
- Scott S.J., Jones R.A., Cold tolerance in tomato. II. Early seedling growth of lycopersicon ssp., *Physiol Plant*, 66, 532-536, (1986).
- Thurman D.A., Rakin A.J., The role of organic acids in zinc tolerance in *Desctiampsia caespitosa*, *New Phytol.* 91, 629-632, (1982).
- Veltrup W., Der einfluss von  $Ca^{++}$  und  $Mg^{++}$  auf die aktivitat von ATPasen aus gertenvurzein, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 173, 17-22, (1978).

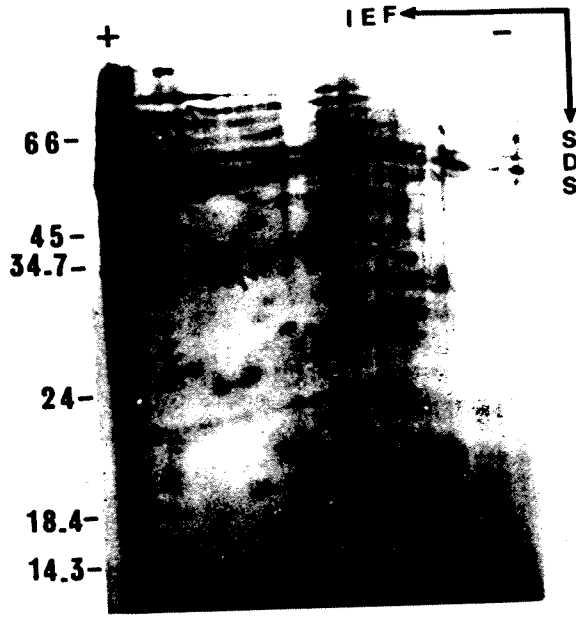
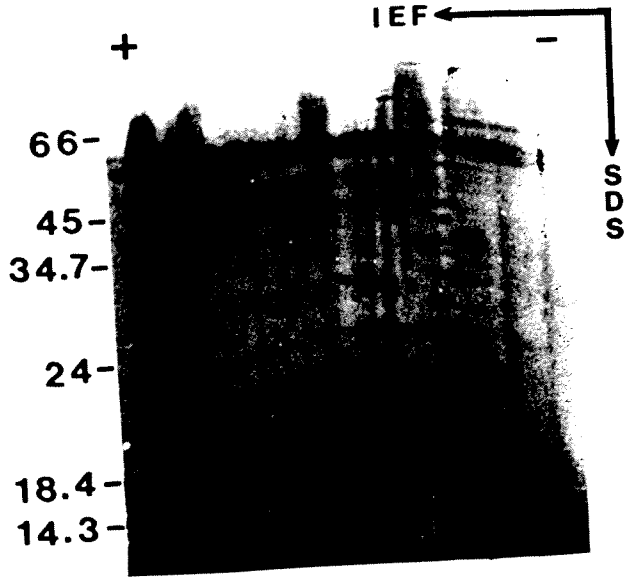
#### 4.6 ŞEKİLLER



Sekil 4.1. 4 derecede 5 saat süre ile soğuk stresi uygulanmış haşhaş çeşitlerinde yaprak dokusunda sentezlenen proteinlerin bir boyutlu SDS-PAGE profilleri.

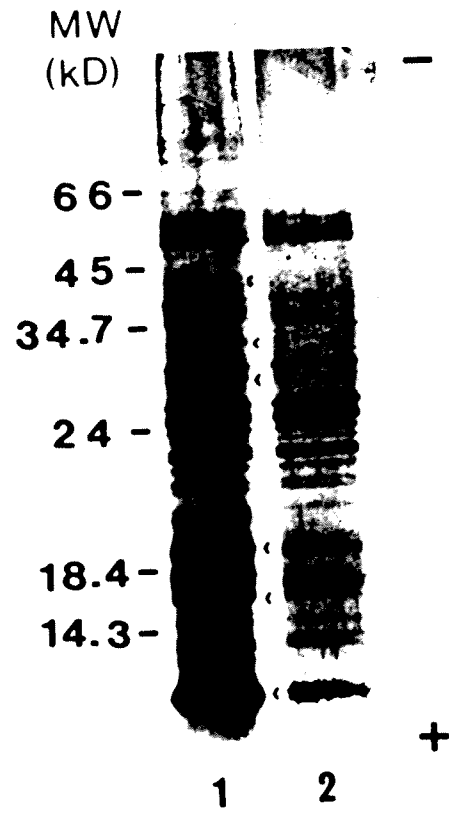
Kolonlar: 1: Haşhaş 163 soğuk stresi, Kolon 2: Haşhaş 163 kontrol, Kolon 3: Haşhaş 70 soğuk stres , Kolon 4: Haşhaş 70 kontrol. 163 çeşidinde soğuk stresi sonucu sentezlenen protein okla gösterilmektedir.





Şekil 4.2. Haşhaş 163 çeşidinde soğuk stresi uygulanmış ve kontrol numunelerinden hazırlanmış proteinlerin iki boyutlu SDS-PAGE profilleri.

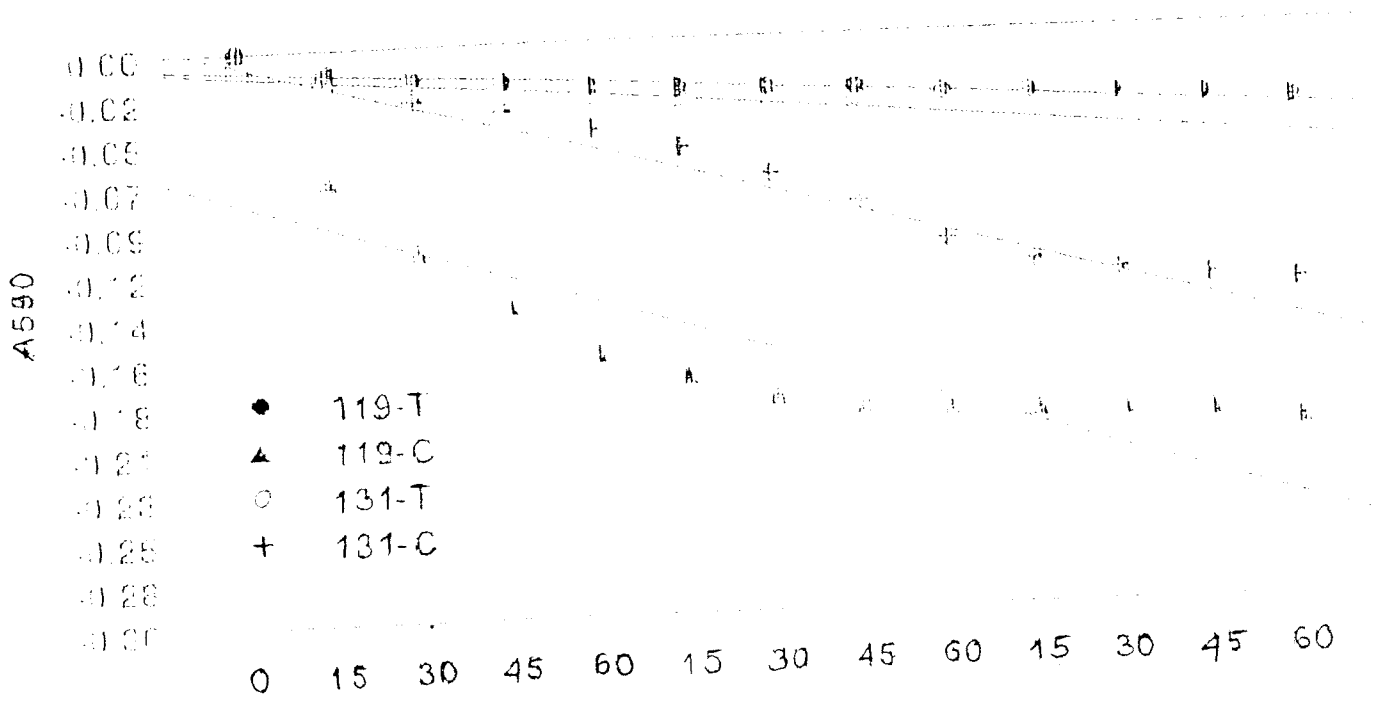
(a) kontrol, (b) soğuk stresi uygulanmış numuneler. Soğuk stresi sonucunda sentezlenen proteinler ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Haşhaş 163 çeşidinde 3mM Cd stresinin 3 gün süre ile uygulanması sonunda sentezlenen proteinlerin bir boyutlu SDS-PAGE profilleri.

Kolon 1: metal stresi uygulanmış numuneler Kolon 2: kontrol. Metal stresi sonucu sentezlenen proteinler oklar ile işaretlenmiştir.

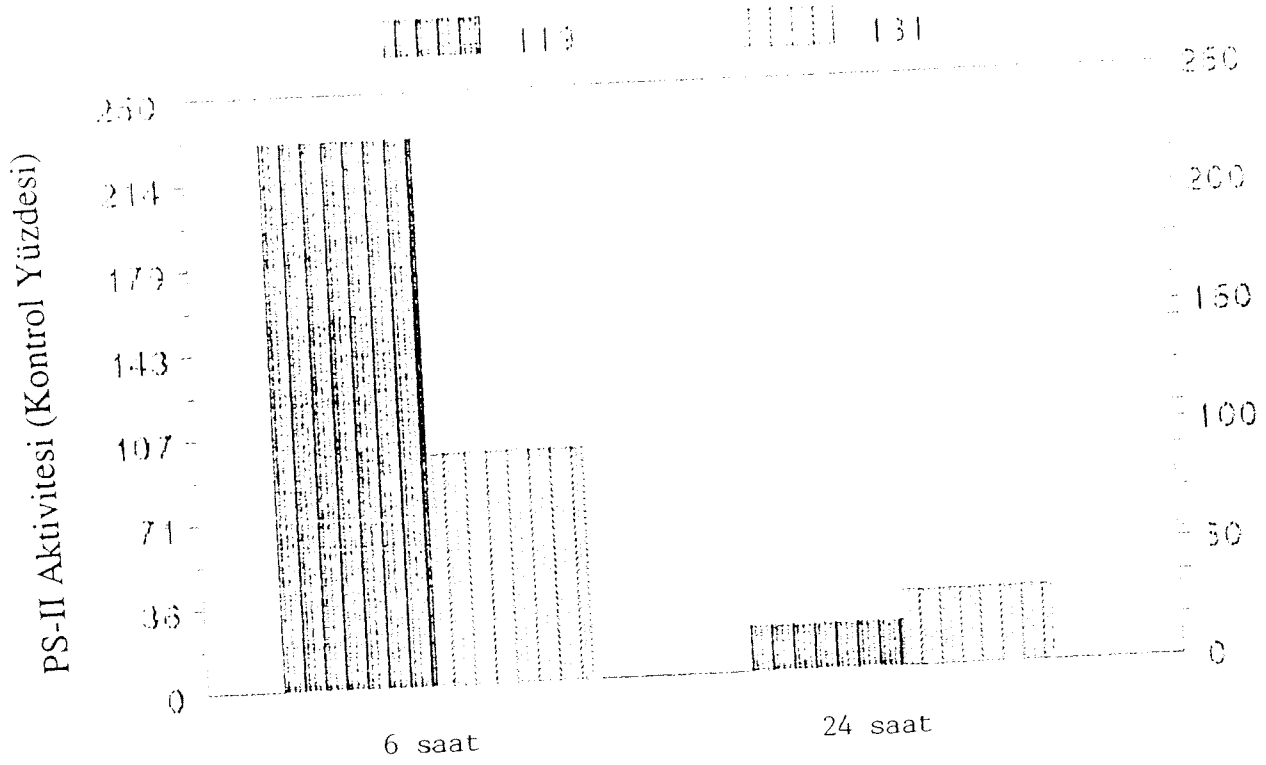
## PS-II, 4 °C, Sabaha Kadar



Sekil 4.4. 4 derecede sabaha kadar soğukluk stresi uygulanmış haşhaş çeşitlerinin PS-II aktivite ölçümleri.

C: Kontrol, T: Stres uygulanmış numuneler.

## PS-II Aktivitesi , 4 °C, Muamele Edilmiş



Şekil 4.5. 4 derecede 6 saat ve sabaha kadar uygulanan soğuk stresinin haşhaş çeşitlerinin PS-II aktiviteleri üzerine etkisi.

Çalışmalar 119 ve 131 çeşitleri üzerinde yapılmış ve sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

## 5. BÖLÜM

## GEN TRANSFERİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Son yıllarda "yeni biyoteknoloji" kavramı kapsamında ele alınan gen mühendisliği ve hücre doku kültürü teknikleri, Tarımsal Biyoteknoloji alanında geniş uygulama alanları bulunmaktadır. Bu uygulamalardan başlıcaları DNA parmak izi çalışmaları ve gen transferi çalışmalarıdır.

Projenin bu bölümünde yapılan çalışmalar iki kısım altında özetlenebilir:

- DNA parmak izi çalışmaları (5.A)
- *Agrobacterium* dayalı gen transferi çalışmaları (5.B)

Raporun bundan sonraki bölümlerinde bu konularda yapılan çalışmalar ayrı bölümler halinde ele alınacaktır.

### 5.1. DNA PARMAK İZİ ÇALIŞMALARI

#### 5.1.1. GİRİŞ

Bitkilerde DNA parmak izi çalışmalarının nihai amacı, bitkilerde kromozom haritalarının oluşturulmasıdır. Buna ek olarak, yine bu çalışmalar sayesinde kullanılan moleküler markerler sayesinde bir bitkinin istenilen özelliği taşıyıp taşımadığı DNA seviyesinde saptanmaktadır. Parmak izi çalışmaları, RFLP (Restricted Fragments Length Polymorphism) ve RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) teknikleri kullanılarak yapılabilmektedir. Her iki teknikte bitkilerden izole edilen DNA materyalinin moleküler markerler veya rasgele bir segmentin oluşan DNA parçacıkları ile analizine dayanmaktadır.

#### *Moleküler Marker Teknolojisi*

Tanksley, Paterson ve Dudley Moleküler Markerlerin kullanımına dayanan seçimle tahıl bitkilerinin geliştirilmesinin fenotip seçimine dayanan geliştirme tekniğine olan üstünlüklerini

anlatan makaleleri vardır. Ziraî önemi olan genetik özelliklerin çoğu birden fazla genin kontrolü altındadır. Fakat yinede bir gen bölgesine yakın olan moleküler markerler gelişmeyi sağlayabilir. Moleküler markerlere dayalı seçim yöntemi düşük derecede ırsiyet, çekiniklik ve zor uygulama zahmetli tekniklerin ortaya çıkardığı zorlukları aşmaktadır. Bu istenilen özelliklere sahip allellerin indirekt seçimi tahıl bitkilerinde RFLP haritalarının yapılmasının ardındaki nihai amaçtır. Çeşitli bitkiler için, örneğin mısır, *Zea mays* (Helentjaris, 1987, Burr 1991, Beavis et. al. 1991), fasulye, *Glycine max.* (Apuya et. al. 1988), domates, *Lycopersicon esculatum* (Tanksley and Hewitt 1988), *Brassica* türleri (Figdor et. al. 1988), marul, *Lactuca sativa* (Landry et. al. 1991), patates, *Solanum* (Bonierbale et. al. 1988), çeltik, *Oryza sativa* (McCouch et. al. 1988), arpa, *Hordeum vulgare* (Shine et. al. 1990, Heun et. al. 1991), sorgum, *Sorghum bicolor* (Whitkus et. al. 1992), yonca, *Medicago sativa* (Brummer et. al. 1993)'nin moleküler genetik haritalar mevcuttur.

RFLP haritaları bir çok tek gen ile kontrol edilen özellikleri transfer etmek için kullanılmıştır (Harberd et. al. 1986, Young et. al. 1988, McMullen and Louis 1989, Barone et. al. 1990, Jung et. al. 1990, Lobler and Hirsch 1990) ve nicel özellikleri transfer etmeyede teşebbüs edilmiştir. Landler ve Botstein (1989) RFLP haritalarının nicel özellikleri aktarmak için nasıl kullanılabileceğini detaylarıyla açıklamışlardır. Domateste RFLP'ler hücrenin iyon içeriğini kontrol eden genin bulunduğu bölgenin saptanmasında kullanılmıştır (Osborn et. al. 1987, Paterson et. al. 1988, 1989). Mısırdaki RFLP'ler verim ve heterozis farklılıklarının (Melehinger et. al. 1991, Smith et. al. 1990, Stuber 1992), sıcaklık toleransının (Ottaviano et. al. 1991), bitki boyunun (Beavis et. al. 1991) ve fosfor toleransının (Reiter et. al. 1991) genetik dayanağını bulmak için kullanılmıştır.

RAPD özeliği olmayan rastgele bir DNA diziliminin PCR ile çoğaltılmasından elde edilen polimorfizme dayanır (Williams et. al. 1990). Genellikle 50-80 %'lik G-C içeren ve palindromik dizilimi olmayan 9-10 bazlık bir dizilim kullanılmaktadır. Primer rasgele seçildiği için herhangi bir dizilim bilgisi gerekmemektedir. Uygulamanın hızlı olması, radioaktivite içermemesi ve çok az miktarda DNA materyali gerektirmesi bu tekniğin RFLP'ye üstünlüğünü sağlayan avantajlardır. (Barone et al., 1990).

## 5. 1. 2 MATERYAL ve YÖNTEMLER :

Bitki numuneleri için RFLP yönteminde izlenen genel protokol sırası ile aşağıda belirtilmiştir.

### 5.1.2.1. Bitkilerden DNA izolasyonu:

Saghai-Marooof (1984) yöntemine göre liyofiliz edilmiş veya sıvı azotta dondurulmuş ve toz haline getirilmiş numunelerden (300 -400 mg) CTAB (cetyl trimethylamonium bromide) nükleik asit ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakt edilir.

300-400 mg sıvı nitrojende toz haline getirilmiş numunelerde 65 derecede 9.0 ml CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisi eklenir. Çözelti 15 ml polietilen sentrifüj tüplere alınır ve bir iki kere karıştırılır. Daha sonra, 65 derecelik su banyosunda 60-90 dakika çok yavaş sallanarak inkübe edilir. Tüpler su banyosundan çıkartılır 4-5 dakika beklenir ve 4.5 ml kloroform/ oktanol eklenir ve 5-10 dakika sallanır. Tüpler 10' süre ile 1300-1500xg'de oda sıcaklığında maksimum hızla spin edilir. Oluşan supernatant yeni 15 ml'lik sentrifüj tüplerine alınır, 4.5 ml kloroform/ oktanol eklenir, 5-10 ' çalkalanır. 10 dakika oda sıcaklığında 1300-1500 g'de spin edilir. Supernatant 15 ml'lik yeni tüplere aktarılır. (Daha önceden kaynatılmış) 50 µl 100 mg/ml RNAase A eklenir nazik bir şekilde çevirerek karıştırılır ve 30' oda sıcaklığında muafaza edilir. Daha sonra 6.0 ml iso- propanol ( 2-propanol ) eklenir ve çevirerek ( nazik bir şekilde ) karıştırılır. Bu işlemin sonunda çöktürülmüş olan DNA cam çubuk etrafına dolanarak toplanır. Supernatant uzaklaştırılır. Çökelti suda çözülür. Önce fenol ile ( 1 ml ) sonra kloroform ile ekstrakt edilir. 5.0ml 76% EtOH, 0.2M NaOAc eklenir -20 derecede beklenir. Daha sonra 25 dakika 10000 g'de sentrifüj edilir, supetrnatant uzaklaştırılır, 3.0ml 76%EtOH 10mM NH<sub>4</sub>OAC eklenir. Çökelti bir arada ise solüsyon kısmı dökülür ve kurutulur. ( vakum dry ), değilse 1000 g'de 25' sentrifüj edilir. Aynı çökelti 250 µl TE de çözülür. DNA ependorf tüplere konur, -20 derecede muafaza edilir. Numuneler 6 ay süre ile kullanılabilir.

### 5.1.2.2. DNA derişiminin tesbiti :

15µl DNA numunesi 735 µl TE solusyonuna eklenir absorbans değerleri 260 ve 280 nm de okunarak DNA'nın saflık derecesi tesbit edilir.

$$\text{DNA}_{\mu\text{g}/\mu\text{l}} = \frac{\text{OD}_{260} \times 50 (\text{ sulandırma Faktörü } ) \times 50 \mu\text{g}/\text{ml}}{1000}$$

Gerekirse DNA tekrar çökertme ve EtOH ile yıkama işlemleri ile protein kısımlarından kurtulur.

### 5.1.2.3. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu

Kompetan hücreler iki farklı yöntem uygulanarak hazırlanmıştır. Bu yöntemler aşağıda verilmektedir.

#### 5.1.2.3.1. CaCl<sub>2</sub> Yöntemi

Kompetan *E.Coli* hücreleri, DH5- $\alpha$  ve HB101 suşlarından aşağıdaki protokole göre hazırlanmış ve transform edilmiştir.

HB101 ve DH5 suşları 37 derecede bir gece büyütülürler. Büyüyen hücrelerden 5 ml kültür, 100 ml taze LB ortamına alınır ve A<sub>600</sub>=0.3 olana kadar büyütülür. Hücreler 2000g de 15 dak sentrifüj edilir. Oluşan pelet 40 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub> de çözülür. Tüpler 15-20 dakika buzda bekletilir ve aynı koşullarda sentrifüj edilir. Daha sonra, pelet, 2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub> de çözülür ve %10 gliserol derişimine getirilir. Hücreler 200  $\mu$ l bölümler halinde ependorf tüplere alınır. Sıvı nitrojende dondurulur ve -70 derecede kullanılıncaya kadar saklanır.

Bu şekilde hazırlanan kompetan hücreler aşağıda verilen transformasyon çalışmalarında kullanılmışlardır. Kompetan hücreler oda sıcaklığında çözüldükten sonra buzda 30 dakika bekletilirler. Hücrelerin üzerine 1-5 $\mu$ l (~25ng) plazmid DNA eklenir. Tüpler 1-1.5 dak 42 derecede tutulur. Daha sonra oda sıcaklığına getirilir ve 1 ml 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren LB eklenir. 1 saat 37derecede çalkalanır. 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren LB-agar petrilere alınır ve 37C<sup>o</sup> inkübe edilir.

#### 5.1.2.3.2. DMSO Yöntemi

Bu deneylerde Stratagene "SURE" suşları kullanılmıştır. Deneysel metod aşağıda verilmektedir. Gliserol stoktan alınan hücreler LB-agar petrilere çizilir ve 37derecede bir gece büyütülür. 10-12 tane 2-3 mm büyüklükteki koloni 250 ml SOB ortamına transfer edilir. Kültür A<sub>600</sub>=0.6 olana kadar 18 derecede büyütülür. 10 dak buzda bekleme



sonunda , 2500gde 10 dak, 4 derecede sentrifüj edilir. Pelet 80 ml soğuk TB tamponunda çözülür ve hücreler aynı şartlarda sentrifüj edilir. Pelet nazik bir şekilde 20 ml TB de çözülür ve %7 dimetil sülfoksit (DMSO) derişimine getirilir. Tüpler 10 dakika buzda bekletildikten sonra 1-2 ml lik bölümler halinde ependorf tüplere bölünür ve sıvı azotta dondurulur.

#### 5.1.2.4. Plasmid DNA izolasyonu

Seçici ortamda büyüyen kolonilerden alınan numuneler 250 ml seçici ortamda 37derecede sallanarak sabaha kadar büyütülür ve plasmid DNA izole edilir. Plasmid izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

2-3 ml bakteri LB ortamında büyütülür. Büyüyen hücreler 1 dak 8000 rpmde çevrilerek toplanır. 200 µl lysis tamponu eklenir. (50 mM gulukoz, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 4 mg/ml lizozim). Tüpler karıştırılır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra 400 µl taze hazırlanmış bazik solusyon eklenir (0.2 N NaOH, %1 SDS) ve 5 dakika buzda bekletilir. 5 dakika sonunda, 300 µl 7.5 M amonyom asetat çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 3 dakika 14000 rpm de çevrilir ve elde edilen supernatant yeni bir ependorf tüpe alınır. Alınan supernatantın 0.6 sı oranında soğuk izoprapanol eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir. 10 dak 14000 rpmde sentrifüj edilir. Oluşan pelet %70 lik etanol ile yıkanır ve vakum altında kurutulur. Elde edilen pelet 50-100 µl TE tamponunda çözülür. 1 µl RNAase solusyonu eklenir. (1 µg RNAase) ve 37 derecede 30 dakika bekletilir. 30 dakikanın sonunda 100 µl, 1:24 oranında kloroform :izoamilalkol çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 14000 rpm de 1 dakika çevrilir. Oluşan üst faz temiz bir ependorf tüpe alınır 0.3 M sonuç derişim olacak şekilde sodyum asetat ve 2.5 hacim etanol eklenir. Daha sonra tüpler -70 derecede 30 dakika bekletilir ve 15 dak 14000 rpmde çevrilir. Oluşan pelet %70 etanol ile yıkanır ve vakum altında kurutulur ve 0.1X TE tamponunda çözülür.

#### 5.1.2.5. Restirksiyon Enzim (RE) Hidrolizi

*Genomik DNA'nın* restriksiyon enzimleri ile hidrolizi : Amaca yönelik olarak farklı restriksiyon enzimleri kullanılır. ECoRI, ECoRV, PstI veya HindIII. Tam bir hidroliz işlemini için 6 unit enzim/µg DNA olacak şekilde 6-8 saat 37 C° veya 3 unit enzim/ug DNA 24 saat 37 C° bekletilmesi gerekmektedir. İşlemler için genomik DNA 10-200 ug/ml kullanılabilir.

#### 5.1.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Hidroliz edilmiş DNA parçacıkları 1/10 hacim 50% glycerol, 75 mM EDTA 0.2% SDS, 2.07% bromfenol blue ve 0.07 %xylene cyanol eklenir. Elektroforez için % 0.9 (w/v ) Agarose Type I (Sigma) kullanılır, jel kalınlığı 4-5 mm olup 1 V/cm olacak şekilde 16-24 saat elektroforez edilir. Elektroforezde tampon sistem olarak 0.1 M Tris/125mM sodium asetat/ 10mM EDTA (pH: 8.1) kullanılır. Tampon içine 10 mg/ml derişimli etidiyum bromid çözeltisinden 5 µl eklenir. Jeller UV ışık altında agrandizör sistemi kullanılarak karanlık odada görüntülenir.

#### 5.1.2.7. Inset izolasyonu

Inset DNA plazmite yerleştirildiği yerden uygun restriksiyon enzimi(leri) ile kesilir. Elektroforez işlemi ile ayıştırılır. Elektroforez sonunda U.V. ışık altında jel üzerinde inserte tekabül eden bant tesbit edilir ve neşter yardımıyla kesilerek çıkartılır. Kesilen jel elusyon aletine alınır ve inset DNA toplanır. Etanol çöktürme ile çöktürülür. Deneylerimizde Karuppiyah ve Kaufman'ın (1991) metoduna göre kendi imal ettiğimiz bir mini elektro elusyon sistemi kullanılmıştır.

Elektroelusyon aleti yoksa jel altından ve iki yanından kesilir ve kesilen yere NA45 kağıdı yeleştirilir. Elektroforez işlemi 3-5 dakika kadar devam edilir. Kağıt alınarak yıkama ve elusyon işlemlerinden sonra inset DNA -20 C'de soğutulmuş saf EtOH ile çöktürülür. Sentrifüj edilerek toplanan inset DNA 70% EtOH ile yıkanır vakum altında kurutulur. 10µl TE tamponunda çözülür ve saklanır.

#### 5.1.2.8. Probuñ İşaretlenmesi

İşaretleme esnasında Boehringer Mannheim Digogsigenin (DIG) kitleri kullanılmıştır. Problar "random prime labeling" metoduyla işaretlenmiştir. İşaretleme digogsigenin-11-dUTP kullanılarak yapılmıştır. Metodun detayları aşağıda verilmektedir.

10ng-3µg DNA 100 derecede 10 dakika tutularak denature edilir. Reaksiyon tüpüne 0.5-150 µg/ml DNA, 2 µl 10X hexonukleotid karışımı, 2 µl 10X dNTP işaretleme karışımı, 100 unit/ml klenow enzimi ve karışımı 20 µl ye getirecek ddH2O eklenir. Eppendorf tüpü 37 derecede 60' bekletildikten sonra, 2 µl 200 mM pH 8.0 EDTA eklenerek reaksiyon durdurulur. DNA 0.1 hacim 4M LiCl ve 2.5-3.0 hacim soğuk EtOH ile çökeltilir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra -70 derecede 30 dakika

bekletilir.13000xg de 15 dakika sentrifüj edilir (4 derece). Sentrifuj sonrasında oluşan supernatant uzaklaştırılır ve DNA iki sefer %70 EtOH ile yıkanır. Pelet kurutulduktan sonra 50 µl TE tamponunda çözülür. İşaretli prob lar -20 derecede saklanır. İşaretli prob lar hibridizasyonda kullanılır.

#### 5.1.2.9. DNA Parçacıklarını Naylon Membranlara Aktarılması (Southern Blot)

Çalışmalarda Amersham HighBond® naylon membranlar kullanılmıştır. Deneysel yöntem aşağıda verilmiştir.

Jel, elektroforez işleminden sonra, 30 dakika 0.2N NaOH 0.6M NaCl içerisinde denature edilir ve 30' 0.5 M Tris pH7.5, 1.5 M NaCl içerisinde nötreleze edilir. Jeller 25 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 6.5) tamponu ile ıslatılmış sünger üzerinde 2 tabaka Whatman 3MM kağıdı üstüne yüz kısmı üstte olacak şekilde yerleştirilir hava kabarcıklarının oluşmasından sakınılır. Jelin üzerine dH<sub>2</sub>O ile ıslatılmış ve transfer tamponuna sokulmuş naylon membran yerleştirilir., üzerine 2 parça ıslatılmış Whatman 3MM kağıdı yerleştirilir. 2 tabaka kağıt havlu ve üzerine ağırlık konur 6-18 saat sabaha kadar transfer işlemi için bırakılır. Bu işlemin sonunda membran alınır ve 2x SSC içinde 15 dakika süre ile çalkalayarak yıkanır. 15-30 dakika havada kurutulduktan sonra DNA parçalarının membrana fiksasyonu için 1 saat 80-95 derecede bekletilir. Sol alt köşesi işaretlenir 30-60 dakika daha 65 derecede 0.1 X SSC, 0.1 % SDS içerisinde sallanarak yıkanır. Son olarak havada kurutulur 4 derecede muhafaza edilir.

#### 5.1.2.10. Hibridizasyon Deneyleri

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış olan blotlar 10ml/100 cm<sup>3</sup> olacak şekilde blot solusyonunda 65 derecede sabaha kadar pre hybridize edilir. Fazla solusyon uzaklaştırılır en az 2.5 ml/100 cm<sup>2</sup> olacak şekilde hibridizasyon solusyonu ve uygun derişimdeki işaretlenmiş prob eklenir. 60 derecede sabaha kadar hybridize edilir. Blot sallanarak iki kere oda sıcaklığında aşağıda içerikleri verilen solusyonlarda yıkanır.

3x5' 2xSSC , 0.5 % SDS

1x5' 1xSSC , 0.1 % SDS,

2x30' 0.1xSSC, 0.1 %SDS

Blot bu muamelelerden sonra görüntüleme işlemlerine tabi tutulur.

### 5.1.2.11. Blotun Görüntülenmesi

Hibridizasyonu takiben membranlar Anti-DIG-alkalin fosfotaz antikorları ile muamele edilir. NBT ve X-fosfat solusyonları kullanılarak kolorimetrik olarak görüntülenir. Görüntüleme metodlarının detayları "Boehringer Mannheim-The DIG System User's Guide" kitapçığında verilmektedir.

## 5.1.3. BULGULAR

### 5.1.3.1. Kompetant Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu

Proje kapsamında bir önceki bölümde detayları verilen iki farklı yöntem kullanılarak kompetant hücreler hazırlanmıştır. İlk denemelerde E.Coli DH5- $\alpha$  ve HB101 suşlarından CaCl<sub>2</sub> yöntemi ile kompetant hücreler hazırlanmıştır. Bu hücreler HS16.9, HS17.3 ve HS26.6 problemlerini taşıyan plasmidlerle transform edilmişlerdir. Transformasyon sonucunda elde edilen pozitif kolonilerde yapılan analizler, transformasyonun başarılı olmadığını göstermiştir. Bahsi geçen plasmidlerin çoğaltılabilmesi amacıyla, Stratagene "SURE" suşları kullanılarak DMSO metoduyla kompetant hücreler hazırlanmış ve transformasyon deneyleri tekrarlanmıştır. Bu denemeler sonucu elde edilen pozitif kolonilerde yapılan analizler HS17.3 probunu içeren plasmidi taşıyan bir hattın varlığını göstermiştir (Şekil 5.1.1). Fakat, elde olmayan nedenlerden dolayı, özellikle uzun süreli elektirik kesintileri nedeniyle, elde edilmiş bu hat kaybedilmiştir. Bunun üzerine, çalışmaları devam ettirebilmek amacıyla yeni problemlerin eldesi yoluna gidilmiştir. Bu girişimler sonucunda, Macar Bilimler Akademisi, Biyolojik Araştırma Merkezi, Bitki Biyolojisi Enstitüsü'nden Prof. Dr. Denes Dudits'in araştırma laboratuvarlarından klorofil a/b proteini bağlanma probu içeren "KM64" plasmidi elde edilmiştir.

### 5.1.3.2. RFLP Çalışmaları

#### 5.1.3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzim Sindirimi

Deneylerin bu bölümünde değişik buğday çeşitlerinden genomik DNA lar izole edilmiş ve restriksiyon enzimleri (RE) ile sindirilip agaroz jellerde ayrıştırılmışlardır. Deneylerden elde edilen örnek sonuçlar şekil 5.1.2 ve 5.1.3 de verilmektedir.

#### 5.1.3.2.2. İnsert İzolasyonu ve Prob Hazırlanması

Prob hazırlanması için KM64 plasmidi E.Coli HB101 suşlarından izole edilmiş, RE lerle sindirildikten sonra %1 lik agaroz jellerde ayrıştırılmış ve ayrıştırılan insert jellerden elde edilmiştir. Deneylerden elde edilen örnek bir sonuç Şekil 5.1.4 de gösterilmektedir.

#### 5.1.3.2.3. Southern Blot ve Hibridizasyon Çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde prob işaretlenmesi ve blotların hibridizasyon sonrası görüntülenmesinde Bohringer Mannheim Digoxigenin kitleri kullanılmıştır. Deneyler öncesi, probe işaretlenmesi, hibridizasyondaki derişiminin saptanması ve hibridizasyon sonrası görüntülemenin optimizasyonu amacıyla kit üzerinde deneme çalışmaları yapılmıştır. Yapılan muhtelif denemeler sonucunda uygulanacak teknikler için optimum şartlar saptanmıştır. Örnek bir sonuç Şekil 5.1.5 de verilmektedir.

Buğday çeşitlerinin genomlarındaki farklılığın gösterilebilmesi amacı ile Şekil 5.1.3 de gösterilen HindIII ve EcoRI sindirilmiş genomik DNAlar naylon membranlara aktarılmış, ve Şekil 5.1.4 de gösterilen jelden izole edilip işaretlenmiş klorofil a/b bağlanma probuyla hibridize edilip görüntülenmiştir. Deney sonucu Şekli 5.1.6 da verilmektedir. Şekilden de görüleceği gibi kullanılan bu proba anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

#### 5.1.4. TARTIŞMA

Proje planımızda sıcaklık şoku problemlerinin kullanımıyla değişik buğday çeşitlerindeki genetik farklılığın DNA parmak izi çalışmaları ile belirlenmesi amacıyla RFLP tekniğinin uygulanması öngörülmekteydi. Proje çalışmalarımızın bu bölümünde elde olmayan nedenlerden dolayı bazı aksaklıklarla karşılaşmıştır. Bu problemlerin nedenleri bir önceki bölümde detayları ile açıklanmıştır.

Deneylerimizde kullanılan klorofil a/b bağlanma probu, çeşitler arası genetik farklılığın gösterilmesi amacı ile yapılan hibridizasyon deneylerinde istenilen sonuçları vermemiştir. Bu noktada, proje süresi ve bütçesindeki yetersizliklerden dolayı, yeni

probların eldesine ve RFLP çalışmalarına devam edilmemiştir. Bunun yerine bahsi geçen buğday çeşitlerindeki genetik farklılığın gösterilebilmesi amacıyla gluten proteinlerine yönelik çalışmalara başlanmıştır.

Bu konudaki deneyler, öncelikle, eldeki mevcut kimyasal ve techizat imkanları ile yretebileceğimiz ve proje süresi içinde sonuç alabileceğimizi düşündüğümüz gliadin ve glutenin protein profillerinin saptanması yönünde başlatılmıştır. Yapılan ncl çalışmalar sonuçunda oldukça olumlu sonuçlar elde edilmiştir ve çeşitler arasında anlamlı olabilecek farklılıklar gözlenmiştir (şekil 5.1.7).

Protein seviyesinde gözlenebilen bu farklılığın DNA seviyesinde de gözlenip gzlenmiyeceğin belirlenebilmesi amacıyla, DNA parmak izi çalışmalarında RFLP tekniğine nazaran pratikliği ve özellikle de maliyeti açısından çok daha kullanışlı bir teknik olan RAPD tekniğine yönelinmiştir. Bu konudaki deneyler gluten proteinlerine özgün primler kullanılarak yürütülmektedir.

Çalışmalarımız, PCR optimizasyonu ve primer amplifikasyonu aşamasında olup, proje ekibinden Veli Cengiz zalp isimli öğrencimiz halen "Characterization of Heat Resistant Turkish Wheat Varieties at Genomic Level " isimli doktora çalışmasını sürdürmektedir.

Sonuç olarak, projemizin bu bölümünde yapılan çalışmalar esnasında, DNA parmak izi çalışmalarının yürütülmesi için zorunlu olan,

- Kompetant hücre hazırlanması
- E.Coli transformasyonu
- Küçük ve büyük ölçekli plasmid DNA izolasyonu
- Bitkilerden genomik DNA izolasyonu
- Restirksiyon enzim sindirimi
- DNA parçacıklarının agaroz jellerde ayrıştırılması, görüntülenmesi
- Ayrışan DNA parçalarının jellerden eldesi (insert isolation)
- Agaroz jellerdeki DNA parçacıklarının membranlara aktarılması (Southern Blotting)
- Radyoaktif olmayan yöntemlerle prob işaretlenmesi
- Hibridizasyon ve görüntülenmesi
- PCR tekniği

gibi birçok teknik laboratuvarlarımızda çalışır duruma getirilmiş ve halen değişik çalışmalarımızda rutin olarak kullanılmaktadır.

### 5.1.5 KAYNAKLAR

- Apuya, N.R., Frazier, B.L., Keim, P., Roth, E.J., Lark, K.G. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean *Glycine max. (L.) Merrill*. *Theor. Appl. Genet.* 75:889-901, (1988).
- Barone, A., Her, E.R., Schaechtel, V., Debener, T. Salamini, F., Gebhart, C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 224:177-182, (1990).
- Beavis, W.D., Grant, D., Albertsen, M., Fincher, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their association with qualitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.* 83:141-145, (1991).
- Boehringer Mannheim GmbH, Detection of DIG-Labelled Nucleic acids in *The DIG Systems User's Guide for Filter Hybridization*. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim, (1993), p:49-54.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., Tanksley, S.D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*. 120:1095-1103, (1988).
- Brummer, E.C., Bouton, J.H., Kochert, G. Development of an RFLP map in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 86:329-332, (1993).
- Burr, B. and F.A., Burr. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends in Genetics*. 7:55-60, (1991).
- Figdore, S.S., Kennard, W.C., Song, K.M., Stoucum, M.K., Osborn, T.C. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 75:833-840, (1988).
- Harberd, N.B., Bartels, D., Thomson, R.D. DNA restriction fragment variation in the gene family encoding high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *Biochem. Genet.* 24:579-595, (1986).
- Heun, M.A., Kennedy, E., Anderson, A., Lapitan, V., Sorells, M.E., Tanksley, S.D. Construction of restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. 34:437-447, (1991).
- Jung, C.M., Fisher, F., Hermann, R.G. Analysis of DNA from a Beta procumbens chromosome fragment in sugar beet carrying a gene for nematode resistance. *Theor. Appl. Genet.* 79:663-672, (1990).
- Karuppiyah, N., Kaufman, P. Rapid and inexpensive micro-electroelution of nucleic acid and protein from agarose and polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 9, 368, (1991).

Landry, B.S., Hubert, N., Etoh, T., Harada, J.J., Linkon, S.E. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa*L.) with restriction fragment length polymorphism detected with expressed DNA sequences. *Genome*. 121:185-199, (1991).

Lobler, M., Hiersch, A.M. RFLP mapping of the *abel* locus in maize (*Zea mays*). *Plant Mol. Biol.* 15:513-516, (1990).

Lander, E.S., Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 121:185-199, (1989).

McCouch, S.R., Kochert, G., Yu, Z., Wang, Z., Khush, G.S., Cauffman, W.R., Tanksley, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829, (1988).

McMullen, M.D., Louise, R. The linkage of molecular markers to a gene controlling the symptom response in maize dwarf mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2:309-314, (1989).

Osborn, T.C., Alexander, D.C., Fobes, J.F. Identification of restriction length polymorphisms linked to genes controlling soluble solutes content in tomato fruits. *Theor. Appl. Genet.* 73: 350-356, (1987).

Ottaviano, E., Sarigirola, M., Pe, F., Frova, C. Molecular markers (RFLP and HSPs) for the genetic dissection of thermotolerance in maize. *Theor. Appl. Genet.* 81:713-719, (1991).

Paterson, A.H., Landero, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, F., Tanksley, S.D. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction length polymorphisms. *Nature*. 335:1021-1027, (1988).

Reiter, R.S., Williams, G.K., Feldman, K.A., Raflaski, J.A., Tingey, S.V., Scolnik, P.A. Global and local genome mapping *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and RAPD. *Proc. Natl. Acad. Sc. (USA)*. 89:1477-1481, (1992).

Melehinger, A.H., Lee, M., Lamkey, K.R., Hallauer, A.R., Woodman, W.R. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sc. (USA)*. 88:9828-9832, (1990).

Shine, J.S., Corpus, L., Blake, T. A partial map of barley genome incorporating restriction fragment length polymorphism, polymerase chain reaction, isozyme and morphological marker loci. *Genome*. 33:803-810, (1990).

Smith, O.S., Smith, J.S.C., Bowen, S.L., Tenborg, R.A., Wall, S.J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, heterosis and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 80:833-840, (1990).



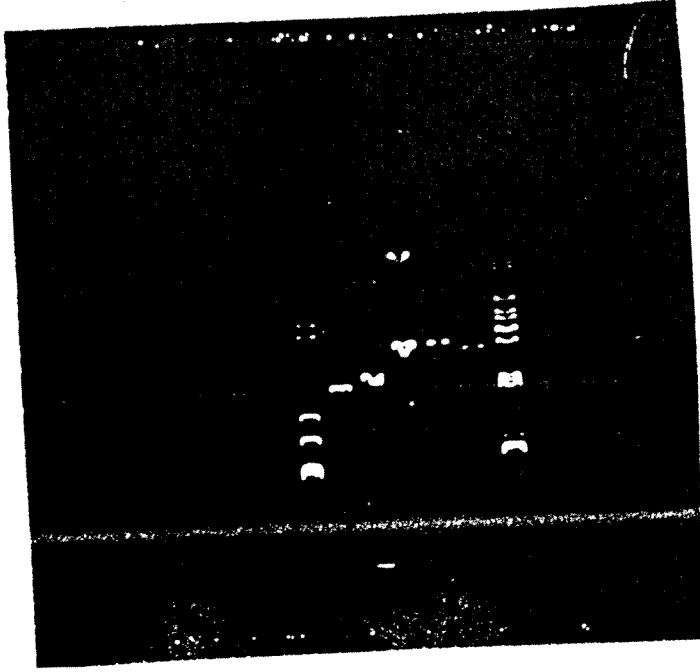
Stuber, C.W., Lincoln, S.E., Wolf, D.B., Helentjaris, T., Lander, E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*. 132:823-839, (1992).

Helentjaris, T. A genetic linkage map of maize based on RFLPs. *Trends in Genetics*. 3:217-221, (1987).

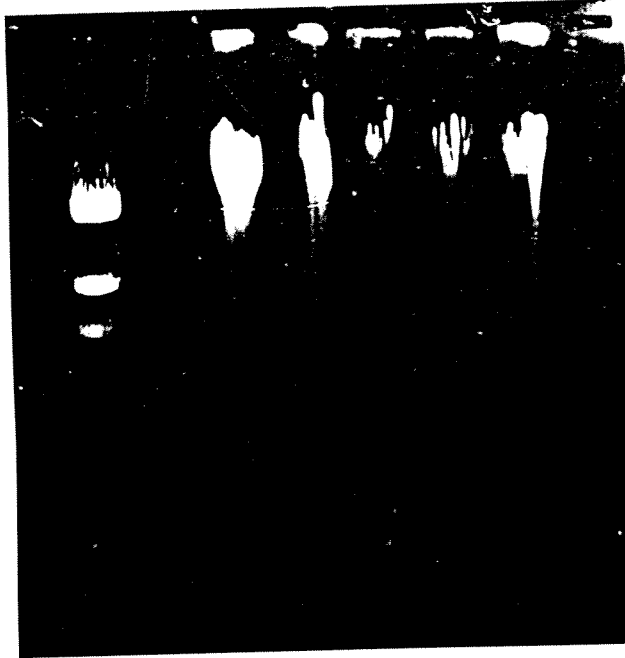
Tankslet, S.D., Hewitt, J. Use of molecular markers in breeding for soluble solutes content in tomato, a reexamination. *Theor. Appl. Genet.* 75:811-823, (1988).

Whitkus, R., Doebly, J., Lee, M. Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics*. 132:1119-1130, (1992).

### 5.1.6. ŞEKİLLER

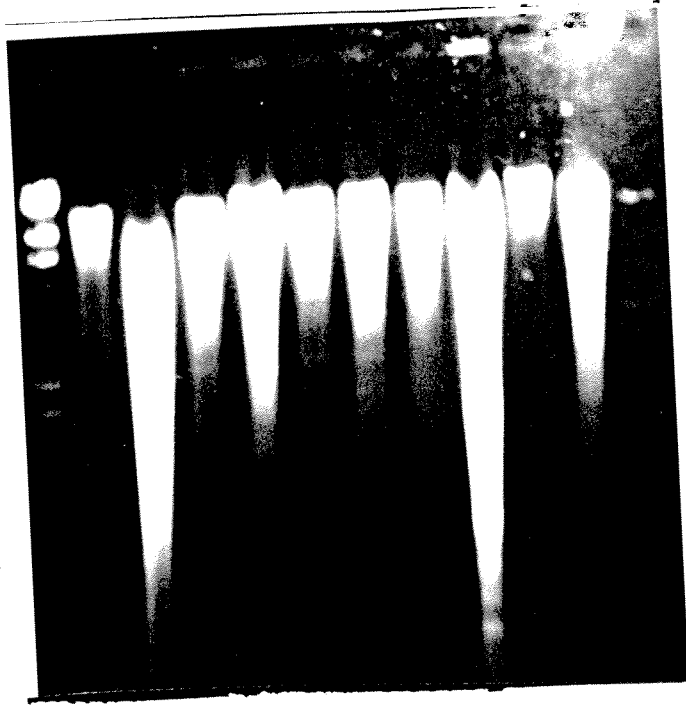


Şekil 5.1.1. pHS17.3 plasmidinin EcoRI RE muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel profili.



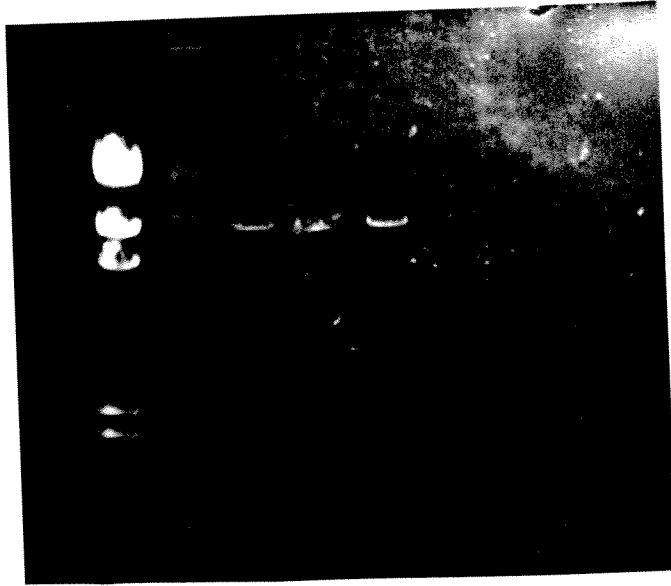
Şekil 5.1.2. Bitki genomik DNA'larının RE sindirimi öncesi agaroz jel profilleri.

Kolonlar soldan sağa: HindIII ile sindirilmiş  $\lambda$  DNA markörü, Bezostaja, Bolal, Gerek, Tosun buğday çeşitleri ve Xanthi tütün çeşidinden izole edilen genomik DNA'lar % 0.8'lik agaroz jellerde ayrıştırılmış ve UV ışık altında görüntülenmişlerdir.



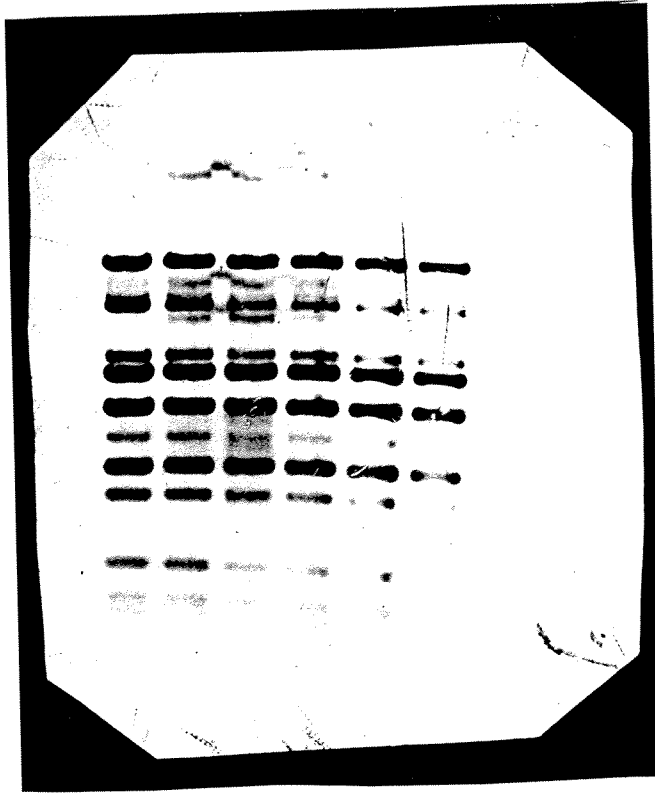
Şekil 5.1.3. RE'lerle muamele edilmiş bitki genomik DNA'ları.

Şekil 5.1.2. de gösterilen genomik DNAlar EcoRI ve HindIII RE'leri ile sindirildikten sonra %0.8lik agaroz jellerde ayrıştırılmış ve görüntülenmiştir. Soldan sağa kolon sıralaması Şekil 5.1.1' verildiği gibidir. Markör sonrası ilk beş kolon EcoRI, sonraki beş kolon HindII ile sindirilmiş numuneler, son kolon ise HindII ile sindirilmiş KM64 plasmidini göstermektedir.



Şekil 5.1.4. KM64 plasmidinin HindIII ile sindirimi sonrası agaroz jel elektroforez profili.

İzole edilen KM64 plasmidi HindIII ile sindirilmiş ve %0.8 agaroz jellerde ayrıştırıldıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. Kolon sıralaması soldan sağa doğru: HindIII ile sindirilmiş  $\lambda$  DNA markörü, sindirilmemiş KM64, HindIII ile sindirilmiş plasmidler.



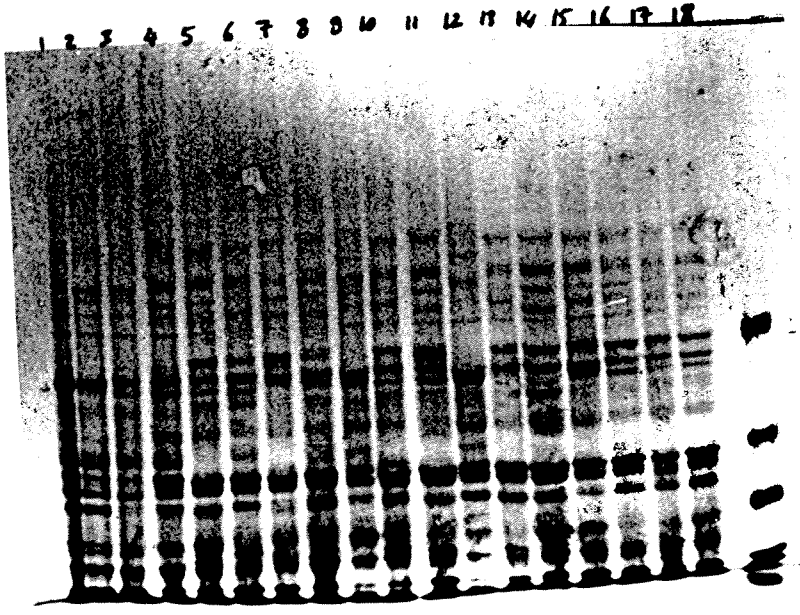
Şekil 5.1.5. Digoxigenin kitleri kullanılarak elde edilen optimizasyon amaçlı Southern Blot sonucu.

Kit muhteviyatında bulunan RE lerle sindirilmiş DNA parçacıkları %0.8 agaroz jellerde ayrıştırıldıktan sonra Amersham Highbond® naylon membranlara aktarılmıştır. Membran hazır problarla hibridize edildikten sonra NBT-X fosfat ile görüntülenmiş ve fotoğrafı alınmıştır.



Şekil 5.1.6. Klorofil a/b bağlanma probuyla yapılan hibridizasyon deneyi sonucu.

HindIII ve ECoRI ile sindirilmiş buğday ve tütün genomik DNAları, Digoxigenin işaretli klorofil a/b bağlanma probuyla hibridize edilmiş NBT-X fosfat ile görüntülenmiş ve fotoğrafı alınmıştır. Sıralama sağdan sola Şekil 5.1.3 de verilenin aynıdır.



Şekil 5.1.7. Değişik buğday çeşitlerinin total tohum proteinlerinin SDS-PAGE profilleri.

Tohum total proteinleri izole edilip %10'luk poliakrilamid jellerde ayrıştırılmıştır. Jeldeki proteinler gümüş boyama tekniği ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çemiştir. Kolon numaralarına göre kullanılan çeşitler: 1.Dicle74, 2.Ciyarbakır, 3.Kunduru, 4.Sarı Bursa, 5.Kıraç66, 6.Porsuk, 7.Ak702, 8.Yektay406, 9.Kızıltan91, 11.Sertak, 12.Çakmak, 13.Bezostaja, 14.Yayla, 15.Tosun, 16.Bolal, 17.Atay85, 18.Gerek. En sağ kolon moleküler ağırlık markörlerini göstermektedir.

## 5.2. TÜTÜN BİTKİSİNDE AGROBAKTERİ KULLANILARAK GEN TRANSFERİ:

### 5.2.1. GİRİŞ :

Günümüzde oldukça popüler olan ve uzun süren çalışmalardan sonra çeşitli uygulama olanakları sağlayan Biyoteknolojik araştırmalar son on yıl içerisinde bitkiler üstünde de yoğunlaşmaya başlamıştır. Tarımsal Biyoteknoloji yada Bitki Biyoteknolojisi olarak da adlandırılabilir bu çalışmalar çeşitli yönleri ile devam etmektedir. Bu araştırma alanlarından biri de bitkilerde gen transferidir.

Gen transferinin başlıca amacı, aktarılan gen sayesinde, bitkide doğal olarak bulunmayan yeni bir özelliğin kazandırılmasıdır. Günümüzde, gen transferi teknolojisindeki gelişmeler sayesinde; zararlı böceklere (Perlak ve arkadaşları 1990, Brunke ve Meusen 1991), hastalıklara (Bachy ve arkadaşları 1990, Hain ve arkadaşları 1993) ve herbisitler gibi- zararlıların imhasında kullanılan kimyasal tarım ilaçlarına resistant (Vasil ve arkadaşları, 1992) transgenik bitkiler elde edilmiş ve arazi uygulamalarında çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aktarılan genin niteliği sayesinde, yukarıda bahsi geçen özelliklerin yanısıra; değişik stres koşullarına dayanıklı (Tarczynski ve arkadaşları, 1993), daha üstün besin değeri taşıyabilen (Penarrubia ve arkadaşları 1992) ve olgunlaşmanın kontrol altına alınmasıyla istendiğinde markete sürülebilecek bitkiler (Bird ve arkadaşları 1991) elde edilebilmektedir. Bu yöndeki çalışmaların da literatürde sayısız örnekleri bulunmaktadır. Bunların dışında, aktarılan genler sayesinde, farmakolojik özellikleri olan enkefalinler (Vandekerckhove ve arkadaşları 1989) ve insan serum albumini gibi moleküller de, bitkilerde üretilmektedir (Sijomns ve arkadaşları 1990).

Raporun bu bölümü, projemizde öngörülen, bitkilerde gen transferi konusunda yürütülen çalışmaları sunmaktadır. Çalışmalarda *Agrobacterium* a dayalı DNA transferi tekniği kullanılmıştır. Bu bağlamda, binary vektör stratejisi kullanılarak, pBI121 binary vektörünün üstünde bulunan ve neomisin fosfotransferaz-II (npt-II) ve GUS enzimlerinin sentezlerinden sorumlu DNA sekansları tütün bitkilerine aktarılmış ve transgenik bitkilerin rejenerasyonları gerçekleştirilmiştir.

Projemizin bu bölümündeki yapılan çalışmalar aşağıda maddeler halinde verilmektedir.

i. *Agrobacterium tumefaciens* suşlarının kullanımıyla kanamisin antibiyotiğine direnç sağlayan neomisin fosfotransferaz-II (npt-II) ve bakteri orijinli  $\beta$ -gulukoronidaz enziminin sentezinden sorumlu genler tütün bitkisine aktarılmıştır.

ii. Gen transferi yaprak diski transformasyonu metoduyla gerçekleştirilmiştir.

iii. Transform edilen yaprak diskleri kanamisin içeren seçici ortamlarda geliştirilmiş, kök oluşumlarını takiben toprağa alınmışlar ve gelişimleri takip edilmiştir.

iv. Elde edilen transgenik bitkilerde (Fo) aktarılan genlerin ifadesi analiz edilmiştir.

v. Transgenik bitkilerden elde edilen tohumlarda ve bunlardan geliştirilen F1 generasyon transgenik bitkilerde aktarılan genlerin aktiviteleri tayin edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda izlenen deneysel yöntemler aşağıda verilmektedir.

## 5.2.2. MATERYAL VE YÖNTEMLER :

### 5.2.2.1. Bitkilerin ve *Agrobacterium* Suşlarının Büyütülmesi

Samsun ve Xanthi tütün varyeteleri iklim dolabında 24 derece , %70 nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta büyütülmüşlerdir. Bu büyüme koşulları deneylerin diğer aşamalarında da kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşları Texas Tech Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Dr. Randy Allen'in laboratuvarlarından sağlanmıştır. Bakteriler 12-24 saat süre ile 28-30 derecede, AB minimal ortamlarında Chilton ve arkadaşları (1979) büyütülmüşlerdir.

### 5.2.2.2. Yaprak Diski Transformasyonu

Bu metod ilk olarak Horch ve arkadaşları (1985) tarafından uygulanmıştır. Çalışmalarımızda bu metod bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır.

20-30 günlük tütün yaprakları %0.75 (V/V) hipoklorit solusyonunda yüzeysel sterilizasyona tabi tutulduktan sonra üç kez steril distile su ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra tüm deneyler steril ortamda yürütülmüştür. Kullanılan tüm malzeme ve solusyonlar otoklavlanarak steril edilmiştir.

Steril yaprak diskleri 1-2 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde kesilir ve daha önceden büyütülen ve içlerinde pBI121 binary vektörlerinin de bulunduğu *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarıyla beş dakika sıvı MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında muamele edilir. Diskler MSA ( MS ortamı, B5 vitaminleri (Gambor ve arkadaşları 1968), %3 (W/V) sukroz, 10 µg/ml naftalin asetik asit, 1 mg/ml benzil adenin, %0.8 agar) ortamlarına transfer edilir.

Çalışmalarda kullanılan pBI121 plasmidi üstünde "border sekanslar" aramada bulunan ve *Agrobacterium* a dayalı gen transferi tekniğinde bitki genomuna integre olan DNA kaseti Şekil 5.2.1 de şematik olarak verilmektedir.

#### 5.2.2.3. Regeneasyon ve Transjenik Bitkilerin Seçimi

Yaprak diskleri üç gün süre ile MSA ortamlarında beklertildikten sonra MSB seçici ortamlarına (MSA, 250 µg/ml kanamisin, 100 µg/ml cefotaxime) alınır ve kallus oluşumları takip edilir. Bu ortamlarda kallus ve gövde oluşturan bitkiler kök oluşumları için MSC ortamlarına (hormon içermeyen MSB ortamı) alınırlar. Oluşan kökler 1-3 cm uzunluğa ulaştığında bitkiler toprağa alınır ve iklim dolabında büyütülür. *Agrobacterium* muamelesi dışında aynı koşullara tabi tutulan yaprak diskleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Aktarılan npt-II enziminin aktivitesi rejenere eden transjenik bitkilerin lethal dozda (250 µg/ml) kanamisin içeren büyüme ortamlarında kallus oluşturabilme potansiyelleri ölçülerek saptanmıştır. Bu amaçla, transjenik ve/veya kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri %0.75 sodyum hipoklorit solusyonunda steril edildikten sonra, MSB ortamlarına ( MS tuzları, B5 vitaminleri, %3 (W/V) sukroz, 10 µg/ml naftalin asetik asit, 1 mg/ml benzil adenin, %0.8 agar) alınmışlar ve kallus oluşumları gözlenmiştir.

#### 5.2.2.4. GUS Analizleri :

Transjenik bitkilerde GUS enziminin aktivitesi hem spektrofotometrik hem de histokimyasal yöntemlerle analiz edilmişlerdir. Deneylerde, aşağıda verilen Jeferson'un metodları kullanılmıştır (Jefferson 1987).



#### 5.2.2.4.1. Spektrofotometrik Analizler

Olgunlaşmış transgenik bitkilerin yaprak örnekleri tampon A (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0), 10 mM beta-merkaptöetanol, 10 mM EDTA, %0.1 SDS %0.1, Triton X-100 ) içinde seramik havanlar yada homogenizatörler kullanılarak homojenize edilir. Spektrofotometrik metod da substrat olarak p-nitrofenil beta-D-glukoronit kullanılır ve homojenatlardaki GUS aktivitesi 415 nm'de izlenir.

#### 5.2.2.4.2. Histokimyasal Analizler

Histokimyasal metod da ise, 5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronit (X-gluc) substrat olarak kullanılmaktadır. Bu substrat, enzimin bulunduğu bölgede mavi bir çökelti oluşturmakta, böylece transfer edilen genin bitki üzerindeki lokasyonu da kolaylıkla saptanabilmektedir. Boyama işlemi , dokuların 1 mM X-gluc içeren 50 mM NaPO<sub>4</sub> tamponunun içinde bekletilmesiyle gerçekleştirilir. Reaksiyon oluşumunu takiben, örnekler 4 saat süre ile %2 glutraldehid içeren 50 mM NaPO<sub>4</sub> çözeltisinde fikse edilmiştir.

### 5.2.3.BULGULAR

Normal şartlarda yaprak diskleri MSA ortamında kallus oluşumunu takiben gövde oluşturabilirler (Şekil 5.2.2). Aynı bitki orijinli yaprak diskleri ise, kanamisin içeren MSB seçici ortamlarında gelişme göstermemektedirler (Şekil 5.2.3). Bu sonuç öncelikle MSB ortamlarında kullanılan kanamisin derişiminin letal dozda olduğunu ve bu ortamda gelişebilen bitkilerin transgenik olacağını göstermektedir.

Şekil 5.2.4 de gösterildiği gibi *Agrobacterium* ile muamele edilen yaprak diskleri MSB ortamlarında gelişim göstermektedirler. Bu sonuç ise kanamisne direnç sağlayan npt-II geninin transferinde başarılı olduğunu göstermektedir. Gelişim gösteren gövdeler MSC ortamında kök oluşturabilmektedir (Şekil 5.2.5). Köklenen transgenik bitkiler toprağa alındıklarında normal gelişimlerini sürdürmektedirler (Şekil 5.2.6) ve tam olgunluğa ulaşmışlardır (Şekil 5.2.7).

Şekil 5.2.8 de gösterildiği gibi transjenik bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri MSB ortamında gelişebilirken kontrol bitkilerde herhangi bir gelişme gözlenmemektedir. Bu sonuç aktarılan npt-II enziminin transjenik bitkilerde çalıştığını göstermektedir.

Şekil 5.2.9 da kontrol ve transjenik bitkilerin spektrofotometrik olarak saptanan GUS aktiviteleri verilmektedir. Kontrol ile mukayese edildiğinde transjenik bitkilerde yüksek oranda GUS aktivitesi saptanmıştır. Histokimyasal olarak saptanan GUS aktivitesinde de benzeri

sonuçlar gözlenmektedir (Şekil 5.2.10). Transjenik bitkilerde aktivite gözlenirken kontrol bitkilerde herhangi bir GUS aktivitesi söz konusu değildir.

Bu bölüme kadar sunulan bulgular npt-II ve GUS enziminin sentezinden sorumlu genlerin, tütün bitkilerine aktarıldığını ve rejenere eden transjenik bitkilerde fonksiyonel olarak çalıştığını göstermektedir.

Son olarak, transgenik bitkilerden elde edilen tohumlar üstünde yapılan çalışmalar aktarılan her iki genin F1 generasyonu bitkilerde de çalıştığını göstermektedir. Şekil 5.2.11, transgenik bitkilerden elde edilen tohumların kontrol tohumlarla mukayeseli olarak, MSB seçici ortamlarındaki gelişmelerini göstermektedir. Şekilden de açıkca görülebileceği gibi, transgenik tohumlar MSB ortamlarında rahatlıkla gelişmelerini sürdürebilmektedir. Kontroller de ise aynı ortamda herhangi bir gelişme söz konusu değildir.

Yukarıda gösterilen F1 generasyon transgenik bitkiler üzerinde yapılan spektrofotometrik ve histokimyasal GUS analizlerinden elde edilen sonuçlar da, aktarılan ve GUS enziminin sentezinden sorumlu genin de bu bitkilerde çalıştığını göstermektedir. (Şekil 5.2.11 ve Şekil 5.2.12)

#### 5.2.4. TARTIŞMA

Günümüzde değişik gen transferi tekniklerinin uygulanmasıyla bitkilere gen transferi oldukça rutin bir çalışma haline gelmiŐtir. Halen, içlerinde tütün, patates, soya fasulyesi, pamuk, mısır, buğday, pirinç gibi tarımsal açıdan büyük öneme sahip tarımsal bitki türlerinin de bulunduğu yaklaşık elli değişik bitki türünde transgenik bitkiler elde edilmiş durumdadır (Farley 1992)). Geçtiğimiz 10 sene sürecinde, bitkilerdeki gen transferi çalışmaları dünya çapında çok yaygın olarak uygulanmasına rağmen, ülkemizde bu tip çalışmalar henüz başlangıç aŐamasındadır.

Değişik tür bitkilerde gen transferini gerçekleŐtirmek için çok değişik teknikler geliştirilmiştir (Potrykus 1991, Lindsey 1992). Her tekniğin kendine has artıları ve eksileri bulunmaktadır. Kullanılan bu teknikler içinde sadece bazıları birçok bitki türünde baŐarıyla uygulanabilmiŐtir. Bu teknikler ve kısa açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i. Direkt Gen Transferi : Çıplak DNA moleküllerinin protoplastlara polietilen glikol (PGA) veya elektroporasyon yoluyla aktarılması.

ii. Mikro Aşılama : Çıplak DNA moleküllerinin protoplastlara veya doku hücrelerine mekanik olarak aktarılması.

iii. Biolistik : DNA' nın hücrelere veya bitki dokularına, DNA ile kaplanmış partüküllerle bombardıman edilmesi yoluyla aktarılması.

iv. Agrobakteri Kullanımı : DNA' nın bitki hücrelerine veya protoplastlara bir toprak bakterisi olan Agrobakteri'nin doğal gen transfer kapasitesini kullanarak aktarılması.

Gen transferinde hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, transgenik bitki eldesindeki en önemli gereksinim, tam bir bitkinin regenerasyonu için gerekli metodun bulunabilmesidir. Monokot bitkilerde protoplastlardan veya dokulardan regenerasyon oldukça zor bir işlem olduğundan, yukarıda bahsedilen konu büyük bir problem olmaktadır. Buna rağmen, geliştirilen regenerasyon metodları sayesinde mısır, pirinç ve buğday gibi tarımsal önemi büyük olan monokotlarda dahi transgenik bitkiler elde edilebilmiştir. Dikotlarda ise sağlıklı ve tam bitkilerin regenerasyonları kolaylıkla sağlanabilmektedir.

Bir bütün olarak ele alındığında bitkilerde gen transferi çalışmaları üç bölüm altında özetlenebilmektedir.

- Aktarılması istenen genin klonlanması ve uygun transformasyon vektörlerinin hazırlanması
- Gen transferi
- Transgenik bitkilerin rejenerasyonu ve analizleri

Çalışmalarımızda hazır gen kasetleri kullanıldığından, çalışmalarımıza 2. ve 3. aşamalardan başlanılmıştır. Projemizin ilk kısmında amaçlanan gen transferi ve transgenik bitkilerin rejenerasyonları gerçekleştirilmiş, ikinci ve son bölümde ise elde edilen tranjenik bitkiler aktarılan genlerin aktivitesi ve bir sonraki generasyona aktarılıp aktarılmadığı açısından analiz edilmişlerdir.

Kullanılan gen transferi ve rejenerasyon metodları halen yaygın olarak kullanılmakta olup tütün bitkisinin yanı sıra pamuk, patatez, ayçiçeği, domatez, şeker pancarı gibi birçok bitki türünde de başarı ile uygulanmaktadır. Bu nedenle, çalışmalarımız yapılacak ufak modifikasyonlarla *Agrobacteriuma* duyarlı diğer bitki türlerine de uygulanabilecek niteliktedir.

Sonuç olarak projenin bu bölümünde yapılan çalışmalar ile Tütün bitkilerinin transformasyonu sağlanmıştır. Bahsi geçen teknikler halen rutin olarak uygulanabilmekte ve

tütün bitkilerinde %90 a varan verimle transformasyon yapılabilir. Çalışmalarımız halen BASTA® herbisitine dirençli transgenik tütün ve domates bitkilerinin eldesi yönünde devam etmektedir. Başlı geçen konularda iki yüksek lisans öğrencisi tez çalışmalarını sürdürmektedirler.

### 5.2.5. KAYNAKLAR

- Beachy, R.N., Loesch-Fries, S., Tümer, N.E., Coat protein mediated resistance against virus infection, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28, 451-474, (1990).
- Bird, C., Ray, J.A., Fletcher, J.D., Boniwell, J.M., Bird, A.S., Teulierees, C., Blain, I., Barmley, P.M. and Schuch W., Using antisense RNA to study gene function : Inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *Bio/Technology*, 9, 635-639, (1991).
- Brunke, K.J., Meusen, R.L., Insect control with genetically engineered crops, *TIBTECH*, 9, 197-200, (1991).
- Chilton, M.D., Currier, T., Farrand, S., Bendich, A., Gordon, M. and Nester, E. *Agrobacterium* DNA and PS9 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3671-3676, (1979).
- Farley, R., Sustaining the food supply, *Bio/Technology*, 10, 40-43, (1992).
- Gambor, O., Miller, R. and Ojima, K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50, 151-159, (1968).
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese W., Schmelzer, D., Schreier, P.H., Stöcker, R.H. and Stenzel, K. Disease resistant results from foreign phytoalexin expression in a novel plant, *Nature*, 361, 153-156, (1993).
- Horch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T., A simple and general method for transferring genes into plants, *Science*, 227, 1229-1231, (1985).
- Jefferson, J.A., Assaying chimeric genes in plants : The GUS gene fusion system, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 5, 387-407, (1987).
- Lindsey, K., Genetic manipulation of crop plants, *J. Biotechnology*, 26, 1-28, (1992).
- Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15, 473-497, (1962).
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. and Fischhoff, D.A., Insect resistant cotton plants, *Bio/Technology*, 8, 939-943, (1990).
- Penarrubia, L., Kim, R., Giovannoni, J., Kim, S-H, and Fisher, R.L. Production of sweet protein monellin in transgenic plants, *Bio/Technology*, 10, 561-564, (1992).
- Potrykus, I., Gene transfer to plants : Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 205-225, (1991).

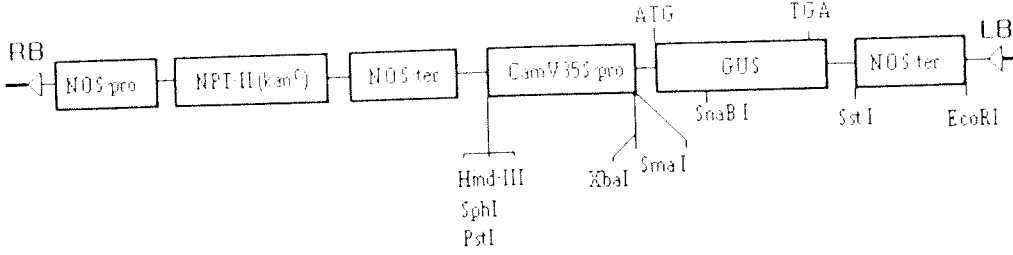
Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Veroerd, T.C., van den Elzen, P.J.M. and Hoekema, A., Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants, *Bio/Technology*, 8, 217-221, (1990).

Tarczynski Mitchell, C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J., Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol, *Science*, 259, 508-510, (1993).

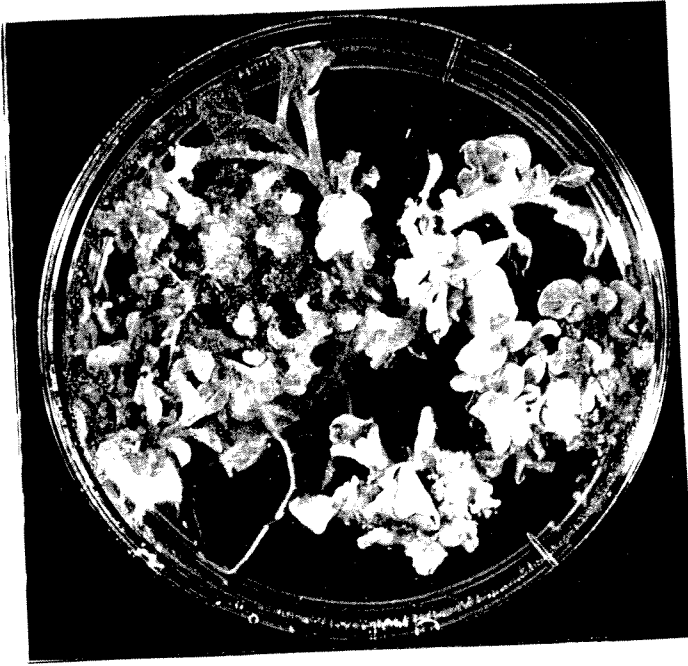
Vandekerckhove, J., Dekker, M., Verwoerd, T.C. and Hoekema, A., Enkephalines produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins, *Bio/Technology*, 7, 929-936, (1989).

Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E., Vasil, I.K., Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of Sregenerable embryonic callus, *Bio/Technology*, 10, 667-674, (1992).

## 5.2.6. ŞEKİLLER



Şekil 5.2.1. pBI121 binary vektörünün border sekansları arasındaki DNA dizileri.



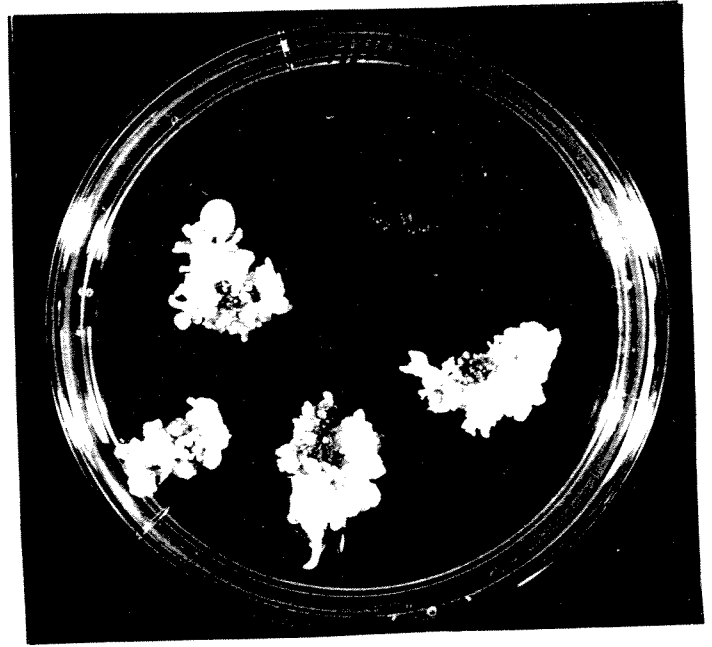
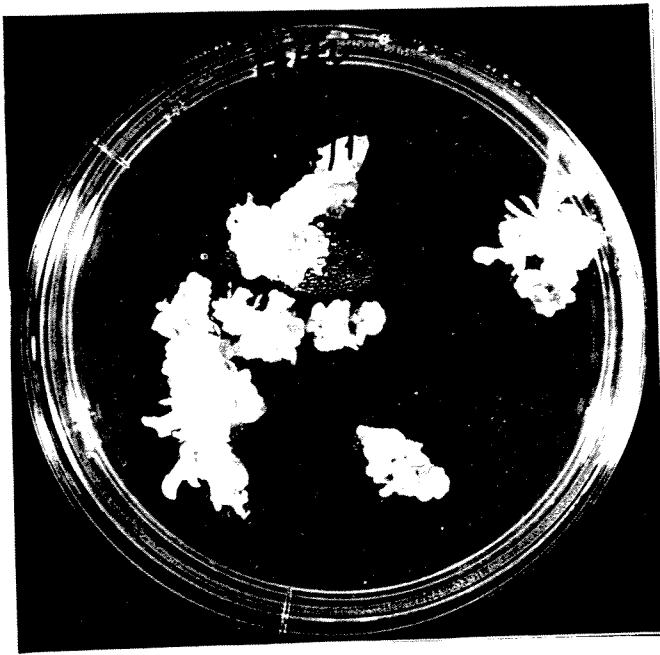
Şekil 5.2.2. Kontrol bitkilerinde kallus ve gövde oluşumu.

Steril yaprak diskleri MSA ortamında normal büyüme şartlarında tutulduklarında gelişmelerini gerçekleştirmektedirler. Fotoğraf 8 haftalık gelişimi göstermektedir.



Şekil 5.2.3. Kontrol bitkilerin MSB ortamlarındaki gelişmeleri.

Steril diskler 3 gün süre ile MSA ortamlarında tutulmuş ve MSB ortamlarına alınmıştır. 6 hafta sonucunda herhangi bir gelişme gözlenmemektedir.



Şekil 5.2.4. Gen aktarımı yapılmış yaprak disklerinin MSB ortamlarındaki gelişmeleri.

Şekil 5.2.2 de gösterilen yaprak disklerinin hazırlandığı bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarıyla muamele edilmişlerdir. 3 gün MSA ortamında tutulduktan sonra MSB ortamında büyümeleri gözlemlenmiştir. Fotoğraflar disklerin 6 haftalık gelişimlerini göstermektedirler. (a)Samsun, (b)Xanthi.



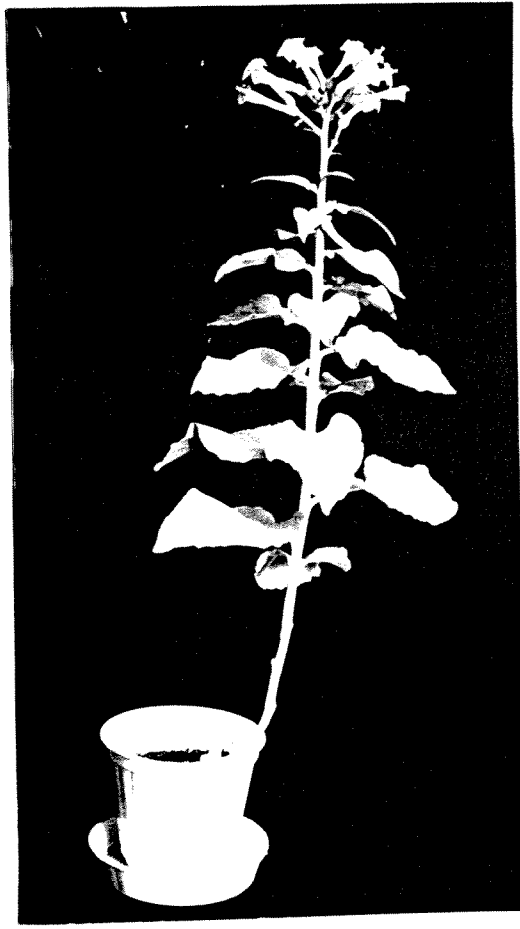


Şekil 5.2.5. Transgenik bitkilerin MSC ortamında kök oluşumları.

MSB ortamında gövde oluşumunu tamamlayan transgenik bitkiler MSC ortamına alınmış ve kök oluşumları izlenmiştir. Fotoğraflar 4 haftalık kök oluşumlarını göstermektedir.



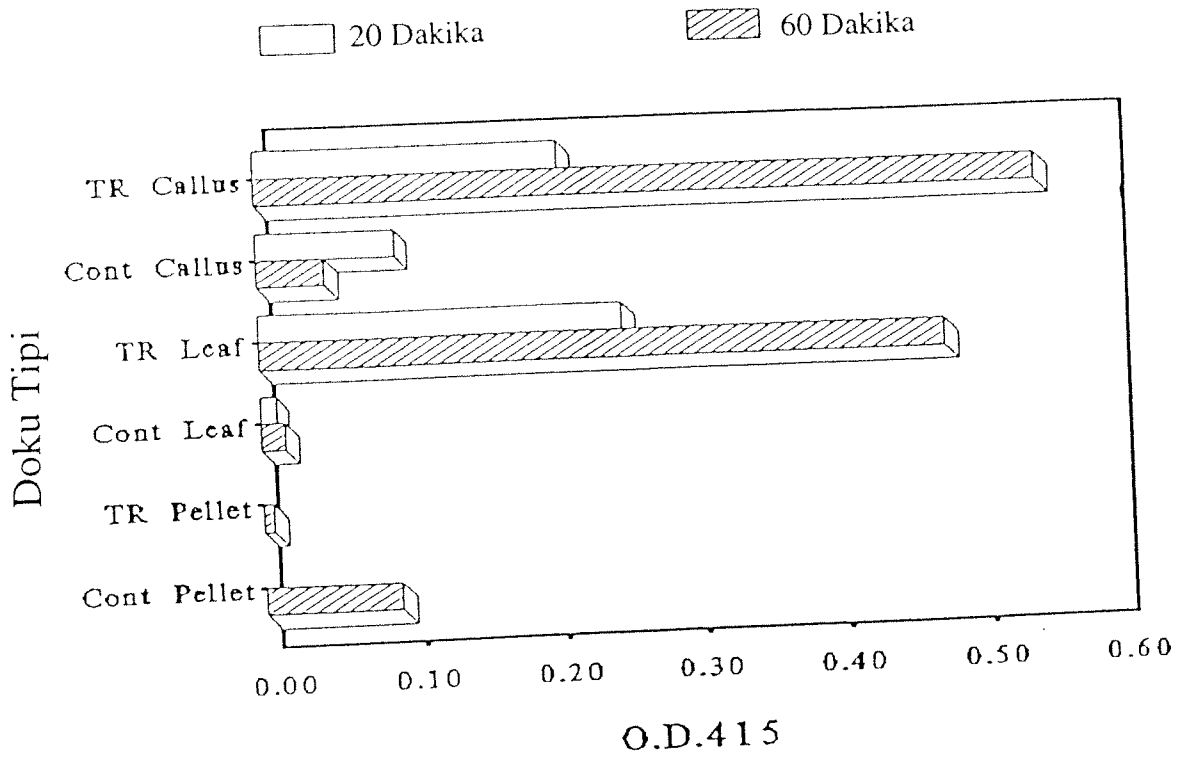
Şekil 5.2.6. Transgenik bitkilerin toprağa alındıktan sonraki gelişmeleri.



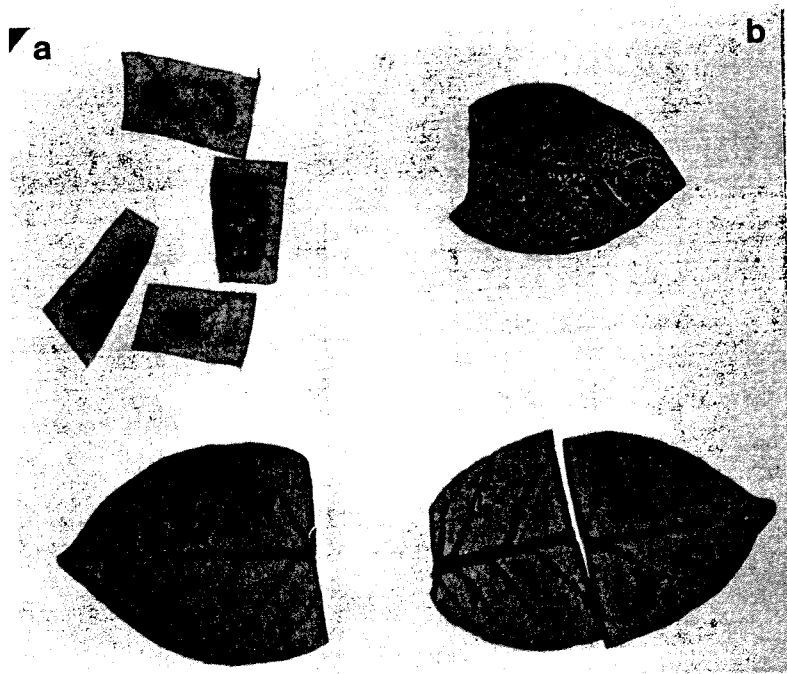
Şekil 5.2.7. Rejenerasyonunu tamamlamış transgenik Samsun çeşidi.



Şekil 5.2.8. Transgenik (A) ve kontrol (B) bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSB ortamlarındaki rejenerasyon potansiyelleri.



Şekil 5.2.9. Transjenik ve kontrol bitkilerin spektrofotometrik GUS aktivite analizleri.

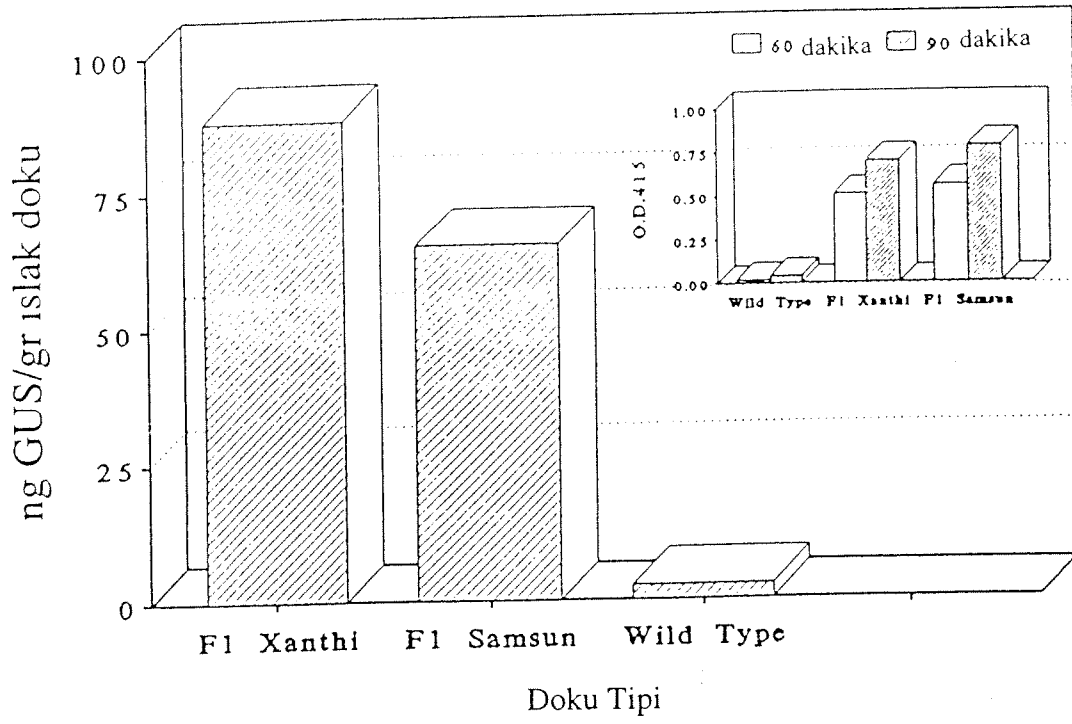


Şekil 5.2.10. Transjenik ve kontrol bitkilerin Histokimyasal GUS aktivite analizleri.

(C) Kontrol , (TR) Transjenik



Şekil 5.2.11. Transgenik bitkilerden ve kontrol bitkilerden elde edilen tohumların kanamisin içeren MSB ortamındaki bir aylık gelişmeleri



Şekil 5.2.12. Transjenik F1 generasyonu ve kontrol bitkilerin spektrofotometrik yöntemle saptanan GUS aktiviteleri.



Sekil 5.2.13. Transgenik F1 bitkilerinin histokimyasal olarak saptanan GUS aktiviteleri.

Fo transgenik bitkilerden elde edilen tohumlar MSB ortamında çimlendirilip metod kısmında detayları verilen histokimyasal GUS analizine tabi tutulmuşlardır.

## SONUÇLARIN UYGULANABİLİRLİLİĞİ

Tahıl bitkileri diğer bitkiler gibi değişen çevre koşullarından örneğin kuraklık, sıcaklık, yüksek ışık şiddeti yüksek sıcaklık, aşırı soğuk, yüksek tuz derişimi, aşırı metal kirliliği gibi abiyotik stres koşullarından veya patolojik enfeksiyonlar, böcek ve diğer organizmalardan etkilenmektedirler. Bu koşullar bitkilerin normal büyüme ve gelişmelerini etkilediği gibi ürünün veriminin, gıda değerinin ve kalitesinin düşmesine neden olmaktadır.

Bu çalışmadaki esas strateji Türkiye'nin ve Uzak Doğu ülkelerinin kurak ve yarı kurak tarım alanlarında üretimi optimize etmek ve tohum ıslah çalışmalarını hızlandırmaktır. Bugüne kadar tohum ıslah çalışmalarında uygulanan yöntem verimi yüksek çeşitleri yıllara ve yörelere göre takip ederek ve klasik melezleme yolu ile geliştirmektir. Ancak bu tip çalışmalar vakit almaktadır.

Son zamanlarda dünyada tohum ıslahı Agrobiyoteknolojik yöntemlerle hızlandırılmıştır. Gen mühendisliği çalışmaları son on yıl içerisinde özellikle ABD'de oldukça yaygınlaşmış olup içlerinde buğday, pirinç, mısır, soya fasülyesi, patates, domates, pamuk, şeker pancarı, ayçiçeği ve tütün gibi tarımsal ve ekonomik önemi büyük olan bitkilerden transgenik bitkiler elde edilmiştir. Ancak gen transferine yönelik çalışmalarda birçok zorluklar vardır. Çok farklı gen transfer yöntemleri olmasına karşın her teknik her bitki türünde uygulanamamaktadır. Gen transferi gerçekleşmiş olsa bile bitki regenerasyonunda ve aktarılan genin etkinliğinde problemlerle karşılaşmaktadır. Bitkilerdeki birçok problem birden fazla genle kontrol edildiğinden aktarılan genlerin probleme yönelik tespitinin yanısıra, metabolik yollardaki kontrol enzimlerinin tespiti gibi biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar da gerekmektedir.

Bu çalışmalar amaç kısmında da belirtildiği gibi sıcaklık soğukluk, kuraklık ve tuz stresinin moleküler mekanizmalarını anlamaya yöneliktir. Bu bölümle ilgili olarak aşağıda belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanılmıştır.

- Fotosistem aktivite ölçümleri
- İyon geçirgenlik testleri

- TTC mitokondri canlılık testi
- 1D ve 2D SDS-PAGE elektroforez yöntemi ve DNA parmakizi çıkartılması

Bunlara ek olarak proje kapsamında olmayan ancak laboratuvarlarımızda oturttuğumuz diğer yöntemler ve çalışmalar ise aşağıda özetlenmektedir.

- Jel elektroforez ve aktivite boyaması ile süperoksid dismutaz izoenzim aktivitelerinin organel seviyesinde tespiti
- Hücre içi haberleşme sistemlerindeki değişimlerin IP<sub>3</sub> reseptörleri seviyesinde incelenmesi
- Serbest yağ asitlerinin (total lipid) stres koşulları altında ve normal koşullarda kök ve yaprak dokularında tespiti
- Bitki büyüme regülatörlerinin abiyotik stresi önleyici etkilerinin araştırılması

Bu fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler laboratuvar koşullarında kısa sürede dayanıklı çeşitlerin tespitinde kullanıldığından pratik uygulaması olan yöntemlerdir. Stres altında sentezlenen proteinlerdeki farklılık da dayanıklı çeşitlerin tespiti açısından bilgi vermesinin yanısıra ileriki çalışmalara açısından antikör hazırlanması veya cDNA hazırlanması ile moleküler markör hazırlanmasında pratik uygulama getiren çalışmalardır.

Projenin ikinci amacı stres koşullarına dayanıklı tahıl bitkilerini gen mühendisliği yöntemleri ile geliştirmektir. Bu kısımla ilgili olarak öncül çalışmalar oturtuldu. Model olarak seçilen tütün bitkisinde Agrobacterium yolu ile gen transferi ve bitki doku kültürü çalışmaları rutin hale getirilmiştir. Domates bitkisinde doku kültürü ve regenerasyon çalışmaları tamamlanmış gen transferine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Halen bahsi geçen bitkilere herbisit direnci kazandırılması yönünde ayrı bir TÜBİTAK projesi çerçevesinde çalışmalarımız devam etmektedir.



# PROJE KAPSAMINDA YAPILAN YAYIN VE TELBİĞLERLE

## İLGİLİ BİLGİLER

TÜBİTAK , TBGAG 31DPT Projesi esnasında proje ekibi tarafından konu ile ilgili yapılmış yayınlar aşağıda verilmiştir.

### I. TEZLER :

#### *Bitirilmiş Tezler*

1. Characterization and Subcellular Distribution of Salt Stress Induced Proteins in Different Rice Varieties” S.M.S.Saqlan Naqvi (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ), Doktora Tezi, Mayıs 1993
2. Physiological and Biochemical Responses of Wheat to Salt Stress” Veli Cengiz Özalp (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ), Y.Lisans Tezi, Ocak 1993
- 3 “Physiological and Biochemical Responses of Wheat Varieties to Heat Stress.” Fatma Özkan. (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ,Yardımcı Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem) Y.Lisans Tezi, Eylül 1994
4. “*Agrobacterium* Mediated Gene Transfer in Tobacco” Mehrzad Mahmoudian. (Danışman, Doç.Dr. Hüseyin A. Öktem, Yrd.Danışman Prof. Dr. Meral Yücel) Y.Lisans, Ocak 1995
5. “Characterization of Wheat Superoxide Dismutase Isozymes Under Stress Conditions” Füsün İnci. (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ,Yardımcı Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem) Y.Lisans Tezi, Eylül 1995
6. “Characterization of Total Lipid of Wheat Varieties Under Stress Conditions.” Alper Soydan. (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel , Yardımcı Danışman Doç.Dr. Hüseyin A. Öktem) Y.Lisans Tezi,Ekim 1995

#### *Devam Etmekte Olan Tezler*

1. “Identification of inositol-1-4-5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) Binding Sites in Plant Tissues” Nazlı Maki. Doktora Tezi (Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem, Yrd.Danışman Prof. Dr. Meral Yücel)
2. “Characterization of Heat Resistant Turkish Wheat Varieties at Genomic Level” Veli Cengiz Özalp. Doktora Tezi (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ,Yrd.Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem)
3. “Effect of Plant Growth Regulators on Salt Stressed Wheat Varieties” Meltem Mavituna (Danışman Prof. Dr. Meral Yücel ,Yrd.Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem)
4. “Genetic Manipulation of Tobacco Plants Against Herbicide Resistance” Yalın Soyer (Danışman Doç.Dr. Hüseyin Avni Öktem, Yrd.Danışman Prof. Dr. Meral Yücel)
5. “Genetic Transformation of Tomato via *Agrobacterium*” Yeter Bülbül

### II. MAKALELER :

1. S.M.S.Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : “Study of proteins synthesized in rice roots under salt stress conditions.” International Rice Research Letters,. Vol.17, s.15-16, 1992.
2. S.M.S.Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : “Two-dimensional electrophoresis of proteins with a different approach to isoelectric focusing.” The Analyst, Vol.119, s.1341-1344, 1994.
3. S.M.S.Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : “Salt Induced Synthesis of New Proteins in the Roots of Rice Varieties (*Oryza sativa L.*)” J. of Plant Nutrition, Vol 18,s.1121-1137, 1995.

6. F.Özkan, H.A. Öktem, M.Yücel : "Physiological and Biochemical Characterization of Wheat Varieties With Respect to High Temperature Stress." Environmental and Experimental Botany, Sunuldu, 1996.
7. Öktem H.A., Özalp V.C., Nalbant D., Özkan F., Naqvi S.M.S., Memon A.R., Yücel M. : "Identification of stress induced proteins in different varieties of poppy (*Papaver Somniferum* L.)." Doğa Botanik Dergisi, Vol. 16, s.395-403, 1992.
8. İnci F., Öktem H.A., Yücel M. "Characterization of superoxide dismutase isozymes in wheat varieties under stress conditions." MED Campus, Enzymes as Industrial Tools, Ege Üniv. Biotech. Center, İzmir-Turkey (Lecture Notes) s.37-42, 1993.
9. Özalp C., Saglan S.M.S., Öktem H.A., Yücel M. "Characterization of salt induced proteins in wheat cultivars." MED Campus, Enzymes as Industrial Tools, Ege Üniv. Biotech. Center, İzmir-Turkey (Lecture Notes) s. 31-34, 1993
10. Özkan F., Öktem H.A., Yücel M. "Effect of heat stress on photosynthetic activity and protein synthesis in different wheat varieties." MED Campus, Enzymes as Industrial Tools, Ege Üniv. Biotech. Center, İzmir-Turkey (Lecture Notes) s.23-30, 1993.
11. Öktem H.A., Yücel M. : "Tütün Bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla gen transferi." Anadolu, Ege Tarımsal Enstitüsü Araştırma Dergisi, Vol.3, s.1-10, 1993.
12. Öktem H.A., Özalp V.C., Özkan F., Yücel M. : "*Agrobacterium* mediated gene transfer in tobacco" Doğa Botanik Dergisi, Vol.18, s.397-405, 1994.
13. Öktem, H.A., Mahmoudian, M., Yücel, M. : "Expression of functional foreign genes in F1 progeny of transgenic tobacco plants" Biyokimya Dergisi, Vol. XIX, p.9-20, 1995.

### III. TEBLİĞLER :

1. H.A.Öktem, V.C.Özalp, F.Özkan, D.Nalbant, S.M.S. Naqvi, A.R.Memon, M.Yücel : "Identification of stress induced proteins in different varieties of poppy (*Papaver Somniferum* L.)." Keystone Symposia. Crop Improvement via Biotechnolgy : An International Prespective." Abstracts, s.233, Colarado, ABD, 10-16 Nisan 1992.
2. S.M.S. Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, F.Özkan, D.Nalbant, A.R.Memon, M.Yücel : "Salt stress induced proteins in salt tolerant rice varieties." Keystone Symposia. Crop Improvement via Biotechnolgy : An International Prespective." Abstracts, s.234, Colarado, ABD, 10-16 Nisan 1992.
3. S.M.S. Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : "Pysiological and biochemical responses of wheat varieties to salt stress." An International Semposium on Applications and Prospects of Biotechnology for Arid and Semi-Arid Lands, Lubbock, Texas, ABD, 5-7 Kasım, 1992
4. S.M.S. Naqvi, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : "Molecular responses of rice to salinity." An International Semposium on Applications and Prospects of Biotechnology for Arid and Semi-Arid Lands, Lubbock, Texas, ABD, 5-7 Kasım, 1992
5. F.Özkan, H.A.Öktem, M.Mavituna, F.İnci, A.Soydan, A.M.Weinheimer, M.Yücel. "Physiological and biochemical responses of wheat varieties to heat stress", International Symposium on Biotechnology for Sustainable Development, Abstracts, s.122, Fasiabat, Pakistan, December 15-20, 1993.
6. Özkan F., Öktem H.A., Yücel M. "Characterization of Turkish wheat varieties with respect to high temperature stress." 4<sup>th</sup> Internatonal Congress of Plant Molecular Biology, Abstracts, s.387, Amsterdam, Hollanda, 19-24 Haziran, 1994,
7. İnci F., Öktem H.A., Yücel M. " Characterization of superoxide dismutase isozymes in wheat varieties under stress conditions." 4<sup>th</sup> Internatonal Congress of Plant Molecular Biology, Abstracts, s.443, Amsterdam, Hollanda, 19-24 Haziran, 1994,
8. Naqvi, S.M.S., Özalp, V.C., Özkan F., Öktem H.A., Memon A.R., Yücel M. : "Identification and characterization of stress proteins in crop plants I : Heat and cold stress in wheat." Biyokimya Dergisi, Vol.XVI, s.146, 1991.
9. Öktem H.A., Özalp, V.C.,Naqvi S.M.S., Nalbant D., Memon A.R., Yücel M.: "Identification and characterization of stress proteins in crop plants II : Cold and metal stress in different varieties of poppy." Biyokimya Dergisi, Vol.XVI, s.148, 1991.
10. Naqvi S.M.S, Özalp V.C., Öktem H.A., Yücel M. : "Tuz stresi altında pirinçte sentezlenen kök proteinlerindeki değişiklikler." Biyokimya Dergisi, Vol.XVII, s.B-17, 1992.
11. Soydan A., Özalp V.C., Öktem H.A., Naqvi S.M.S., Yücel M. : "Tuz stresi altında buğday yaprak lipidlerinin yağ asidlerinin karakterizasyonu." Biyokimya Dergisi, Vol.XVII, s.B-67, 1992.

12. Özalp V.C., Naqvi S.M.S., Öktem H.A., Yücel M.: "Farklı buğday türlerinin tuz stresine karşı fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri". *Biyokimya Dergisi*, Vol.XVII, s. B-65, 1992.
13. Özalp V.C., İnci F., Naqvi S.M.S., Özkan F., Öktem H.A., Göktürk H., Yücel M.: "Hava kirletici SO<sub>2</sub> gazının değişik buğday türlerinin fotosentetik aktiviteleri üzerine etkisi.", *Biyokimya Dergisi*, Vol.XVII, s.B-12, 1992.
14. F. İnci, M.A.Weinheimer, S.Allahverdi, F.Özkan, H.A.Öktem, M.Yücel : "The Effects of Polystimulin A-6 on Photosystem-II Activity of Two Turkish Wheat Genotypes Under Slowly Developing Drought Stress." XII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Özet Kitabı, B-28, İstanbul, 13-16 Nisan, 1994.
15. H.A.Öktem, M.Mahmoudian, N.Pourrastegar, M.Yücel : "Genetic Transformation of Tobacco (*Nicotina tabaccum*) via *Agrobacterium* Mediated DNA Transfer." XII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Özet Kitabı, B-23, İstanbul, 13-16 Nisan, 1994.
16. F.Ayaydın, V.C.Özalp, H.A.Öktem, M.Yücel : "Comparison of Heat Resistance of Different Wheat Cultivars By Molecular Genetic Markers." XII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Özet Kitabı, C-701, İstanbul, 13-16 Nisan, 1994.
17. M.Mavituna, F.Setenci, N.Pourrastegar, H.A.Öktem, S.Allahverdi, M.Yücel : "Salt Stress Response of Turkish Wheat Cultivars Treated With a Synthetic Hormone Polysitimulin A-6 (PSA-6)." XII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Özet Kitabı, C-353, İstanbul, 13-16 Nisan, 1994.
18. Öktem, H.A., Mahmoudian, M., Yücel, M. : "Tütünde Fonksyonel Yabancı Genlerin Transferi ve Kalıtımı." II. Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu, Bildiri ve Poster Özetleri, s.40, Ankara, 22-23 Eylül, 1994.
19. Yücel M., Saglan S.M.S., Özkan F., Öktem H.A. : "Identification and subcellular localization of stress protins in crop plants' XII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Özet kitabı, A-09, 1996.

NOT:

3 ve 4 numaralı Yüksek Lisans tezleri 1995 ve 1996 yıllarında ODTÜ Prof. Dr. Mustafa Parlar Vakfı en iyi tez ödülünü almıştır.

Tebliğlerden 15 ve 17 numaralarla belirtilen tebliğler Nisan 1994 XII. Biyokimya Kongresinde en iyi poster ödülüne layık görülmüştür.

## ÖZET

Bu projede öncelikle sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve metal stresine dayanıklı tahıl bitkilerinin seçiminde kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Birbirlerinden bağımsız olarak uygulanan farklı fizyolojik testler Fotosentez II (PS II) aktivite ölçümleri, hücre zarı geçirgenliği, mitokondrial aktivite testleri birbirleri ile uyumlu sonuçlar vermiştir.

Buğday bitkisi ile yapmış olduğumuz çalışmalarda örneğin Gerek, Tosun 144, Bezostaja, Kharachia (ekmeklik buğday; *Triticum aestivum*); yukarıda belirtilen fizyolojik testler sonucunda Tosun ve Kharachia sıcaklık stresine en dayanıklı çeşit olarak bulunmuş ve Gerek en hassas çeşit olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde tuz stresine dayanıklı buğday çeşitlerinin seçilmesinde uygulanan fizyolojik yöntemlerle sağlıklı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında farklı tuz stresi 0.2 %, 1 % , 4 % ve 20 % olarak 1 gün 3 gün ve 5 gün süre ile uygulanmış. Fotosistem II aktivite ölçümleri ve hücre zarı geçirgenliği testlerinin sonucunda, Gerek ve Bezostaja en hassas çeşit olarak tesbit edilirken Tosun ve Kharachia en dayanıklı çeşit olarak bulunmuştur.

Laboratuvar koşullarında uygulanan fizyolojik yöntemlerle elde edilen sonuçlar Tarım Orman Bakanlığı Eskişehir Geçit Kuşağı Araştırma Merkezi'nden elde ettiğimiz tarla denemeleri sonuçlarına yönelik bilgilerle uyum halindedir. Belirtilen fizyolojik tekniklerle laboratuvar koşullarında kısa zamanda sonuç alınması bu tekniklerin dayanıklı çeşit ve türlerin taranmasında kullanılabileceğini göstermektedir.

Aynı şekilde stres koşullarında sentezlenen proteinlerin profilleri bir ve iki boyutlu elektroforez teknikleri kullanılarak gümüş boyama ile görüntülenmiştir. Buğday bitkisinde sıcaklık stresi altında (37 ° derecede) farklı *Triticum aestivum* ve *Triticum durum* çeşitleri ile yapılan çalışmalarda toplam 16 yeni sentezlenmiş sıcaklık stresi proteini belirlenmiştir. Bu proteinlerin 15-18 kD molekül ağırlığında ve pI değerlerinin 6.0-7.0 civarında olduğu gözlenmiştir. Değişik çeşitler arasında sıcaklık stresi proteinlerinin sentezlenmesi açısından ekmeklik çeşitlerde kalitatif değişiklikler olduğu görülmüştür. Örneğin, bazı sıcaklık stres proteinlerinin makarnalık çeşitlerde (Çakmak, ES-91) sentezlenmediği ancak ekmeklik

çeşitlerde sentezlendiği görülmüştür. Aynı şekilde bazı sıcaklık stres proteinlerinin Kharachia; (Pakistan orijinli) ve Bezostaja'da; (Rus orijinli) sentezlenmediği halde Türk buğday çeşitlerinde gözlenmiştir.

Sıcaklık stres proteinlerinin türlere ve çeşitlere özgü olması sıcaklığa dayanıklı çeşitlerin tesbitinde önemlidir. Diğer taraftan bu proteinlerin sıcaklığa dayanıklılık mekanizmalarında rolleri olduğu düşünülmektedir.

Bu protein markörlerin tesbiti sıcaklığa dayanıklı verimi yüksek çeşitlerin gen mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmesi açısından önemlidir. Proteinlerin amino asit sıralarının tesbiti jelden mümkündür dolayısı ile proteini sentezleyen gen tesbit edilebilir ve plasmid hazırlanabilir.

Aynı şekilde tuzluluk, kuraklık ve metal stresleri sonucunda sentezlenen yeni stres proteinlerinin tür ve çeşitlere özgü olduğu gözlenmiştir. Bu protein markörlerin yukarıda belirtildiği gibi stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin tesbitinde kullanılabileceği gibi stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin gen mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmesi ve yeni stratejilerin oluşturulması açısından önemli bulgulardır.

Stres koşullarına dayanıklılık sağlayan genlerin tesbitine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Raporda da belirtildiği gibi laboratuvarımızda *Agrobacterium*'a dayalı gen transfer tekniği tütün bitkisinde oturtulmuş, transjenik tütün bitkileri elde edilmiştir.

Çalışmalarımız agronomik özelliği olan bitki transformasyon vektörlerinin hazırlanması ve bunların protoplast ve *Agrobacterium* sistemlerinde denenmesi yönünde devam etmektedir.

Bu konu ile ilgili yeni bir proje önerisi TÜBİTAK'a sunulmuştur.