

**Trehaloz-6-Fosfat Sentaz Geninin Buğdaydan İzolasyonu ve Tuz
ve Kuraklık Stresleri Altında Genin İfadesinin İncelenmesi**

Proje No: TOVAG-106O139

**Prof. Dr. Meral YÜCEL
Prof. Dr. Haluk HAMAMCI
Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM
Beray Gençsoy ÜNSAL**

**TEMMUZ 2008
ANKARA**

ÖNSÖZ

Abiyotik stres faktörleri dünya genelinde olduğu kadar ülkemiz tarım alanlarında da üretimi olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında yer almaktadır. Bitkilerde abiyotik streslere karşı moleküler kontrol mekanizmaları stresle ilgili bazı genlerin aktivasyonuna ve regülasyonuna dayanmaktadır. Bu mekanizmaların tanımlanması kültür bitkilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayacaktır.

Son zamanlarda strese karşı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde TPS genine olan ilgi artmıştır. Bu projede, ülkemizde ekimi yapılan, tuza ve kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen Bayraktar ekmeçlik buğday çeşidinden TPS geninin izolasyonu yapılmış ve tuz ve kuraklık stresi koşullarında genin ifadesindeki değişime bakılmıştır. Buğdaydan izole edilen bu genin abiyotik strese dirençli, ülkemize özgün kültür bitkilerinin geliştirilmesinde kullanılması planlanmaktadır. Buna yönelik olarak laboratuvarlarımızda doku kültürü, transformasyon ve rejenerasyon sistemleri mevcuttur. İyileştirilmiş kültür bitkilerinin tarım alanında verim artışını önemli seviyede yükselteceği düşünülmektedir.

Literatürde, buğday TPS geninin izolasyonuna ve gen ifadesine yönelik henüz bir çalışmaya rastlanmadığından bu araştırmanın literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağı görülmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde gerekli finansmanı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna teşekkürlerimizi sunuyoruz.

**Prof. Dr. Meral YÜCEL
O.D.T.Ü. Biyolojik Bilimler Bölümü
ANKARA**

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	4
3.1. Bitkilerin yetiştirilmesi ve kuraklık ve tuz stresinin verilmesi.....	4
3.2. Buğday TPS geninin izolasyonu	4
3.2.1 Total RNA izolasyonu	4
3.2.2 DNase1 muamelesi	5
3.2.3 cDNA sentezi	5
3.2.4 Dejenere Primer Tasarımı	5
3.2.5 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	6
3.3. Abiyotik stres koşullarında TPS geninin ifadesine bakılması	7
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	9
4.1 Buğday TPS geninin izolasyonu	9
4.2. Abiyotik stres koşullarında TPS geninin ifadesine bakılması	12
5. SONUÇ	15
KAYNAKLAR	16

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Literatüre yansımış olan trehaloz biyosentez izyolundaki genlerin transgenik bitkilerdeki ifadesi ile ilgili çalışmalar	4
Tablo 3.1. Dejenere Primerler	7
Tablo 3.2. Dejenere Primerlerin Yerleri	7
Tablo 3.3. RACE primerleri	8
Tablo 3.4 5-RACE ve 3-RACE için kullanılan PZR koşulları	8
Tablo 4.1.1 tblastx sonuçları	12
Tablo 4.1.2 CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment	13

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Trehalozun kimyasal yapısı.....	2
Şekil 2.2 Bitkilerde Trehaloz Sentezi	2
Şekil 4.1.1 Buğday TPS geni için açık okuma bölgesinin jel fotoğrafı	11
Şekil 4.2.1 TPS geninin bir kısmını çoğaltmak için kullanılan primer setlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	14
Şekil 4.2.2 Kuraklık stresi uygulanmış buğday fidelerinin kök dokusundaki TPS geninin ifadesindeki değişimi gösteren jel fotoğrafı	15
Şekil 4.2.3 Tuz stresi uygulanmış buğday fidelerinin kök dokusundaki TPS geninin ifadesindeki değişimi gösteren jel fotoğrafı	15

ÖZET

Trehaloz, iki glikoz ünitesinden oluşan indirgemeyen bir disakkarittir. Bu disakkarit, depo karbonhidratı ve çeşitli streslere karşı koruyucu madde olarak bakterilerden omurgasız hayvanlara kadar birçok organizmada bulunur. Trehaloz biyosentezinde Trehaloz-6-fosfat sentaz (TPS) ve trehaloz-6-fosfat fosfataz (TPP) enzimleri rol oynamaktadır.

Bitkilerde trehalozun ozmoprotektant madde olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Son zamanlarda abiyotik stres etmenlerine karşı dayanıklı transgenik bitkiler oluşturulmasında trehaloz biyosentezi izyoluna olan ilgi artmıştır. TPS geninin bitkilerde aşırı ifadesinin stres toleransını geliştirdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmada kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen yerel ekmeklik (*T. aestivum*) buğday çeşitlerimizden biri olan Bayraktar kullanılmıştır. Proje kapsamında buğday TPS genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu dizi için açık okuma bölgesi (ORF) 2508 bp olarak bulunmuştur. NCBI veritabanı kullanılarak tblastx analizi yapıldığında dizinin *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Selaginella lepidophylla* bitkilerindeki TPS geni ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Daha sonra RT-PZR ile TPS geninin ifadesine kök ve gövde dokusunda tuz ve kuraklık stresi altında 1, 2, 4 ve 12 saat zaman noktalarında bakılmıştır. Bitkilere kuraklık stresi için %20 PEG, tuz stresi için ise 250mM NaCl içeren sıvı ortam uygulanmıştır. Kök dokusunda tuz ve kuraklık stresi altında genin ifadesinde artışa rastlanmıştır. Yaprak dokusunda ise belirgin bir artış gözlenmemiştir.

Literatürde, Buğday TPS genine ait henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, projeden elde edilen bulgular literatürde buğday TPS genine ait ilk moleküler çalışma örneğini oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: buğday, TPS, kuraklık, tuz stresi

ABSTRACT

Trehalose is a non-reducing disaccharide sugar that is made up of two glucose units. It occurs in a large variety of microorganism and invertebrate animals where it functions as a storage carbohydrate and as a protectant against various stresses. Trehalose is catalyzed by trehalose-6-phosphate synthase (TPS) and trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP).

Osmoprotectant role of trehalose has been shown in some plants. In recent years, there has been a growing interest in trehalose metabolism as a means of engineering stress tolerance in plants. Overexpression of TPS in some plants improved stress tolerance.

In this project, Bayraktar bread wheat (*T. aestivum*) cultivar was used. Firstly, cDNA sequence of wheat TPS gene was determined by RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Open reading frame (ORF) of the sequence was found to be 2508 bp. When this sequence was analyzed with tblastx, it was seen that this sequence showed similarity with other plants TPS genes such as *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Selaginella lepidophylla*. Then, the expression of the gene under normal and salt and drought stresses was examined in root and shoot tissues at the time point of 0, 1, 2, 4 and 12h by RT-PCR. For salt and drought stresses, the seedlings were supplemented with 250 mM NaCl and 20% PEG solutions respectively. In root tissue, expression of TPS increased under salt and drought stresses whereas in leaf tissue, expression of gene did not change.

Until now, there has been no known literature data about wheat TPS gene. These findings constitute the first molecular study for wheat TPS gene in literature.

Keywords: wheat, TPS, drought, salt stress

1. GİRİŞ

Trehaloz, iki glüköz ünitesinden oluşan indirgemeyen bir disakkarittir. Mayada ve *E. coli*' de trehaloz biyosentezini Trehaloz-6-fosfat sentaz (TPS) ve trehaloz-6-fosfat fosfataz (TPP) enzimleri katalizler. Bu disakkarit, depo karbonhidratı ve çeşitli streslere karşı koruyucu madde olarak bakterilerden omurgasız hayvanlara kadar birçok organizmada bulunur. Bazı bitkilerde trehalozun varlığı GC-MS ile gösterilmiştir. *Arabidopsis thaliana* ve *Selaginella lepidophylla* bitkilerinde trehaloz biyosentezi ile ilgili genler bulunmuştur. Bu bulgular trehaloz biyosentezinin bitkilerde de yaygın olduğunu göstermiştir.

Bitkilerde trehalozun ozmoprotektant madde olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Önceki çalışmamızda kuraklık stresi altında buğday fidelerinde hem trehaloz birikiminin hem de TPS enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Son zamanlarda strese karşı dayanıklı transgenik bitkiler oluşturmak için trehaloz metabolizmasına ilgi artmıştır. TPS geninin bitkilerde aşırı ifadesinin stres toleransını geliştirdiği gözlenmiştir.

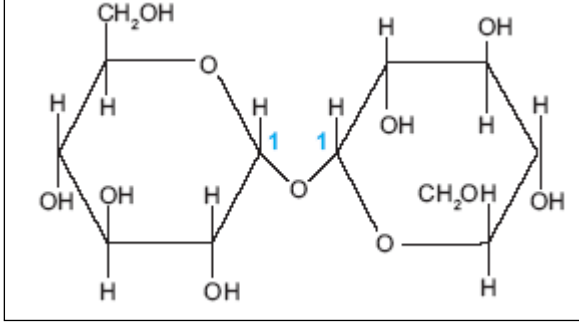
Bu projede, ülkemizde ekimi yapılan Bayraktar ekmeçlik buğday çeşidinden (*T. aestivum*)TPS geninin izolasyonunun yapılması ve genin ifadesindeki değişime tuz ve kuraklık stresi koşullarında bakılması amaçlanmıştır.

Proje kapsamında, buğday TPS genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra RT-PZR yöntemleri ile genin ifadesi normal ve tuz ve kuraklık stresleri altında tayin edilmiştir. Yaprak dokusunda genin ifadesinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Kök dokusunda tuz ve kuraklık stresleri altında genin ifadesinde artış gözlenmiştir.

Literatürde, Buğday TPS genine ait henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, projede elde edilen veriler literatürde buğday TPS genine ait ilk moleküler çalışma örneğini oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Trehaloz, iki glükoz ünitesinden oluşan indirgemeyen bir disakkarittir (Elbein, 1974). Bu disakkarit, enerji kaynağı ve ozmoprotektant olarak bakterilerden omurgasız hayvanlara kadar birçok organizmada bulunur (Crowe ve ark., 1984).



Şekil 2.1 Trehalozun kimyasal yapısı

Bugüne kadar trehaloz biyosentezi için 5 farklı izyolu bulunmuştur. Bitkilerde trehaloz biyosentezinde OtsA-OtsB izyolu olduğu gözlenmiştir. Bu izyolunda Trehaloz-6-fosfat sentaz (TPS) ve Trehaloz-6-fosfat fosfataz (TPP) enzimleri rol oynamaktadır (Avonce ve ark., 2006).



Şekil 2.2 Bitkilerde Trehaloz Sentezi

Bitkilerde trehalozun varlığı *Arabidopsis*, buğday ve patatesten GC-MS (Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi) ile tespit edilmiştir (El-Bashiti ve ark., 2005; Vogel ve ark., 2001; Roessner ve ark., 2000). Trehaloz-6-P sentaz geni, *Arabidopsis thaliana* (*AtTPS1*), *Selaginella lepidophylla* (*SlTPSI*), *Ginkgo biloba* (*GbTPS*), *Solanum lycopersicum* (*SlTPS*) ve pamuktan klonlanmıştır (Blazquez ve ark., 1998; Zentella ve

ark., 1999; Wu ve ark., 2006; Lunn, 2007; Kosmas ve ark., 2006). *ATPSI* geninin *Arabidopsis thaliana*'nın birçok dokusunda ifade edildiği görülmüştür (Blazquez ve ark., 1998). *Arabidopsis* genomu TIGR veritabanı kullanılarak incelendiğinde 11 tane *TPS* homologu bulunmuştur (Leyman ve ark., 2001). Trehaloz-6-fosfat fosfataz geni *Arabidopsis thaliana* (*AtTPPA* ve *AtTPPB*) ve tütünden (*NtTPPL*) klonlanmıştır (Vogel ve ark., 1998; Yu-Jun ve ark., 2005). Bu bulgular bitkilerin trehalozu sentezleyebildiğini göstermektedir.

Mevcut literatür bilgisi incelendiğinde bitkilerde trehalozun ozmoprotektant olabileceğini gösteren çalışmalar görülmektedir. Pirinç fideleri trehaloz içeren ortamda büyütüldüklerinde tuz stresine dayanıklı hale geldiği gözlenmiştir (Garcia ve ark., 1997). Önceki çalışmamızda, kuraklık stresi altında Tosun ve Çakmak ekmeklik buğday çeşitlerinde biyokimyasal çalışmalar sonucunda hem trehaloz birikiminin hem de *TPS* enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (El-Bashiti ve ark., 2005). Bu sonuçlar stres koşullarında trehaloz biyosentezinin önemini göstermektedir.

Son zamanlarda abiyotik stres etmenlerine karşı dayanıklı transgenik bitkiler oluşturulmasında trehaloz biyosentez izyoluna olan ilgi artmıştır. Tütün, patates, domates pirinç bitkilerine *E. coli*'nin ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin *TPS* geni aktarılmıştır. Bu bitkilerin özellikle kuraklık stresine karşı dayanıklı hale geldikleri ve fotosentez kapasitelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Holmström ve ark., 1996; Romero ve ark., 2001; Pilon-Smits ve ark., 1998; Almeida ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2005; Pellny ve ark., 2004; Jang ve ark., 2003; Garg ve ark., 2002; Yeo ve ark., 2000; Kwon ve ark., 2004; Avonce ve ark., 2004).

Bu projede, ülkemizde ekimi yapılan, tuza ve kuraklığa dayanıklı olduğu bilinen Bayraktar ekmeklik buğday çeşidinden *TPS* geninin izolasyonunun yapılması ve tuz ve kuraklık stresi koşullarında genin ifadesindeki değişime bakılması amaçlanmıştır.

Tablo 2.1 Literatüre yansımış olan trehaloz biyosentez izyolundaki genlerin transgenik bitkilerdeki ifadesi ile ilgili çalışmalar

Hedef Bitkiler	Orijin	Kullanılan Gen	Etkiler	Kaynaklar
Tütün	Maya	TPS1	Kuraklık Toleransı,	Holmström ve ark., 1996 Romero ve ark 2001
Tütün	<i>E.coli</i>	otsA (TPS)	Kuraklık toleransı	Pilon-Smits ve ark 1998
Tütün	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TPS	Kuraklık toleransı	Almeida ve ark., 2005
Tütün	<i>Grifola frondosa</i>	TPS	Tuz ve kuraklık toleransı	Zhang ve ark., 2005
Pirinç	<i>E. coli</i>	otsA	fotosentez kapasitesinde artış	Pellny ve ark., 2004
Pirinç	<i>E. coli</i>	TPSP füzyon geni	Kuraklık, tuz ve soğuk stresi toleransı, trehaloz birikimi	Jang ve ark.,2003 Garg ve ark., 2002
Patates	Maya	TPS1	Kuraklık toleransı	Yeo ve ark., 2000
Patates	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	TPS TPP	Kuraklık toleransı	Kwon ve ark., 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TPS	Kuraklık toleransı	Avonce ve ark., 2004
Domates	maya	TPS	Kuraklık, tuz toleransı	Cortina ve ark., 2005

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Bitkilerin yetiştirilmesi ve kuraklık ve tuz stresinin verilmesi

Bu çalışmada Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından kuraklığa dayanıklı olduğu belirlenen Bayraktar buğday çeşidi kullanılmıştır. Bitkiler sıvı ortamında ½ Hoagland Solüsyonu verilerek iklim odasında 25°C'de 16/8 saat ışık/karanlık ortamında büyütülmüştür.

Tuz ve kuraklık stresi 8 gün büyütülmüş fidelere 1, 2, 4 ve 12 saat uygulanmıştır. Kuraklık stresi uygulanacak fidelere %20 PEG 6000 (Polyethylene Glycol) içeren Hoagland Solüsyonu verilmiştir. Tuz stresi ise fidelere 250mM NaCl içeren Hoagland Solüsyonu verilerek uygulanmıştır. Bu bitkilerden kök ve gövde örnekleri toplanmış, sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve ileride kullanılmak üzere derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmiştir.

3.2. Buğday TPS geninin izolasyonu

3.2.1 Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için Trizol yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak 0.1 g yaprak ya da kök dokusu sıvı nitrojen ile öğütülüp, üzerine 1 mL Trizol eklenmiştir. Bu karışım 10 dakika karıştırıldıktan sonra 5 dakika sentrifüj (mini soğutmalı MPW-65R) edilip, supernatant alınıp üstüne 200 µl kloroform eklenmiştir. Bu karışım 4° de 15 dakika sentrifüj edilip üst faz alınmıştır. Bu faza yine 200 µl kloroform eklenmiş ve 5 dakika sentrifüj yapılmıştır. Üst faz alınarak üstüne 1 hacim isopropanol eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip, akabinde 15 dakika sentrifüj edilmiştir. Daha sonra supernatant atılıp, pellet %75 ETOH ile yıkanıp 5 dakika sentrifüj edilmiştir. Yıkanan pellet daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında kurutulup üzerine 40 µl DEPC-H₂O eklenip, pelletin çözülmesi için 15 dakika 65° de inkübe edilmiştir.

Elde edilen total RNA örneklerinin derişimi spektrofotometrik yöntemle 260 nm de okunarak bakılmıştır. Total RNA miktarının derişimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Total RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} \times \text{seyreltme katsayısı} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Total RNA'nın kalitesi ise agaroz jel elektroforez ile belirlenmiştir.

3.2.2 DNase1 muamelesi

RT-PCR deneylerine başlamadan önce total RNA örneklerinin içerisinde olabilecek genomik DNA parçacıkları Dnase1 (Fermentas) ile 37° de 30 dakika muamele edilerek uzaklaştırılmıştır. Bu reaksiyonda 1µg total RNA için 1µL Dnase (1u/ µL) kullanılmıştır. Reaksiyona daha sonra EDTA eklenerek 68° de DNase1 aktivitesi durdurulmuştur.

3.2.3 cDNA sentezi

cDNA sentezi için Revert Aid cDNA Synthesis kiti (Fermentas) kullanılmıştır. Bu reaksiyonun her aşaması Techne PZR cihazında yapılmıştır. Reaksiyonun ilk aşamasında 1 µg total RNA ile 1 µl oligo(dT)₁₈ primer (0.5 µg/µl) karıştırılarak 70°C de 5 dakika inkübe edilir. Daha sonra bu karışıma 4µl 5x Reaksiyon tamponu, 1µl RiboLock Ribonuclease Inhibitor (20 u/µl) ve 2 µl 10 mM dNTP mix eklenerek 37°C de 5 dakika bekletilir. Bu karışıma 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) ilave edilerek 1 saat 42°C tutulur. Reaksiyon 70°C de 10 dakika ısıtılarak durdurulur.

3.2.4 Dejenere Primer Tasarımı

Buğday TPS geninin dizini bilinmediğinden ilk olarak degenerate primer tasarımı yapılmıştır. Buğday TPS genine özgü primerler hazırlanırken *Arabidopsis thaliana*, (Y08568); *Selaginella lepidophylla*, (U96736); *E.coli*; (X69160) ve *Saccharomyces cerevisiae* (X68214) organizmalarının TPS genlerinin korunmuş amino asit

bölgelerinden yararlanılmıştır. Primer tasarımı için CODEHOP (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>) adlı program kullanılmıştır. Tablo 1 de kullanılan primerler verilmiştir. Primerlerin yerleri Tablo 2 de görülebilir.

Tablo 3.1. Dejenere Primerler (N: A veya G veya T veya C; R: A veya G; Y:C veya T).

TPS	Forward primer	5'-CGGCTGGTTCCTGCACAYNCCNTTYCC-3'
	Reverse primer	5'-TCGTAGCTTACAAGGTTTCATNCCRTCNC-3'

Tablo 3.2. Dejenere Primerlerin Yerleri

Y08568.1 A.Thaliana	YEEDVVVCHDYHLMFLPKLKEYNSK-----MKVGFHLHTPFPSSEIHRITLPSRSELLR	221
U96736.1 SLU96736	YQEGDVVWCHDYHLMFLPSYLKEKDSQ-----MKVGFHLHTPFPSSEIYRITLPLRAELLQ	293
X68214.1 SCTPS1	MNHNDLIWVHDYHLMFLVPEMLRVKIHEKQLQNVKVGWFLHTPFPSSEIYRILPVRQEILK	205
X68214 OTSA_ECOLI	LQDDDIWIHDYHLLPFAHELKRGVN-----NRIGFFLHIFPPTPEIFNALPTYDTLLE	174
	..*:*:* *****: .. *: : : :*:*** ***:**.. ** :*:	
	İleri Primer →	
Y08568.1	SVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEG-TPEGVEDQGRLTRVAAFPIGIDSDRFIR	280
U96736.1 SLU96736	GVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEG-TPEGVEDQGNTRVAAFPVGIDSERFIE	352
X68214.1 SCTPS1	GVLSCDLVGFHTYDYARHFLSSVQRVLNVNT-LPNGVEYQGRFVNVGAFPIGIDVDFKFTD	264
P31677 OTSA_ECOLI	QLCDYDLLGFQTENDRLAFLDCLSNLTRVTRSAKSHTAWGKAFRTEVYPGIEPKEIAK	234
	: **:*:*: * : *:. . : : . . * : . . .:***: . . :	
Y08568.1	ALEVPEVKQHMKELKERFTDRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLLEANANWRDKVLL	340
U96736.1 SLU96736	AVETDAVKKHMQELSQRFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPQKLLAFEKFLLEENSEWRDKVLLV	412
X68214.1 SCTPS1	GLKKEVQKRIQQLKETFKGCKIIVGVDRLDYIKGVQKLHAMEVFLNEHPEWRGKVVLV	324
P31677 OTSA_ECOLI	QAAG-PLPPKLAQLKAELKNVQNFVSVERLDYSKGLPERFLAYEALLEKYPQHHGKIRYT	293
	: : :* . : . : :. .:*** ***:*** * * * : : : . : .:	
Y08568.1	KIAPVTRPDVPEYQTLTSQVHEIVGRIIGRLGTLTAVPIHHLDRSLDFHALCALYAVTDV	400
U96736.1 SLU96736	QIAPVTRTDVLEYQKLTSQVHEIVGRINGRFGSLTAVPIHHLDRSMKFPPELALYAITDV	472
X68214.1 SCTPS1	QVAVPSRGDVEEYQYLRVSVNELVGRINGQFGTVEFVPIHFHMKSIPEELISLYAVSDV	384
P31677 OTSA_ECOLI	QIAPTRSGDVQAYQDIRHQLENEAGRINGKYQLGWTFPLYLQHFDRKLLMKIFRYSDV	353
	:* . : * * * * : : . . :*** * : * : . * : : . : : : * : : : **	
Y08568.1	ALVTSLRDGMNLVSYEFVACQE-AKKGVLILSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNITEVAASI	459
U96736.1 SLU96736	LLVTSLRDGMNLVSYEFVACQK-DKKGALILSEFAGAAQSLGAGSILINPWNIIESSNAI	531
X68214.1 SCTPS1	CLVSTRDGMNLVSYEYIACQE-EKKGSLILSEFTGAAQSLN-GAIVNPWNITDLDSDAI	442
P31677 OTSA_ECOLI	GLVTPLRDGMNLVAKYVAAQDPANPGVLVLSQFAGAAANELT-SALIVNPYDRDEVAAL	412
	:. ***: *:*:* . : * *:*:*:*:*:* . : : : * : : : :	
	← Geri Primer	

3.2.5 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

5-RACE ve 3-RACE cDNA kütüphaneleri SMART RACE cDNA Amplification Kiti (Clontech) kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan kütüphaneler daha sonra 3-RACE ve 5-RACE PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. Dejenere primerler ile bulunan gen bölgesinden Tablo 3.3 de verilen primerler tasarlanmıştır.

Tablo 3.3. RACE primerleri

3'RACE	5-CCC AGG TGC CTC AAG GAG CAT GAC ATC-3
5'RACE	5-AAT CAG CGC AGA GCA CGG AGC GAA G-3

5-RACE ve 3-RACE için kullanılan PZR koşulları Tablo 3.4 de verilmiştir.

Tablo 3.4 5-RACE ve 3-RACE için kullanılan PZR koşulları

5-RACE ready cDNA / 3-RACE ready cDNA	2.5 µL
UPM (10X)	5 µl
GSP (10 µM)	1 µl
10X Advantage 2 PCR Buffer	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
50X Advantage 2 Polymerase Mix	1 µl
H ₂ O	34.5 µl
Toplam hacim	50 µl

5-RACE ve 3-RACE için kullanılan PZR programı, 94°C'de 3 dakikalık bir denatürasyonu takiben, 94°C'de 1dk, 68°C'de 30sn ve 72°C'de 3 dk olmak üzere toplam 35 döngü üzerinden yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72°C'de 10 dk.'lık bir ek bekleme yapılmıştır. Bütün PZR'lar Techne cihazı ile yapılmıştır.

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen ürünler jelden Qiaquick Gel Extraction Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırılmıştır. Daha sonra bu ürünler

sekans analizi için bir TA klonlama vektörü olan pOSI-T vektörüne bağlanmıştır. Bu vector *E.coli* DH α -5 bakterisine aktarılmıştır. PZR ürününü taşıyan kolonilerden plasmid izolasyonu FavorPrep Plasmid Isolation Kiti (Favorgen) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen plasmidler sekansa gönderilmiştir. Gelen sekans sonuçları <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> sayfasındaki tblastx kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3. Abiyotik stres koşullarında TPS geninin ifadesine bakılması

Buğdayda TPS geninin ifadesinin kuraklık ve tuz stesi altında gen ifadesindeki değişimine RT-PZR bakılmıştır. Bitkilere uygulanacak stres koşullarının nasıl olduğu “bitkilerin büyütülmesi” kısmında verilmiştir.

RT-PZR deneylerine başlamadan önce total RNA örneklerinin içerisinde olabilecek genomik DNA parçacıkları Dnase1 ile muamele edilerek uzaklaştırılmıştır. Bu reaksiyonda 1 μ g total RNA için 1 μ L Dnase (1u/ μ L) kullanılmıştır. DNase ile muamele edilmiş örnekler Revert Aid cDNA (Fermentas) kiti kullanılarak cDNA dizisine çevrilmişlerdir. Bu cDNA örnekleri RT-PZR deneylerinde kullanılmıştır.

PZR deneylerinde kullanılacak olan TPS genine ait ileri ve geri primerler primer3 programı kullanılarak yapılmıştır.

TPS geni için kullanılan RT-PZR koşulları Tablo da verilmiştir.

cDNA	1 μ l
Primer F (10 μ M)	3 μ l
Primer R (10 μ M)	3 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
Complete buffer (Applichem)	5 μ l
Taq polymerase (Applichem)	0.25 μ l (1U)
PCR-Grade Water	36.5 μ l
Toplam Hacim	50 μ l

TPS için kullanılan PZR programı, 94°C’de 3 dakikalık bir denatürasyonu takiben, 94°C’de 30 sn, 52°C’de 30sn ve 72°C’de 25 dk olmak üzere toplam 29 döngü üzerinden yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72°C’de 10 dk.’lık bir ek bekleme yapılmıştır.

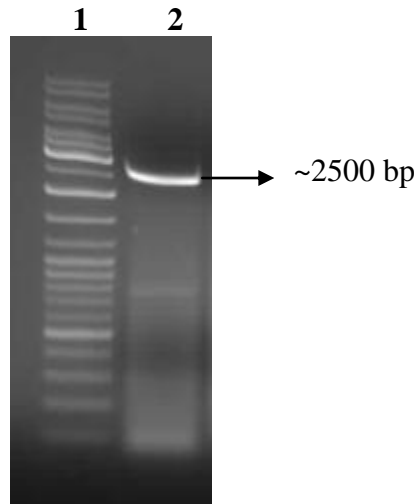
PZR ürünleri %2 lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen ürünler jelden saflaştırılarak dizi analizine gönderilmiştir. Gelen dizi sonuçları <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> sayfası kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Buğday TPS geninin izolasyonu

Buğday TPS genine ait cDNA dizisinin izolasyonu için PZR bazlı bir yöntem olan RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) kullanılmıştır. Buğday TPS geninin dizisi bilinmediğinden genin bir kısmı -600 bp- dejenere pimerler kullanılarak bulunmuştur. Bu dizi kullanılarak RACE reaksiyonunda kullanılacak olan primerler tasarlanmıştır.

RACE reaksiyonları sonucunda 2928 bp olan bir dizi bulunmuştur. Bu ürünün pol-A kuyruğu olduğu görülmüştür. Bu dizi için açık okuma bölgesi (ORF) 2508 bp olarak bulunmuştur. Bu analiz ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.1 de bu dizinin jel fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 4.1.1 Buğday TPS geni için açık okuma bölgesinin jel fotoğrafı (1% agaroz jel), (1) DNA cetveli, (2) TPS geni

Buğday TPS geninin kodladığı amino asit uzunluğu 859 olarak bulunmuştur. Bu dizi analiz edildiğinde 2 tane korunmuş bölge içerdiği görülmüştür. Bitki TPS genlerinin amino asit dizileri N-ucunda TPS ve C-ucunda TPP bölgesi içermektedir (Avonce ve ark., 2006). Buğday TPS geninde de aynı yapı görülmüştür. Analizler için protein veritabanlarından biri olan pfa(<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchBatchBlock>) kullanılmıştır.

Buğday TPS genine ait nükleotit dizisi NCBI veritabanında tblastx ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda bu dizinin *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Selaginella lepidophylla* bitkilerindeki TPS geni ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Tablo 4.1.1 de sonuçlar verilmiştir.

Tablo 4.1.1 tblastx sonuçları

Organizma	Benzerlik
<i>Arabidopsis thaliana</i> (NM_106505)	% 85
<i>Solanum lycopersicum</i> (EF151131)	% 84
<i>Selaginella lepidophylla</i> (SLU96736)	% 74
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AF061037)	% 61

Buğday TPS geni amino asit dizisine çevrilip *Arabidopsis*, *Selaginella* ve *Solanum*la birlikte clustal analizi yapılmıştır. Tablo 4.2.1 de sonuçlar görülmektedir. Bu analizde de bitki TPS geninin oldukça korunmuş amino asit dizisine sahip olduğu görülmektedir.

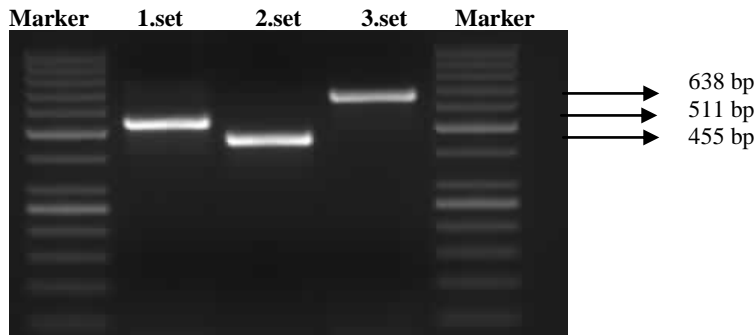
Tablo 4.1.2 CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

Solanum	MPGNKYTG-NQAVASTR-----LERLLRERELRKSSKVSHPFNESDNNRGNEL	48	Solanum	AEEREKRHRHNFHVTHHTAQEWAETFVSELNDTVIEAQQRIRKVPPLRNI SDAIERYSF	585
Arabidopsis	MPGNKYNCSSSHIPLSR-----TERLLRDRERLEKRKSNRARN-PNDVAGSSEN	48	Arabidopsis	AEEREKRHRHNFHVHVKHTAQEWAETFVSELNDTVIEAQLRISKVPPPELPHDAIQRYSK	586
Buğday	-----		Buğday	SDEREKRHRHNYAHVTHHTAQDWAETFVCELNDFVAEALMRTRQVPPDLPSRTAIQQYLQ	497
Selaginella	MPQPYPSSSSTSNAKEAGGAAAAGGGGGAFSLPPLASSRVERLVRERQLRNQRQDE	60	Selaginella	EEERERHRHNFHMTTHSAQVWAETFI SELNDSILEAELRTLHIPPQLPLDKAVAKYSE	598
				:***:*****:*.**:* *****.*****: ** * :*** * * :*	
Solanum	SDHDFRQGEADNGGVSVEQYLEG--AALAYNEGWERPDGKP-TRQRLLVANRLLPVSVA	105	Solanum	SNNRLLILGFNSTLTESVDTPGRRGGDIKEMELKHLPELKESLLAICNDPKTTVVVLSG	645
Arabidopsis	SENDLRLLE--GDSSRQYVEQYLEGAAAAMAHDACERQEVPRYRQRLLVANRLLPVSVA	106	Arabidopsis	SNNRLLILGFNATLTPEVDNQRRG-DQIKEMDLNLHPELKGPLKALCSDPSTTIVVLSG	645
Buğday	-----MKQRLLVANRLLPVSAN	17	Buğday	SKNRLLLILGFNSTLTPEVSSGRRGGQVKEMELKHLHDLKGPLRALCEDESTFVIVLSG	557
Selaginella	PEDEQQALEAEAAVAATEVPDAVAATPSLSD--EFSKISSGRGQRLLVANRLLPVSAT	118	Selaginella	SKNRLVILGFNSTLTQAQVEAPRGRAPDQIREMKIRLHPSIKDILNVLCSDPKTTIVVLSG	658
	*****:***			*:***:*****:*** * : * **::**..**..* * :*.* **::***	
Solanum	RRGEESWSLEISGGGLVSALLGVKEFEARWIGWAGVNVPEAGQALTKALAEKRCIPVF	165	Solanum	SDRNVLDDNFSEYNMMLAAENGFLRSTNGVWMTTPEHLNMDWVDSVKHVFYFTERTP	705
Arabidopsis	RRGEDSWSLEISAGGLVSALLGVKEFEARWIGWAGVNVPEVQKALSALAEKRCIPVF	166	Arabidopsis	SDRSVLDKNFGEYDMWMLAAENGFLRLTNGEWMTTMPEHLNMDWVDSVKHVFYFTERTP	705
Buğday	RRGEDQWSLEISAGGLVSALLGVKVDKAWIGWAGVNVPEVQQAALTKALAEKRCIPVF	77	Buğday	SDRSVLDENFGEFNLWLAEEHGMFLRPTDGEWMTTPEHLNMDWVDSAKHVFYFTERTP	617
Selaginella	RKGETEWNLEMSAGGLVSALLGVKQFEVTVIGWPGVYVQDEKGEKSLRGALEEKGFVPL	178	Selaginella	SERVALDEVFGEFDLWLAENGFLRHTQGEWMTTPEHLNMDWVDSVQLVDFYFCERTP	718
	: .**:* *****:.. ***** ** * :*: * ** * :**:			*.* .**.* * :*:*****:***** *:* *****:*.**:* **.* **	
Solanum	LDEEIVHQYYNGYCINNILWPLFHYLGLPQEDRLATRSFQSQFAAYKKANQMFADVNEH	225	Solanum	RSHFQRETSLVWNYKYADVEFGRLQARDMLQHLWTGPI SNASVDVVQGLRSVEVRAVG	765
Arabidopsis	LDEEIVHQYYNGYCINNILWPLFHYLGLPQEDRLATRSFQSQFAAYKKANQMFADVNEH	226	Arabidopsis	RSHFETRDTSLIWNKYADI EFGRLQARDMLQHLWTGPI SNASVDVVQGLRSVEVRAVG	765
Buğday	LDEEIVHQYYNGYCINNILWPLFHYLGLPQEDRLATRSFQSQFAAYKKANQMFADVNYQH	137	Buğday	RSHFEHRETSFVWNYKYADVEFGRLQARDMLQHLWTGPI SNAVDVVQGLRSVEVRSVGV	677
Selaginella	LDEATVDQYYNGYCINNILWPLFHYIGLRQEDRLAATRSLLSQFNAYKRANRLEFAEAVNF	238	Selaginella	RSFVETRETSLVWNYKYADVEFGRVQARDMLQHLWTGPI SNAVDVVQGGKRSVEVRSVGV	778
	*** * *****:*****:*** *****:*. : ** * **:*:*. :* . :			**.* * * :*:*****:*****:*****:*****:***** :***** **	
Solanum	YEEGDVVVCHDYHLMFLPKCLKDYNQMKVGVWFLHTFPFSSSEIHRTLPSRSELLRAVLA	285	Solanum	TKGAAIDRILGEIVHKSIAIATPIDYVLCIGHFLGKDEDVYTFPEPELSDCIGMPSKVS	825
Arabidopsis	YEEGDVVVCHDYHLMFLPKCLKEYNSKMKVGVWFLHTFPFSSSEIHRTLPSRSELLRSVLA	286	Arabidopsis	TKGAAIDRILGEIVHKSMTTPIDYVLCIGHFLGKDEDVYTFPEPELSDMPAARSRPS	825
Buğday	YQEGDVWCHDYHLMFLPRCLKEHDINMKVGVWFLHTFPFSSSEIYRTPSRSELLRSVLA	197	Buğday	TKGAAIDRILGEIVHKSMTTPIDYVLCIGHFLGKDEDIYVFFDPEYPSSE----PKVKP-	732
Selaginella	YQEGDVVWCHDYHLMFLPSYLKEKDSQMKVGVWFLHTFPFSSSEIYRTPSRSELLQGVLA	298	Selaginella	SKGSAIDRILGEIVHKSMTTPIDYVLCIGHFLSKDEDIYTFPEPELPLDR-----	830
	*:***:***** ** : :*****:*****:*** * :***:*. * :			:**:* *****:.. *****:*****:*****:*** * :***:*** *	
Solanum	DLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAPFPIGIDSERFIRALEVTQ	345	Solanum	---DAPKVPGERRSVPKLP-----SRTSSKSSQNRNRPVSN---SDKKT-----	865
Arabidopsis	DLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAPFPIGIDSDRFIRALEVPE	346	Arabidopsis	SDSGAKSSGDRRPPSKSTHNNKSGSKSSSSSNNNKSSQSRSLQSERKSGS-NHSLG	884
Buğday	DLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGKLTRVAAPFPIGIDSDRFKRALDIDA	257	Buğday	---DGASVSDRRQGRPSN-----GRSNRNSQARTQKQVAPPPPERSSSSSDHSTA	783
Selaginella	DLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGNTRVAAPFVPIGIDSERFIEAVETDA	358	Selaginella	---DSSTNSGGKPLGGKLPID-----RKSSKSSSRMKPPVSSPKSPGRGSEQ-----	875
	*****:*****:*****:*****:*****:*** * :**:			. . . : : . :.*	
Solanum	VQEHKELKERFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPOKILAFEKFELENENWRDKVLLQIAVPT	405	Solanum	NRRPSPENVSNNVLDLKKENYFSCAVG-RRTNARYLLSTPDDVVAFLRELAEAPISNG	924
Arabidopsis	VIQHMKELKERFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPOKILAFEKFELENANWRDKVLLQIAVPT	406	Arabidopsis	NSRRSPEKISWNVLDLKGNYFSCAVG-RRTNARYLLGSPDDVVCFLKADTTSSP-	942
Buğday	AKRHVNEKQRFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPOKILAFEKFELENPEWIDKVVLLQIAVPT	317	Buğday	NNSHHDWREGSVLLDNGDNYFSCAVG-RKRSNARYLLNSSEDVVSFLKEMAESTTPRA	842
Selaginella	VKKHMQELSQRFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPOKLLAFEKFELENSEWRDKVLLVQIAVPT	418	Selaginella	QQAEASRWEGSVLLDLQGENYFSCAVGTMKRSLARYCLTSSEVVFTLSTLSTVAAAA	935
	. .*:**:* *****:*****:***** * *****:*****			: . *****: ***** * : ** * * :*:** * * :* :*	
Solanum	RTDVPEYQKLTQVHEIVGRINGRFGTTLTAVPIHHLDRSLDFHALCALYAVTDVALVTSL	465	Solanum	TS-----	926
Arabidopsis	RTDVPEYQKLTQVHEIVGRINGRFGTTLTAVPIHHLDRSLDFHALCALYAVTDVALVTSL	466	Arabidopsis	-----	
Buğday	RTDVPEYQKLTQVHEIVGRINGRFGTTLTAVPIHHLDRSLDFHALCALYAVTDVALVTSL	377	Buğday	GGLPPGAADYMFLLDRQ-----	859
Selaginella	RTDVLEYPQKLTQVHEIVGRINGRFGSLTAVPIHHLDRSMKFPALCALYAITDVLVTSL	478	Selaginella	GAGAGARATGSGAAGAGAGAGAGAGDHEAPGSPIRKSDSFKTSGWHSPTPRSPKLAPAVQ	994
	*** *****:*****:*.*****: * *****:*** *****				
Solanum	RDGMNLVSYEFVACQELKKGVLILSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNI TEVAASIGQALNMS	525			
Arabidopsis	RDGMNLVSYEFVACQEAQKGVLLSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNI TEVAASIGQALNMT	526			
Buğday	RDGMNLVSYEYVACQSGKGVLLSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNI TEVADSJKHALTMT	437			
Selaginella	RDGMNLVSYEFVACQDKKGVLLSEFAGAAQSLGAGAILVNPWNI TEVAASIGQALNMP	538			
	*****:*** ** *****:*****:***:*** * : * **.* :				

4.2. Abiyotik stres koşullarında TPS geninin ifadesine bakılması

Bitkilerde yapılan çeşitli çalışmalarda trehaloz biyosentezi izyolundaki genlerin ışık, besin kaynağı ve abiyotik stres koşullarında ifadelerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Pamukta TPS geninin ifadesinin 16 saatlik kuraklık stresi uygulamasından sonra hem kök hem de yaprak dokusunda arttığı gözlenmiştir (Kosmas ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada, *Ginkgo biloba* bitkisine tuz, kuraklık ve soğuk stresi verilmiş ve yine TPS geninin ifadesinde artış olduğu görülmüştür (Wu ve ark., 2006). Her iki çalışmada da genin ifadesine RT-PZR ile bakılmıştır. Bu çalışmalar temel alınarak buğday TPS geninin ifadesine hem kök hem de yaprak dokusunda RT-PZR ile bakılmıştır. Proje Öneri Formunda belirtildiği gibi genin ifadesine bakmak için Northern Blot çalışmaları da yapılmıştır. TPS geninin ifadesi düşük olduğu için Northern Blot çalışmaları ile genin ifadesine bakılamayacağı görülmüştür. Literatürde de bitkilerde TPS geninin ifadesinin düşük olduğu belirtilmiştir (Blazquez ve ark.,1998). Buğday TPS geninin ifadesine bakmak için uygun olan yöntemin RT-PZR olduğu belirlenmiştir.

TPS geninin normal ve stres koşullarındaki –tuz ve kuraklık- ifadesine RT-PZR kullanılarak bakılmıştır. İlk aşamada genin bulunmuş cDNA dizisi kullanılarak 3 set primer tasarlanmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucu Şekil 1 de verilmiştir. Elde edilen ürünler saflaştırılarak dizi analizine gönderilmiştir. Primerlerin çoğalttıkları RT-PZR ürünler sırasıyla 511, 455 ve 638bp olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2.1 TPS geninin bir kısmını çoğaltmak için kullanılan primer setlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi

RT-PZR deneylerinde TPS geninin 455 bp'lık bölgesini çoğaltan primer çifti kullanılmıştır. Referans gen olarak ilk olarak tubulin kullanıldı. Bu genin tuz ve kuraklık stresi altında ifadesinde değişim olduğu gözlemlendiği için 18 S referans alınarak tuz ve kuraklık stresi altında TPS geninin ifadesindeki değişime kök ve gövde dokusunda bakılmıştır.

Kök dokusunda tuz ve kuraklık stresi altında TPS geninin ifadesine 1, 2, 4 ve 12 saat zaman noktalarında bakılmıştır. Şekil 4.2.1 de kuraklık stresi için %20 PEG uygulanmış buğday fidelerinin kök dokusundaki TPS geni için RT-PZR sonucu görülmektedir. Jel fotoğrafı "image J 1.39q" ile analiz edildiğinde kök dokusunda TPS geninin ifadesinin kuraklık stresi altında %16 arttığı bulunmuştur.



Şekil 4.2.2 Kuraklık stresi uygulanmış buğday fidelerinin kök dokusundaki TPS geninin ifadesindeki değişimi gösteren jel fotoğrafı (455 bp'lık PZR ürününü veren primer seti, 2. set kullanılmıştır)

Şekil 4.2.3 TPS geninin kök dokusundaki ifadesinin tuz stresi altında değişimi görülmektedir. Tuz stresi altında 1 saatin sonunda kök TPS geninin ifadesinde %100'lük bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.2.3 Tuz stresi uygulanmış buğday fidelerinin kök dokusundaki TPS geninin ifadesindeki değişimi gösteren jel fotoğrafı (455 bp'lık PZR ürününü veren primer seti, 2. set kullanılmıştır)

Yaprak dokusunda da tuz ve kuraklık stresi altında TPS geninin ifadesine bakıldı. TPS geninin ifadesinde herhangi bir değişime rastlanmadı. Yaprak dokusuna tuz ve kuraklık stresi altında TPS gen ifadesindeki değişimin stres süresinin uzatılarak görülebileceği düşünülmüştür.

Literatüre baktığımız zaman TPS geninin aşırı ifade edildiği transgenik bitkilerin tuz ve kuraklık stresine karşı dirençli hale geldiği görülmüştür (Holmström ve ark., 1996; Romero ve ark., 2001; Pilon-Smits ve ark., 1998; Almeida ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2005; Pellny ve ark., 2004; Jang ve ark., 2003; Garg ve ark., 2002; Yeo ve ark., 2000; Kwon ve ark., 2004; Avonce ve ark., 2004). Bu çalışmalar TPS geninin tuz ve kuraklık streslerinde rolü olabileceğini göstermektedir. Pamukta ve *Ginkgo biloba* bitkilerinde tuz ve kuraklık stresi altında genin ifadesinde artış da bu görüşü desteklemektedir (Kosmas ve ark., 2006; Wu ve ark., 2006). Bu çalışmada, kök dokusunda hem kuraklık hem de tuz stresinde TPS geninin ifadesinde artışa rastlanmıştır. Bu bulgular, literatürdeki verilerle paralellik göstermektedir.

5. SONUÇ

Proje Öneri formunda belirtilen Çalışma Takviminde belirtilen çalışmalar başarıyla tamamlanmıştır. Bu çalışmada, buğday TPS geni klonlanmış ve genin ifadesinin kök dokusunda tuz ve kuraklık stresi altında arttığı gösterilmiştir. Buğday TPS genine ait olan bu ilk çalışmanın, literatürde önemli bir boşluğu dolduracağı görülmektedir. Bu çalışma, buğday TPS geninin olası fonksiyonlarını araştırmaya yönelik sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- ALMEIDA A.M., Villalobos E., Araujo S.S, Leyman B., Van Dijck P., Alfaro-Cardoso L., Fevereiro S.P., Torne J.M., Santos D.M “Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses” *Euphytica* 146, 165–176 (2005).
- AVONCE N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G.. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6, 1-15, (2006).
- AVONCE, N., Leyman B., Mascorro-Gallardo O., van Dijck P., Thevelein J.M, Iturriaga, G. “The *Arabidopsis* Trehalose-6-phosphate synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid and stress signaling.” *Plant Physiol* 136, 3649–3659 (2004).
- BLAZQUEZ MA, Santos E, Flores CL, Martinez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C. “Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate Synthase” *The Plant Journal* 13, 685–690, (1998).
- CORTINA C., Culiáñez-Macià FA “Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis” *Plant Science*, 169, 75-82 (2005).
- CROWE J.H., Crowe L.M., Chapman D “Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms, the role of trehalose”, *Science* 223, 73–103, (1984).
- EL-BASHITI T., Hamamcı H., Öktem HA, Yücel M “Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions” *Plant Science*, 169, 47-54 (2005).
- ELBEIN A.D., “The metabolism of α,α -trehalose” *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30, 227–256, (1974).
- GARCIA A-B, de Almeida Engler J, Iyer S, Gerats T, Van Montagu M, Caplan AB. “Effects of osmoprotectants upon NaCl in rice”. *Plant Physiology* 115:159–169 (1997).
- GARG A.K. Kim J.-K, Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D, Kochian L.V. and Wu R.J., “Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance to different abiotic stress” *PNAS* 99, 15898–15903 (2002).
- HOLMSTRÖM, K.O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T. “Drought tolerance in tobacco” *Nature*, 379, 683-684 (1996).
- JANG IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK. “Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth” *Plant Physiol.* 131, 516-524 (2003).

- KOSMAS S.A., Argyrokastritis A., Loukas M.G., Eliopoulos E., Spyros Tsakas S., Kaltsikes P.J. “Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.)” *Planta* 223, 329–339, (2006).
- KWON, S.J., Hwang, E.W., Kwon, H.B. “Genetic Engineering of Drought Resistant Potato Plants by Co-introduction of Genes Encoding Trehalose-6-phosphate Synthase and Trehalose-6-phosphate Phosphatase of *Zygosaccharomyces rouxii*” *Korean Journal of Genetics* 26:199-206 (2004).
- LEYMAN B., Van Dijk P., Thevelein J.M., “An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*” *Trends in Plant Science* 6: 510–513 (2001).
- LUNN J. E. “Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants” *Functional Plant Biology*, 34, 550–563, (2007).
- PELLNY T.K., Ghannoum O., Conroy J.P., Schlupepmann H., Smeekens S., Andralojc J., Krause K.P., Goddijn O. and Paul, M. “Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis” *Plant Biotechnology Journal* 2, 71 - 82 (2004)
- PILON-SMITS A.H, N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. Van Dun, E. Voogd, T.C. Verwoerd, R.W.H.H. Krutwagen and O.J.M. Goddijn, “Trehalose-producing transgenic tobacco plants showed improved growth performance under drought stress”, *J. Plant Physiol.* 152, 525–532 (1998).
- ROESSNER U., C. Wagner, J. Kopka, R.N. Trethewey and L. Willmitzer “Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry” *Plant J.* 23, 131–142 (2000).
- ROMERO, J.M. Bellés, J.L. Vayá, R. Serrano and F.A. Culiáñez Macià, “Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance”, *Planta* 201 , 293–297 (2001).
- VOGEL G, Aeschbacher RA, Muller J, Boller T, Wiemken A “Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant”. *Plant J.* 13: 673-683 (1998).
- VOGEL G., Fiehn O., Bressel L. J, T. Boller, A. Wiemken, R.A. Aeschbacher and A. Wingler “Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues” *J. Exp. Bot.*, 52, 1817–1826, (2001).
- WU W., Pang Y., Shen G., Lu J., Lin J., Wang J., Sun X., Tang K. “Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Novel Trehalose-6-phosphate Synthase Homologue from *Ginkgo biloba*” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 158-166, (2006).

YEO E.T., Kwon H.B., Han S.E., Lee J.T., Ryu J.C. and Byu M.O. “Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Mol. Cells* 10, 263–268 (2000).

YU-JUN Wang, Yu-Jun Hao, Zhi-Gang Zhang, Tao Chen, Jin-Song Zhang and Shou-Yi Chen “Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells” *Journal of Plant Physiology*, 162, 215-223 (2005).

ZENTELLA R., Mascorro-Gallardo J.O., Van Dijck P., Folch-Mallol J, Bonini, B., Van Vaeck C., Gaxiola R., Covarrubias A.A., Nieto-Sotelo J., Thevelein J.M., Iturriaga G. “A *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-Phosphate Synthase Complements Growth and Stress-Tolerance Defects in a Yeast *tps1* Mutant” *Plant Physiology* 119, 1473–1482 (1999).

ZHANG S, Yang B, Feng C, Tang H “Genetic Transformation of Tobacco with the Trehalose Synthase Gene from *Grifola frondosa* Fr. Enhances the Resistance to Drought and Salt in Tobacco” *Journal of Integrative Plant Biology Formerly Acta Botanica Sinica*, 47, 579–587 (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: TOVAG 106O139
Proje Başlığı: Trehaloz-6-fosfat Sentaz Geninin Buğdaydan İzolasyonu ve Tuz ve Kuraklık Stresleri Altında Genin İfadesinin İncelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr Meral YÜCEL (Proje Yürütücüsü) Prof. Dr. Haluk HAMAMCI, Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM, Beray Gençsoy ÜNSAL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: O.D.T.Ü. Biyolojik Bilimler ODTÜ Biyolojik Bilimler 06531 Ankara/TÜRKİYE
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/06/2006 -01/06/2008
Öz (en çok 70 kelime) Bu projede buğday TPS genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra RT-PZR yöntemleri ile genin ifadesine normal ve tuz ve kuraklık stresleri altında bakılmıştır. Kök dokusunda tuz ve kuraklık stresleri altında genin ifadesinde artış gözlenmiştir. Literatürde, Buğday TPS genine ait henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, projede elde edilen veriler literatürde buğday TPS genine ait ilk moleküler çalışma örneğini oluşturmaktadır.
Anahtar Kelimeler: buğday, TPS, kuraklık, tuz stresi
Projeden Yapılan Yayınlar: ÜNSAL Beray Gençsoy, Hamamcı H., Öktem H.A., Yücel M. “Buğday Trehaloz-6-Fosfat (TPS) Geninin Belirlenmesi” 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Antalya/TÜRKİYE (2007) pp:93-95. Projedeki bulgular yayına hazırlanmaktadır. Bu proje Beray Gençsoy Ünsal’ın Doktora Tez çalışmasının bir kısmını kapsamaktadır.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: TOVAG 1060139
Proje Başlığı: Trehaloz-6-fosfat Sentaz Geninin Buğdaydan İzolasyonu ve Tuz ve Kuraklık Stresleri Altında Genin İfadesinin İncelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr Meral YÜCEL (Proje Yürütücüsü) Prof. Dr. Haluk HAMAMCI, Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM, Beray Gençsoy ÜNSAL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: O.D.T.Ü. Biyolojik Bilimler ODTÜ Biyolojik Bilimler 06531 Ankara/TÜRKİYE
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/06/2006 -01/06/2008
Öz (en çok 70 kelime) Bu projede buğday TPS genine ait tam uzunlukta cDNA dizisi RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra RT-PZR yöntemleri ile genin ifadesine normal ve tuz ve kuraklık stresleri altında bakılmıştır. Kök dokusunda tuz ve kuraklık stresleri altında genin ifadesinde artış gözlenmiştir. Literatürde, Buğday TPS genine ait henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, projede elde edilen veriler literatürde buğday TPS genine ait ilk moleküler çalışma örneğini oluşturmaktadır.
Anahtar Kelimeler: buğday, TPS, kuraklık, tuz stresi
Projeden Yapılan Yayınlar: ÜNSAL Beray Gençsoy, Hamamcı H., Öktem H.A., Yücel M. “Buğday Trehaloz-6-Fosfat (TPS) Geninin Belirlenmesi” 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Antalya/TÜRKİYE (2007) pp:93-95. Projedeki bulgular yayına hazırlanmaktadır. Bu proje Beray Gençsoy Ünsal’ın Doktora Tez çalışmasının bir kısmını kapsamaktadır.