

EK-1

Sitokinin Sentezlemesini Aşırı İfadeleyen Domates Bitkilerinde Kuraklık Stresine Karşı Toplam Yaprak ve Nükleer Proteom Tepkisi

Program Kodu:

Proje No: 114Z563

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Anne FRARY

ARALIK 2016
İZMİR

ÖNSÖZ

Sitokininlerin bitki biyolojisinde hücre bölünmesinin uyarılması ve kontrolü gibi çok önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Bu hormon moleküllerinin işlevlerini transkripsiyon faktörlerini kontrol ederek gen ifadelenmesini değiştirerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Yapılan yeni çalışmalarda sitkininlerin kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi stres koşullarına dirençte önem rol oynadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sitokininin biyosentezinde kilit önemdeki *IPT* (izopentenil transferaz) geninin kuraklık koşullarında stres koşullarına duyarlı SARK promotörü kontrolünde over-ekspresiyonunun kuraklıktan kaynaklanan bitki hasarını; yaprak yaşlanmasını geciktirerek minimuma indirdiği tespit edilmiştir. Sitokininler ile kuraklık stresine toleransın sağlanmasına ilişkin moleküler mekanizmaların anlaşılmasına ilişkin çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların çoğu diğer bitki hormonları, fotosentez ve oksidatif stres ile ilişkili gen ifadelenme düzeylerinin incelendiği ya da fotosentez verimliliği, stoma açıklığı, CO₂ emilim miktarları gibi fizyolojik değerlendirmelerin yapıldığı çalışmalardır. Sitokininlerin stres koşullarında bitki metabolizmasında asıl fonksiyonel işlev gören molekülleri olan proteinleri nasıl regüle ettiği ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Yalnızca C3 ot türlerinde sitokininler ile yüksek sıcaklık stresi koşullarında tolerans mekanizmaları yaprak toplam proteom düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca,, domates bitkisinde de sitokininlerin kuraklık koşullarına nasıl tolerans sağladığına dair herhangi bir proteomik çalışma da bulunmamaktadır. Domateste gerçekleştirilen tek çalışmada *IPT* geninin sıcaklıkla uyarılan HSP promotörü kontrolünde ifadelendiği ve tuzluluk stresi koşullarına direnç mekanizmalarının kök toplam proteomu seviyesinde incelendiği çalışmadır. Sitokininlerin kuraklık koşullarında yaprakta metabolizmayı protein düzeyinde nasıl regüle ettiği ve toleransı nasıl sağladığına dair domateste herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Özellikle sitokininlerin kuraklık stresi koşullarında nükleer proteomu ve en önemlisi de transkripsiyon faktörlerini nasıl regüle ederek tolerans sağladığına dair literatürde herhangi bir bitki türünde gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z563 nolu projemiz kapsamında kuraklık koşulları altında *IPT* genini SARK promotörü kontrolünde ifadeleyen transgenik bitkiler ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde yapılan LC-MS/MS proteomik analizlerinde toplam yaprak proteomunda ve yaprak nükleer toplamda farklı ifadelenen proteinler tanımlanmış ve quantifiye edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde kuraklık koşullarında yaprak toplam proteomunda 191, yaprak nükleer zenginleştirilmiş proteomunda ise 81 proteinin farklı ifadeleniği tespit edilmiştir. Sitokininler tarafından kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinler kuraklığa karşı direnç mekanizmalarında rol oynayan aday proteinler oldukları için büyük önem taşımaktadırlar. Özellikle tanımlanan farklı ifadelenen nükleus proteinleri gen ifadelenmesinin regülasyonunda önemli rol oynamaları nedeni ile büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar ile sitokininler sayesinde kuraklık stresi toleransında rol oynayan yaprak toplam proteomu ve nükleer zenginleştirilmiş yaprak proteomu incelenmiş ve sitokinin tarafından kuraklık koşullarında farklı regüle edilen proteinler ve onları kodlayan genler özellikle de transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Tanımlanan bu proteinler stres koşullarına direnç sağlanması için kullanılabilecek hedef genler olarak daha sonraki çalışmalarda kullanılabilecektir.

Bilimsel çıktılarının yanısıra, TÜBİTAK - ASCR İşbirliği programı kapsamında gerçekleştirilen bu proje ile Türk ve Çekya bilimadamları arasında işbirliği oluşturulmuş, bilgi ve uzmanlık paylaşımı gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında önerildiği şekilde transgenik bitkilerin geliştirilmesi, doğrulanması, fizyolojik ve verim açısından incelenmesi, kuraklık testlemeleri, proteomik analizler için örnek hazırlanması çalışmaları ve tanımlanan proteinler için veri analizleri Türk ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Çekya ekibi ise kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinlerin tanımlanması için gerekli LC-MS/MS proteomik analizlerini ve proteinlerin tanımlanması için biyoinformatik analizleri gerçekleştirmiştir. Proje sonuçlarının konu üzerinde Türkiye ve Çek Cumhuriyeti'nde yüksek lisans ve doktora yapmak isteyen genç araştırmacılara ve diğer domates biyoteknolog ve ıslahçılara yeni ufuklar açacaktır. Bu proje TÜBİTAK tarafından Prof. Dr. Anne Frary'ye sağlanan destekle yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1. Domates Transformasyonu	5
3.2. Transformant T0 bitkilerinin <i>IPT</i> geninin varlığı için doğrulanması	6
3.3. Transgen Kopya Sayısının Southern Blot ile Belirlenmesi	6
3.4. Transgenik T2 Bitkilerinin Elde Edilmesi	7
3.5. Zigotluk Düzeylerinin RT-QPCR ile Belirlenmesi	7
3.6. <i>IPT</i> mRNA İfade Düzeylerinin RT-QPCR ile Belirlenmesi	7
3.7. SARK::IPT Bitkilerinin Fizyolojik ve Verim Bakımından İncelenmesi	9
3.8. SARK::IPT Bitkilerinde Kuraklık Stresi Denemeleri	10
3.9. Rölatif Su Kullanım Verimliliği Testi	10
3.10. Yaprak Yaşlanma Testi	10
3.11. Yaşlanma Testi Öncesi ve Sonrası Klorofil a ve Klorofil b Ölçümleri	10
3.12. Malondialdehit ölçümleri	11
3.13. Yaprak Nükleus Zenginleştirilmesi ve Protein İzolasyonu	11
3.14. Yaprak Toplam Protein Ekstraksiyonu	12
3.15. Kalitatif Shotgun Proteomik Analizleri	12
3.16. Seçilmiş Metabolitlerin Analizi	13
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	13
4.1. T0 Bitkilerinin PCR ile <i>IPT</i> Geni Varlığı İçin Doğrulanması	13
4.2. Transgen Kopya Sayısının Southern Blot ile Belirlenmesi	14
4.3. Transgenik T2 Bitkilerinin Elde Edilmesi	15
4.4. Zigotluk Düzeylerinin RT-QPCR ile Belirlenmesi	16
4.5. <i>IPT</i> mRNA İfade Düzeylerinin RT-QPCR ile Belirlenmesi	18
4.6. SARK::IPT Bitkilerinin Fizyolojik ve Verim Bakımından İncelenmesi	23
4.7. SARK::IPT Bitkilerinde Kuraklık Stresi Denemeleri	25
4.8. Rölatif Su Kullanım Verimliliği Testi	28
4.9. Yaprak Yaşlanma Testi	29
4.10. Yaşlanma Testi Öncesi ve Sonrası Klorofil a ve Klorofil b Ölçümleri	29
4.11. Malondialdehit ölçümleri	31
4.12. Yaprak Nükleus Zenginleştirilmesi ve Protein İzolasyonu	31
4.13. Yaprak Toplam Protein Ekstraksiyonu	33
4.14. Kalitatif Shotgun Proteomik Analizleri	33
4.15. Seçilmiş Metabolitlerin Analizi	61
5. SONUÇLAR	
6. KAYNAKLAR	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RT-qPCR deneylerinde kullanılan primerlerinin dizi bilgileri	7
Tablo 2. Zigotluk düzeylerinin belirlenmesi için RT-qPCR sonuçları ve hesaplamaları	17
Tablo 3. Nükleer ekstraktan izole edilen proteinlerin konsatrasyonları	33
Tablo 4. Yaprak toplam protein ekstraktlarından konsatrasyonları	33
Tablo 5. Kontrol ve kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinler	34
Tablo 6. Yaprak nükleer proteomunda farklı ifadelenen proteinler	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Domates transformasyonunda kullanılan plasmid DNA'nın şematik gösterimi	5
Şekil 2. <i>SARK::IPT</i> geni için dört farklı primer çifti ile gerçekleştirilen PCR ürünleri	14
Şekil 3. DIG işaretli PCR ürünlerinin % 0.8 agaroz gel görüntüsü	15
Şekil 4. <i>SARK::IPT</i> ye özgün probalar ile işaretlenmiş Southern Blot sonuçları	15
Şekil 5. iptF2/iptR2 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları	16
Şekil 6. β -tubulin ve IPT_105-267 primerler için standart grafikler ve erime eğrileri	16
Şekil 7. T1 bitkilerinden izole edilen toplam RNA örneklerinin jel görüntüsü	18
Şekil 8. IPT_105-267, TIP 41, CAC, Ubiquitin ve Ribo L2 primerleri için RT-qPCR standart grafikleri	19
Şekil 9. IPT_105-267 (A), TIP 41 (B), CAC (C), Ubiquitin (D) ve Ribo L2 (E) primerleri için RT-qPCR erime eğrileri	20
Şekil 10. Test edilen T1-6 ve T1-19 hatlarında farklı dokularda IPT genin mRNA relatif ifadenme düzeyleri için kutu grafiği	23
Şekil 11. Ölçülen fenotipik ve verim karakterlerine ilişkin kutu grafikleri	24
Şekil 12. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 heterozigot transgenik bitkiler (sağ)	25
Şekil 13. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 homozigot transgenik bitkiler (sağ)	25
Şekil 14. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 heterozigot transgenik bitkiler (sağ)	26
Şekil 15. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sağ) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sol)	26
Şekil 16. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 heterozigot transgenik bitkiler (sağ)	26
Şekil 17. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 homozigot transgenik bitkiler (sağ)	27
Şekil 18. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 heterozigot transgenik bitkiler (sağ)	27
Şekil 19. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sağ)	27
Şekil 20. Transgenik ve transgenik olmayan bitkiler için rölatif su kullanım verimleri	28
Şekil 21. Transgenik olmayan kontrol (MM) ve transgenik T_19 hattından alınan 14 gün karanlıkta nemli filter kağıdı üzerinde bekletilen yaprakların fotoğrafları	29
Şekil 22. Yaprak yaşlanma testi öncesi ve sonrasında alınan örneklerden klorofil a ve klorofil b ölçüm sonuçları.	30
Şekil 23. Transgenik ve transgenik olmayan bitkilerde gerçekleştirilen malondialdehit ölçüm sonuçları	31
Şekil 24. Yaprak dokusundan izole edilen nükleer ekstraktın mikroskopik görüntüsü	32
Şekil 25. 2D Quant Kit protein standart grafiği.	32
Şekil 26. Yaprak toplam proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde GO sınıflandırmaları	51
Şekil 27. Yaprak nükleer zenginleştirilmiş proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde GO sınıflandırmaları	57
Şekil 28. Yaprak toplam ve yaprak nükleer zenginleştirilmiş proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde GO gen zenginleştirme analizleri	58
Şekil 29. Kalitatif olarak analiz edilen seçilmiş metabolitler için sonuçlar	61

ÖZET

Kuraklık stresi tarımsal bitkilerde ciddi verim ve kalite kayıplarına sebep olan, tarımsal üretimi kısıtlayan abiyotik stres koşullarındandır. Küresel ısınma ile kuraklık stresinin önümüzdeki yıllarda daha da kötüleşeceği öngörülmektedir. Tarımsal bitkilerin sürdürülebilir üretimi için abiyotik stres koşullarına tolerant bitkilerin geliştirilmesi gereklidir. Stres koşullarına tolerant bitkilerin geliştirilebilmesi için bitkilerin stres koşullarına cevap ve tolerans mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılması şarttır. Bitkilerin kuraklık stresine cevap ve tolerans mekanizmaları gerek fizyolojik gerekse moleküler düzeyde son derece karmaşık olup bitki gelişim düzeyi, bitki genetik altyapısı ve çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda kuraklık stresi koşullarında bitkilerde hormon düzeylerinde önemli değişiklikler olduğunu özellikle bitki metabolizmasında kilit rol oynayan sitokin düzeyinin azaldığı görülmüştür. Sitokinler bitki metabolizmasında hücre bölünmesinin uyarılması, organogenez ve meristem fonksiyonunun kontrolü ve doku yaşlanmasının geciktirilmesi gibi pek çok önemli rol oynayan hormonlardır. Son çalışmalarda kontrollü sitokin over-ekspresiyonunun kuraklık stresine toleransta önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu tip çalışmalara rağmen sitokinlerin kuraklık direncindeki moleküler mekanizmaları tam anlayamamıştır. Yapılan çalışmalarda kuraklık şartlarındaki fizyolojik ve transkriptomik değişimler incelenmiştir. Kuraklık stresi koşullarında sitokinler aracılığıyla metabolizmanın anahtar regülatörü olan transkripsiyon faktörlerinin ifadeleneceğinin proteomik düzeydeki değişimine dair çalışma bulunmamaktadır. Sitokinlerin domatestede kuraklık stresine toleransta oynadığı role dair bir çalışmada bulunmamaktadır. Bu amaçla, sitokin over-ekspresiyonu ile sağlanan kuraklık tolerans mekanizmalarını anlamak için sitokin biyosentetik yolağındaki kilit enzim olan isopentenil transferaz (*ipt*) enzimi stres koşullarında uyarılan SARK promotörü kontrolünde ifadelenen şekilde co-transformasyon yöntemi ile domates bitkilerine aktarılmıştır. Geliştirilen transgenik domates bitkileri kuraklık stresi testlemelerine alınmış ve fizyolojik ve biyokimyasal analizler ile incelenmiştir. Bu çalışmalarda *ipt* genini fazla ifadeleyen transgenik bitkilerin kuraklık koşullarında daha iyi performans gösterdikleri tespit edilmiştir. Yaprak toplam ve nükleer zenginleştirilmiş yaprak proteomu sitokin over-ekspresiyonu için *ipt* geni içeren bitkilerde ve kontrol bitkilerde kontrol ve kuraklık koşullarında incelenmiş ve bu koşullarda farklı ifadelenen proteinler shotgun proteomik yaklaşım ile tanımlanmıştır. *ipt* genini fazla ifadeleyen transgenik bitkiler ve kontrol bitkilerinde yapılan LC-MS/MS analizlerinde toplam 191 proteinin farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 191 proteinden 69'u hem transgenik hem de kontrol bitkilerde kuraklık koşullarında farklı ifadelendenmiştir. Bu proteinlerden 99'unun ise yalnızca transgenik hatta kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Farklı ifadelenen proteinler için yapılan GO gen zenginleştirme analizleri sonucunda kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinlerin en fazla abiyotik uyarılara tepki, sülfür bileşiklerinin metabolik işlemi ve protein katlanması ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Yine yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteomu çalışmaları ile kuraklık koşullarında transgenik bitkiler ve kontrol bitkilerinde LC-MS/MS analizlerinde toplamda 81 adet nükleus proteinin farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 81 proteinden 31'inin transgenik ve kontrol bitkilerde kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 81 proteinden 31'inin yalnızca transgenik hatta kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Farklı ifadelenen proteinler için yapılan GO gen zenginleştirme analizleri sonucunda kuraklıkta farklı ifadelenen proteinlerin en fazla nükleobaz içeren molekül taşınması, RNA metabolik işlemleri ve transkripsiyon ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kuraklık koşullarında farklı ifadelenen nükleer zenginleştirilmiş 81 proteinden 16'sinin transkripsiyon faktörleri olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, sitokini over-ekspres edilen domates bitkilerinde kuraklık stresi koşullarına dayanıklılıkta rol oynayan proteinler tanımlanmış, kuraklık stresine toleransta rol oynayan nükleer proteinler ve transkripsiyon faktörleri belirlenmiştir. Ayrıca, projenin uluslararası kapsamda yürütülmesi ile değişik uzmanlık alanlarına sahip Türk ve Çek bilim adamları arasında işbirliği sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Domates, sitokin, kuraklık, isopentenil transferaz, proteomik, nükleer proteom

ABSTRACT

Drought stress is responsible for significant quality and yield losses in agricultural plants and is the most damaging type of abiotic stress. It is expected that drought stress will be worsened by global warming in the coming years. Thus, it is necessary to develop plants that are resistant or tolerant to this stress in order to achieve sustainable agricultural production. To develop such plants, we must first understand the molecular mechanisms that are involved in the response and tolerance to drought stress. This is complicated by the fact that plant developmental stage, genetic make-up and environmental conditions are all involved in the plant's physiological and molecular responses to stress. Thus, any change in these factors can alter the plant's tolerance. According to research, plants under drought stress undergo significant changes in hormone levels. Of special importance is a drop in the level of cytokinin, a hormone with a key role in plant metabolism. Cytokinins have roles in many plant processes including cell division, organogenesis, meristem function and senescence. Previous work has shown that overexpression of cytokinin has an important role in conferring drought resistance to plants. However, despite this work, the molecular mechanism of how excess cytokinin confers tolerance is not understood. Previous research has mainly examined drought-induced changes in overexpressing plants at the physiological and transcriptomic levels. However, no research has studied the effect of overexpressed cytokinins and drought conditions on transcription factors at the proteomics level. Transcription factors are key regulators of plant metabolism and should be examined for a fuller understanding of the response to drought stress. In order to understand the role of cytokinin in drought tolerance more deeply, we transformed tomato plants with the isopentenyl transferase (*IPT*) gene driven by the SARK promoter. *IPT* is a key enzyme in cytokinin biosynthesis and the use of the SARK promoter allowed expression only under stress conditions. The transgenic tomato plants were placed under drought stress and analyzed for their physiological and biochemical responses. The *IPT*-overexpressing and control plants' total leaf and nuclear proteomes were examined under both control conditions and drought stress using a shot-gun approach. As a result of LC-MS/MS proteomics profiling, 191 proteins were identified to be differentially expressed in *IPT* overexpressing transgenic lines and non-transgenic control lines under drought stress conditions. From the 191 differentially regulated proteins, 69 were identified to be differentially regulated both in non-transgenic control lines and transgenic lines. In addition, 99 proteins were identified to be differentially regulated just in transgenic lines under drought conditions, which is more than the number differentially regulated in non-transgenic lines. As a result of GO gene over-representation tests, proteins related to abiotic stress stimulus, sulphur compound metabolic processes and protein folding were identified to be over-represented in our leaf total proteome data set. Based on studies using the leaf nuclear enriched proteome carried out via LC-MS/MS analysis, 81 proteins were identified to be differentially regulated in both transgenic and non-transgenic control lines. From these 81 proteins 31 were identified to be differentially regulated just in transgenic lines. Thus, more proteins (61) were differentially regulated in transgenic lines compared to non-transgenic lines. As a result of the GO gene enrichment analysis conducted with the leaf nuclear enriched proteome data set, proteins related to nucleobase containing molecule transport, RNA metabolic processes and transcription were identified to be enriched. Moreover of the 81 differentially regulated nuclear proteins, 16 were identified to be transcription factors, which have direct roles in gene regulation. In this way, proteins with roles in drought tolerance were identified, with a special focus on nuclear proteins including transcription factors with essential roles in plant growth and development. This international project also allowed collaboration of Turkish and Czech researcher scientists from different areas of specialization.

Keywords: Tomato, Cytokinin, Drought, Isopentenyl Transferaz, Proteomics, Nuclear Proteome

1. GİRİŞ

Kuraklık bitkilerde verim ve kalite kayıplarına sebep olan en önemli stres koşullarındandır. Geniş tarım arazileri kuraklık stresine maruz kalmakta, değişen iklim koşulları ile bu alanların daha da genişleyeceği tahmin edilmektedir. Özellikle domates gibi yüksek su ihtiyacına sahip olan bitkiler kuraklık stresine maruz kalmaktadır. Ülkemiz dünya üretim sıralamasında üçüncü sırada bulunmakta ve domates ülkemiz zirai ihraç ürünleri arasında birinci sırada bulunmaktadır. Ülkemiz için bu büyük ekonomik önemi sebebiyle sürekli üretimi için sözü edilen stres koşullarına dayanıklı türlerin geliştirilmesi şarttır. Ancak dayanıklı türlerin geliştirilmesi için bu stres koşullarına cevap ve tolerans mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılması gerekmektedir. Sitokininlerin bitkilerde kök ve sürgünlerdeki hücre bölünmesini uyardığı bilinmektedir. Kuraklık ve tuzluluk koşullarında büyümedeki azalma ve yaprak yaşlanmasındaki artış azalan sitokinin düzeyi ile ilişkilidir. Dahası sitokinin biyosentetik yolağında anahtar regülatör enzim olan izopentil transferaz (*IPT*) enziminin over-ekspresyonu bitkide sitokinin seviyesinin artmasına ve büyüme inhibisyonunu ve yaprak yaşlanmasını azaltarak kuraklığa karşı direnç sağladığı daha önce gösterilmiştir. Ancak sözkonusu direnç mekanizmaları tam olarak anlayılamamıştır. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışmada sitokinin biyosentezinde kilit öneme sahip *IPT* (izopentenil transferaz) geninin domates bitkisinde strese duyarlı SARK promotörü varlığında bitki seleksiyon markör içermeyecek şekilde over-ekspres eden transgenik domates genotipleri geliştirilmiştir. Stres koşullarında *IPT* geninin over-ekspres edildiği domates bitkileri kuraklık toleransları açısından fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar ile test edilmiştir. Ayrıca, domates bitkisinde kuraklık koşulları altında sitokininlerin proteomik düzeyde bu stres koşullarına karşı nasıl tolerans sağladıkları toplam yaprak ve yaprak nükleer proteomları incelenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda gösterildiği üzere bitki hormonları olan sitokininler etkilerini transkripsiyon faktörleri ile gen ifadeleneşini değiştirerek gerçekleştirirler. Bu nedenle domates bitkisinde kuraklık koşulları altında sitokininlerin nükleer proteomu nasıl kontrol ettiği ve özellikle bitki metabolizmasında büyük değişimlere sebep olan transkripsiyon faktörlerinin hangilerinin bu mekanizmalarda rol aldığı nükleer proteom analizleri ile anlayılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Domates (*Solanum lycopersicum*) besleyici önemi yüksek ve dünyada en çok tüketilen ikinci sebzedir. Ticari öneminin de dışında Solanaceae ailesine üye tarımsal bitkiler için bilimsel çalışmalarda model olarak da kullanılmaktadır. 2012 yılı rakamlarına göre 162 milyon ton ile dünyada en fazla üretilen tarımsal bitkilerdendir. Dünya için önemli bir ürün olmakla birlikte Türkiye için de büyük öneme sahiptir, şöyle ki Türkiye Çin, ABD ve Hindistan'ın ardından dördüncü büyük domates üreticisidir. 2012 yılı istatistiklerine göre Türkiye'de yılda 300000 ha alanda domates tarımı yapılmakta ve 11,3 milyon ton domates üretilmektedir (FAOSTAT, 2012). Ülkemizde gerek taze tüketim gerekse sanayilik domates çeşitleri yıl boyunca seralarda ve mevsimsel olarak da tarlalarda üretilmektedir. Üretilen domatesin çoğu yurt içinde tüketime sunulsa da, 2011 yılı istatistiklerine göre 432 milyon dolar değerinde 576573 ton domates yurtdışına ihraç edilmiştir (FAOSTAT, 2011). Domates ülkemizde diğer zirai ürünler içinde en yüksek ihraç oranlarına sahiptir (FAOSTAT, 2011) ve ihracatı da son üç yılda daha da artmıştır (USDA GAIN Report, 2009). Ekonomik öneminin yanında domates ülkemiz mutfağında da taze tüketilen tüm sebzelerin %70'ini oluşturmaktadır (USDA GAIN Report, 2009). Ekonomik ve besin değeri olarak önemi düşünüldüğünde sürdürülebilir üretimi zorunludur. Sürdürülebilir üretiminin mümkün olabilmesi için domates üretimini kısıtlayan biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklı ürünlerin mevcudiyeti hayati önem taşımaktadır. Domates en fazla suya ihtiyaç duyan tarımsal bitkilerdendir ve yetiştirilmesi esnasında düzenli sulamaya ihtiyaç duyar. Yüksek miktarda sulamaya ihtiyacı sebebiyle yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşulları domates üretiminde verimi ve kaliteyi sınırlayan en önemli çevresel faktörlerdir (Peet, 2005).

Kuraklık diğer bütün abiyotik stres koşullarının hepsinin toplamından daha fazla kayıplara sebep olmaktadır (Foolad, 2007). Dahası yapılan çalışmalarda, tarım arazilerin %45'inin su stresine (kuraklık ve tuzluluk stresleri) maruz kaldığı tespit edilmiştir (Tanji, 1990). Kuraklık stresi bitkilerde fotosentezin ve hücre bölünmesinin azalmasına ve yaprak yaşlanmasının artmasına böylelikle de verim ve kalite düşüşlerine sebep olmaktadır (Munns, 2008). Kuraklık stresine tepki ve tolerans mekanizmaları pek çok gen ile kontrol edilen ve kontrol edilemeyen çevre koşullarından etkilenen karmaşık fenomenlerdir (Vinocur vd., 2005). Ayrıca, bitkilerde stres toleransı bitki gelişim evrelerine özgü kontrol edilmektedir ve farklı gelişim evrelerindeki tolerans mekanizmaları birbirinden tamamen bağımsızdır (Fooland, 2007). Dolayısıyla kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmalarının geleneksel ıslah çalışmaları ile geliştirilmesi hem çok uzun zaman gerektirmesi hem de masraflı olması sebebiyle zordur. Bu nedenle, kuraklığa toleranslı bitkilerin geliştirilmesi için transgenik yöntemler ön plana çıkmaktadır. Kamuoyu endişelerine rağmen genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak yüksek verim ve kalitede tarımsal bitkilerin üretimi yeni bir çağ açmıştır. Genellikle antibiyotik ve herbisit direnç genleri olan bitki seçilim markör genlerinin kullanımı genetik mühendisliği ürünü bitkilere karşı çıkışların temel sebebidir. Çünkü bu antibiyotik ve herbisit direnç genlerinin doğaya yayılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Bitki seleksiyon markörlerinin kullanılmadığı, temiz gen teknolojileri sözü edilen riskleri ortadan kaldırmaktadır. Seleksiyon markörü kullanılmadan ya da sonradan markör genin uzaklaştırılmasını mümkün kılan; hedef genin markör gen içermeksizin aktarılması ve PCR taraması ile tespiti (Vetten vd., 2003), co-transformasyon (Komari vd., 1996) ve bölgeye özgü rekombinasyon (Gleave vd., 1999, Zubko vd., 2000) gibi bazı yöntemler geliştirilmiştir (Manimaran vd., 2011).

Bitkiler kuraklık streslerine karşı karmaşık cevap ve tolerans mekanizmalarına sahiptirler ve temel olarak bitki dokularında dehidratasyona sebep olmakta ve bu da hücre içinde çeşitli hasarlar gelişmesine sebep olmakta ve bitki metabolizması olumsuz olarak etkilenmektedir (Wang vd., 2003). Kuraklık stresi hücre içinde homeostazın ve iyon dağılımının bozulmasına neden olan osmotik strese sebep olur (Zhu, 2001). Dahası kuraklık stresi hücre membran lipidlerinde ve Ayrıca, hücrenin yapısal ve fonksiyonel proteinlerinin de yapısında hasara sebep olan oksidatif strese sebep olur (Smirnoff, 1998). Kuraklık stresi koşullarında hayatta kalmak için metabolizmanın değişen çevre koşullarına uyum sağlaması için ilk tepki olarak sinyal iletim yolları aktive olur (Zhu, 2002). Daha sonrasında ise biyokimyasal ve gen

ifadelenmesinde değişiklikler gerçekleşir ki bunlar da ikincil cevap unsurlarıdır. Bitkiler kuraklık stresini zararlı etkilerini tolere etmek için ozmo-protaktan moleküllerin ve bazı koruyucu proteinlerin (ısıl şok proteinleri, LEA vb.) sentezi ve hücre içinde biriktirilmesi; zararlı iyonların fazlalarının hücre dışına atılması için iyon pompası işlevi gören proteinlerin sentezi; reaktif oksijen moleküllerini (ROS) etkisizleştiren küçük moleküllerin ve enzimlerin sentezi gibi bazı biyokimyasal mekanizmaları aktive ederek kuraklık stresine karşı ikincil cevabı oluştururlar (Ashraf ve Akram, 2009). Bitkilerde yukarıda sözü edilen bu biyokimyasal değişiklikler temelde absisik asit (ABA) ve sitokinin (CKs) gibi hormonal değişikliklere bağlıdır (Davies ve Zhang, 1991), Bu hormonların seviyelerindeki değişiklikler bilinen ve bilinmeyen bazı transkripsiyon faktörlerinin (*CBF/DREB* ve *NF-Y*) aktive olmasına sebep olmakta, bunlar sayesinde de tolerans mekanizmalarında rol oynayan proteinler sentezlenebilmektedir ve bahsedilen biyokimyasal yollar aktive olabilmektedir (Nelson vd., 2007; Zhang vd., 2004).

Kuraklık stresi koşullarındaki bitki hormon düzeylerindeki değişikliklerin fotosentezin inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chaves, 1991). Yapılan çalışmalarda kuraklık koşullarında ABA seviyelerinin arttığı, sitokinin seviyelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir (Davies ve Zhang, 1991). Kuraklık koşullarında ABA seviyelerinin artışı stres duyarlı genlerin aktivasyonunda ve stomata açıklığının kontrolünde rol oynadığı tespit edilmiştir (Agrawal ve Jha, 2010). Azalan fotosentez hızının terleme ile su kaybını önlemek için stomatların geçirgenliğinin azalması ile CO₂ difüzyonunun azalmasına bağlı olduğu tespit edilmiştir (Munns, 2008). Ayrıca, ağır stres koşullarında fotosentez ile ilişkili proteinlerin yıkımının gerçekleştiği de belirlenmiştir (Tambussi vd., 2000). Tarımsal bitkilerde verim kaybının ana nedenlerinden birinin fotosentez hızındaki düşüş olduğu bilinmektedir. Dahası kuraklık ve tuzluluk stresi sebebiyle hormonal düzeylerindeki değişimler hızlanan yaşlanmayı izleyen sürgün büyümesinin azalmasıdır. Bu durumun da doğrudan sitokinin seviyelerindeki düşüş ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Divi vd., 2009). Sitokininler bitki büyüme ve gelişiminde çeşitli rollere sahip olan iso-prenoid ya da aromatik yan-zincirler içeren adenin türevi moleküllerdir (Mok ve Mok, 2001). Sitokininlerin daha çok sürgün ve köklerde mitotik aktivite, sürgün ve köklerde dallanma, yaprak yaşlanması gibi bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine etkileri olduğu bilinmekle birlikte yapılan yeni çalışmalarla çevresel stres koşullarına direnç mekanizmalarında da önemli rol oynadıkları belirlenmiştir (Arguesoet vd., 2009; Werner ve Schmölling, 2009). Dahası yapılan mikro-array çalışmalarında stres koşulları altında sitokinin sinyal yolağına ilişkin pek çok genin ifadelenmesinde değişiklik olduğu da tespit edilmiştir (Argueso vd., 2009). Ayrıca, yapılan çalışmalarda yaprak yaşlanmasının dışarıdan sitokinin muamelesi ile geciktirildiği rapor edilmiştir (Van Staden vd., 1983). Başka bir çalışmada ise yaprak yaşlanmasının ancak sitokinin miktarları belli bir seviyenin altına düştüğünde gözleendiği bildirilmiştir (Nooden vd., 1997). Sitokinin düzeylerinin belli bir düzeyin üzerinde tutulmasının yaşlılık ile ilişkili genlerin transkripsiyonel regülasyonunu inhibe ettiği böylelikle bitki çapında yaşlanmanın da engellendiği tespit edilmiştir (Gan ve Amasino, 1995). Ayrıca, yapılan çalışmalarda sitokinin biyosentez genleri olan izopentil transferaz (*IPT*) (Gan and Amasino 1995; Cowan vd., 2005; Rivero vd., 2007) ve zeatin O-glukoziltransferaz (*ZOG1*) (Dobrev vd., 2008) ile transforme edilen transgenik bitkilerde sitokininlerin over-ekspresyonunun yaprak yaşlanmasını geciktirerek kuraklığa karşı tolerans sağladığı rapor edilmiştir. Ancak sitokininlerin gelişim düzeyi ve doku gözetmeksizin *IPT* geninin sürekli (constitutive) over-ekspresyonunun bitkilerde bazı gelişimsel sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Pospisilova, 2003). Bu nedenle sitokininlerin *IPT* geni ile yalnızca stres koşullarında kontrollü bir şekilde over-ekspresyonunun bitkilerde kuraklığa direnç sağladığı anlaşılmaktadır. Ancak *IPT* geninin yaşlanmaya özgün promotör *SAG12*; (Gan ve Amasino, 1995) ya da olgunlukla uyarılan promotör *SARK* (Rivero vd., 2007) kontrolünde over-ekspresyonunun yaşlanmaya bağlı fotosentez hızı düşüşünü geciktirdiği, bu nedenle de yüksek sıcaklık (Xu vd., 2009) ve sınırlı sulama koşullarında (*SARK::IPT*; Rivero vd., 2007) yetiştirilen bitkilerdeki verim kayıplarını minimize ettiği belirlenmiştir.

IPT geni Arabidopsis, tütün, ot türleri, fıstık, domates ve pirinç bitkilerinde farklı promotörlerin kontrolünde over-ekspres edilmiş ve yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi farklı stres koşullarına karşı tolerans için testlemeleri gerçekleştirilmiştir (Rivero vd., 2007; Rivero vd.,

2010; Xu vd., 2008; Xu vd., 2009; Xu vd., 2010; Qin vd., 2011; Ghanem vd., 2011; Peleg vd., 2011; Merewitz vd., 2011; Zhang vd., 2010). Sözü edilen bu çalışmalar sonucunda, *IPT* geni ile sitokinin over-ekspresiyonunun kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi farklı stres koşullarına dirençte rol oynadığı belirlenmiştir. Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada *IPT* geni *SARK* promotörü kontrolünde tütünde over-ekspres edilmiştir ve transgenik bitkiler kuraklık stresi koşullarında oksidatif stres ile ilgili genlerin ifadenmesi, farklı dokularda sitokinin miktarları ve yaprak yaşlanması açılarından incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda *SARK::IPT* over-ekspresiyonunun kuraklık koşullarında yaprak yaşlanmasını geciktirdiği, fotosentez hızındaki düşüşü engellediği ve normal koşulların yalnızca %30'u kadar sulama yapılmasına rağmen bu geni ifadeleyen bitkilerin kontrol bitkileri kadar sağlıklı kaldıkları tespit edilmiştir (Rivero vd., 2007). Başka bir çalışmada ise kuraklık koşullarında *SARK::IPT* ifadenmesinin fotosentez mekanizmaları üzerindeki etkileri incelenmiştir (Rivero vd., 2009). Bu çalışmada ise fotosentetik parametreler, CO₂ asimilasyonu ve fotorespiratör yolak ile ilgili gen ifadenme düzeyleri incelenmiştir ve bitkide fotosentez ile ilgili proteinlerin yıkımının engellendiği ve incelenen yolaklarda gen ifadenmelerinde ciddi değişiklikler olduğu tespit edilmiştir (Rivero vd., 2009). Peleg vd. tarafından (2011) gerçekleştirilen çalışmada ise *IPT* geni yine *SARK* promotörü kontrolünde pirinç bitkisinde over-ekspres edilmiş ve kuraklık koşullarında transgenik bitkilerin anthesis öncesi ve sonrasında brassinosteroid ve jasmonate ile ilişkili genlerin ifadenme düzeyleri ve source/sink ilişkileri incelenmiştir. Bitkilerin kuraklık koşullarına direnç geliştirdiği ve kökleri tarafından mevcut suyu daha iyi kullandıkları tespit edilmiştir (Peleg vd., 2011). Diğer bir çalışmada ise *SARK::IPT* fıstıkta over-ekspres edilmiş ve kuraklık koşullarında transgenik bitkilerin fotosentez hızları, stoma geçirgenlikleri, solunum hızları gibi fenotipik özellikleri ve hem laboratuvar hem de tarla koşullarında verimleri incelenmiştir ve kuraklık koşullarına gerek laboratuvar gerekse tarla koşullarında direnç gözlenmiştir. (Qin vd., 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise *IPT* geni sıcaklıkla uyarılan HSP70 promotörü kontrolünde kök bölgelerinin sıcaklığı artırılarak yalnızca kök bölgesinde over-ekspres edilmiş ve tuzluluk stresine tolerans açısından incelenmiştir (Ghanem vd., 2011). Bu çalışmada transgenik bitkilerde dokulardaki sitokinin miktarları ve sitokininlerin kök ve sürgün dokuları arasındaki taşınımı; farklı dokulardaki Na ve K miktarları; fotokimyasal etkinlik; stoma geçirgenliği ve sürgünlerin rölatif büyüme hızları incelenmiştir ve incelenen parametreler açısından kuraklık direncini destekleyen bulgulara ulaşılmıştır. Diğer bir çalışmada ise sitokininlerin çok yıllık ot türleride sıcaklığa toleransa etki mekanizmaları proteomik açıdan incelenmiştir (Xu vd., 2010). Bu amaçla *IPT* geni SAG12 ve HSP18 promotörleri kontrolünde over-ekspres edilmiş ve bitkiler 35°C'de sıcaklık stresine maruz bırakılmış ve transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkileri arasındaki toplam proteome değişimleri incelenmiştir. Zang vd., (2010) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise *IPT* geni yaşlanma ile uyarılan SAG32 promotörü kontrolünde kasava bitkisinde ifadenmiş ve bitkilerin kuraklığa dirençleri gerek laboratuvar gerek tarla koşullarında yaprak yaşlanması, fotosentetik aktivite ve bitki büyüme hızı gibi fizyolojik karakterler ölçülerek test edilmiştir. *IPT* geninin kasava bitkisinde SAG32 promotörü kontrolünde over-ekspresiyonunun kuraklık koşullarına dirençte etkili olduğu tespit edilmiştir (Zang vd., 2010). Stres koşulları dışında sitokinin over-ekspresyonunun bitki metabolizmasını farklı gelişimsel düzeylerde nasıl etkilediği ve sitokininler tarafından kontrol edilen moleküler işlemlerin belirlenmesi için de *IPT* geni over-ekspres edilmiştir (Lochmanova vd., 2008; Liu vd., 2011; Černý vd., 2013). Lochmanova vd., (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sitokininlerin karanlıkta büyütülen *A. thaliana* filizleri üzerine etkisi proteomik yaklaşım ile incelenmiştir. Bu çalışmada *IPT* geni lahana mozaik virüsü 35S promotörü kontrolünde ifadenmiştir ve karanlıkta büyütülen transgenik ve transgenik olmayan *A. thaliana* filizlerinin toplam proteomları karşılaştırılmıştır (Lochmanova vd., 2008). Liu vd., (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *IPT* geni SAG-13 promotörü kontrolünde brokoli bitkisinde over-ekspres edilmiş ve sitokininlerin hasat sonrası yaşlanmaya etkileri proteomik yaklaşım ile çalışılmıştır ve antioksidant enzimlerin ve stres cevap proteinlerinin ifadenmesinin hasattan sonraki yaşlanmayı geciktirdiği tespit edilmiştir (Liu vd., 2011). Černý vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise sitokininlerin transgenik yaklaşımla over-ekspresyonunun (*35S::IPT* ekspresyonu) ve down-regülasyonunun (*35S::HvCKX2*) etkisi *A. thaliana* filizleri üzerindeki etkisi proteomik ve metabolomik yaklaşım ile çalışılmıştır. Bu

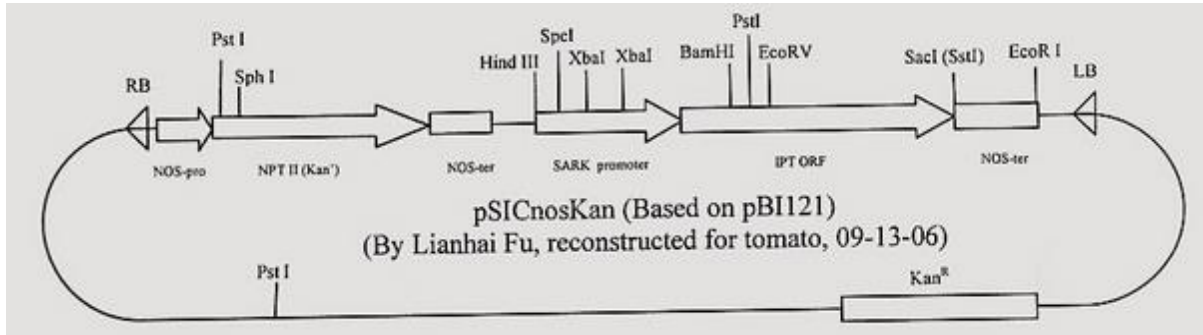
çalışma ile sitokinin aktitesinde rol oynayan daha önce tanımlanmamış olan ribozomal proteinler, redoks regülasyonunda ve hormon yollarında rol oynayan proteinlerin sitokinler tarafından regüle edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, sitokinin varlığında (over-ekspresiyon) ve yokluğunda (downregülasyon) amino asitler, karbohidratlar ve organik asitler gibi metabolitlerin de etkilendiği tespit edilmiştir (Cerny vd., 2013).

Sitokininlerin bitki metabolizmasını nasıl regüle ettiğine dair pek çok çalışma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen kuraklık stresi koşulları altında domateste gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Özellikle sitokininler tarafından regüle edilen ve bitki metabolizmasının kontrolünde rol alan ana faktörler olan nükleus proteinlerinin nasıl değiştiğine dair herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışma ile domateste sitokininlerin yaprak proteinlerini nasıl regüle ettiği ve kuraklığa tepki ile tolerans mekanizmalarının nasıl etkilendiğinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Tanımlanan aday proteinler ile ilgili daha ileri çalışmalar ile bu proteinleri kodlayan genler stres koşullarına dirençli bitkilerin geliştirilmesinde kullanımı mümkün olabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Domates Transformasyonu

Domates transformasyonu için kullanılan *IPT* (isopentenyl transferase) geni Prof. Dr. Eduardo Blumwald (University of California - Davis, ABD)'dan temin edilmiştir (Rivero vd., 2007). Sözü geçen *IPT* geni SARK promotörü ve nos terminatörü içermektedir. *IPT* geni için konstraktlar hali hazırda kanamisin seçici marker geni (*NPTII*) içeren pBI121 binary vektörü içinde bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. İlgili geni içeren ve domates transformasyonunda kullanılan plazmid DNA'nın şematik gösterimi.

IPT gen bölgesini içeren plazmid *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşuna ısı şok yöntemi ile transforme edilmiştir (Chung vd., 1989). Daha sonrasında transformant bakteriler domates kotiledonlarına *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı çalışmalarında kullanılmıştır (Frary vd., 2004). Domates transformasyonu Frary ve van Eck (2005) tarafından belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Domates tohumları öncelikle 70% etanolde 3 dk sonra da %10 çamaşır suyu çözeltisinde 10dk bekletilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra tohumlar steril distile su ile yıkanmış ve 1/2 MS0 besi yerine ekilmiştir. Tohumlar 25°C'de 16 saat ışık foto periyodunda tutuldukları büyütme kabininde çimlendirilmiştir. Çimlenen domates bitkileri 5-7 gün arasında çenekleri tamamen açılmasına rağmen henüz gerçek yaprak çıkartmadan transformasyon için kullanılmıştır. Laminar flow kabininde steril koşullarda bitkiler MS01/2 besi yerinden ayrılmış ve çenekler ikiye kesilerek bir günlük besleyici tabakanın üzerine yerleştirilmiştir. Besleyici tabaka KCMS katı besi yerinin üzerine eklenen 2 ml of tütün süspansiyon kültüründen oluşmaktadır ve süspansiyon kültürün üzerine 7 cm'lik Whatman filtresi yerleştirilmiştir. Çenek parçaları 25°C'de 16 saat ışık foto periyodunda bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında çenek parçaları bir gece boyunca büyütülmüş olan *IPT* gen bölgesini içeren plazmid ile transforme edilmiş *A. tumefaciens* ile muamele edilmiş ve 5 dk muameleden sonra, çenek parçalarının üzerindeki fazla sıvı steril filtre kağıdına emdirilmiştir ve besleyici besi yeri içeren plastik tabaklara geri konulmuştur. Çenek parçaları *Agrobacterium* ile 19°C'de 48 saat inkübe

edilmiştir. İnkübasyonun ardından çenek parçaları transforme olmuş hücrelerin seçilimi için kanamisin ve *A. tumefaciens*'in aşırı çoğalmasını engellemek için timentin içeren 2Z besi yerine aktarılmıştır. Seçici rejenerasyon esnasında kültürler 25°C'de 16 saat ışık foto periyodunda inkübe edilmiştir. 2Z besi yerinde inkübe edilen çenek parçalarından filizler oluşana kadar her üç haftada bir 1Z besi yeri yenilenmiştir. Rejenere olan bitki yeşil gövde aksamları yaklaşık 2 cm boya ulaştıklarında kesilmiş ve kesilen bitkiler kanamisin ve timentin içeren TRM besi yerine kök oluşumu için aktarılmıştır. Kök oluşumundan sonra bitkiler toprağa aktarılmış ve 2 hafta boyunca normal büyüme koşullarına alıştırmış ve büyük saksılara aktarılmıştır.

3.2. Elde Edilen Transformant T0 Bitkilerinin PCR ile IPT Geninin Varlığı İçin Doğrulanması

Elde edilen T0 transformant bitkilerde transgen varlığı öncelikle PCR yöntemi ile test edilmiştir. Bu amaçla toplam uzunluğu 1625 bp olan *SARK::IPT* dizisinde farklı bölgelere özgün olan 1.4, 0.6, 0.4, 0.2 ve 0.2 kb PCR ürünleri oluşturan primerler Batch primer 3 programı ile dizayn edilmiştir ve PCR deneylerinde kullanılmıştır. PCR çalışmalarında kullanılan olan genomik DNA'lar CTAB yöntemi ile izole edilmiştir (Stewart vd., 1993). Elde edilen genomik DNA'ların derişimi NanoDrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer). 2,5 µl PCR tamponu, 0.2 mM dNTPs, 50–100 ng genomik DNA, 0,2 µg/ul ileri ve geri primer ve 1U Taq DNA polimeraz içeren son hacmi 25 ul olan PCR reaksiyonları kurulmuştur. PCR programı olarak ise 95 °C'de 5 dk ön ısıtma sonrasında 95 °C'de 1 dk, 60 °C'de 1dk ve 72 °C'de 1dk'lik 30 döngü ve son olarak 72 °C'de 10dk'dan oluşan program ile PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. PCR deneylerinde transformasyon için kullanılan *SARK::IPT* gen bölgesinin içeren plazmid DNA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonrasında elde edilen PCR ürünleri %0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve etidyum bromür ile boyanan jeller jel görüntüleme cihazında (Biorad Doc XR) fotoğraflanmıştır.

3.3. T0 Transgenik Bitkilerinde Transgen Kopya Sayısının Southern Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

PCR ile transgenik olduğu belirlenen bitkilerdeki transgen varlığının ikinci bir yöntemle doğrulanması ve kopya sayısının belirlenmesi için Southern blot yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla DIG (digoxigenin) işaretli problemlerin sentezi için PCR DIG labelling (Roche) kiti üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Problemler *SARK::IPT*ye özgün 1.4 kb'lık PCR ürünü oluşturan pSARKIPT primer çifti, farklı seyreltme oranlarında DIG labelling karışımı ve kalıp DNA olarak da transformasyonda kullanılan *SARK::IPT* bölgesini içeren plazid DNA kullanılarak yukarıda anlatıldığı şekilde PCR reaksiyonları kurulmuştur. Sonrasında DIG işaretli problemler %0.8'lik agarose jel elektroforezinde yürütülmüştür ve DIG işaretli problemlerin sentezlendiği doğrulanmıştır.

Southern blot için 20 ug domates DNA'sı [daha önce PCR reaksiyonlarında pozitif sonuç alınan her bir T0 bitkisi için (T0_4, T0_6, T0_11 ve T0_19) DNA'lar ayrı olarak hazırlanmıştır (bu dört T0 bitkisi için DNA'lar havuzlanmamıştır)]. *EcoRI* (Fermentas) enzimi ile üreticinin talimatlarına göre kesilmiştir. Kesim reaksiyonundan sonra her bitki için DNA'lar fenol kloroform yöntemiyle temizlenmiş ve sonrasında 15 ul TE tamponunda çöktürülmüştür. Sonrasında kesilmiş olan DNA'lar %0.8'lik agaroz jelde yaklaşık 5 saat 40 V'ta yürütülmüştür. Sonrasında jel 30 dk denatürasyon tamponunda (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) bekletilmiştir. Daha sonra ise 30 dk (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) nötralizasyon tamponunda bekletilmiş ve 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate pH 7.0) tamponunda 10 dk boyunca equilibre edilmiştir. Jel pozitif yüklü naylon membrana 20 X SSC tamponu içerisinde bir gece boyunca bekletilerek kapiler blotlama yöntemi ile blotlanmıştır. Blotlama işleminden sonra membran kurutulmuş ve UV ışık altında 5 dk bekletilerek membrana çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama işleminin ardından DIG işaretli problemler ile hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentezlediğimiz DIG işaretli prob için hibridizasyon sıcaklığı " $T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - 600/l$ (l = hibritin base çifti biriminden uzunluğu) $T_{hyb} = T_m - (20^\circ \text{ to } 25^\circ \text{C})$ " formülü ile 42 °C olarak belirlenmiştir. Hibridizasyon ve immüno dedeksiyon işlemi DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre

gerçekleştirilmiştir. Son olarak ve NBT/BCIP ile boyanan membrane beyaz ışık altında (Biorad Doc XR) cihazında fotoğraflanmıştır.

3.4. Transgenik T2 Bitkilerinin Elde Edilmesi

PCR çalışması sonucunda *IPT* genini içerdiği belirlenen T0 bitkileri kontrollü sera koşullarında büyütülmüştür. Söz konusu T0 bitkileri kendilenerak T1 tohumları bu bitkilerden toplanmıştır. Daha sonrasında T1 tohumları sera koşullarında büyütülmüştür ve elde edilen bitkilerden DNA ekstraksiyonu yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında transgenik T1 bitkilerinin seçilmesi için iptF2/iptR2 primerleri kullanılarak PCR deneyleri daha önce açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. PCR pozitif olan domates bireyleri seçilmiş ve bu bireyler kendilenerak T2 tohumları elde edilmiştir.

3.5. Transgenik Bitkilerde Zigotluk Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemi ile Belirlenmesi

Serada büyütülen ve transgenik olduğu PCR ile belirlenen T2 bitkilerinden *SARK::IPT* için homozigot ve heterozigot (homozigot bitkilerin genomunda transgen için iki kopya, heterozigot bitkilerin genomunda 1 kopya) olan bitkiler RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir (Wang vd., 2005). Bu amaçla transgenik T2 bitkilerinden (PCR ile doğrulanan bitkiler) genomik DNA CTAB yöntemi ile izole edilmiştir. Homozigot ve heterozigot bitkilerin ayırt edilmesi için referans gen (β -tubulin) ve *SARK::IPT* ye özgün (IPT_105-267) RT-qPCR ürünleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ için iki kat fark görülmesi beklenmektedir. Bu amaçla referans gen (β -tubulin) ve *SARK::IPT*ye özgün (IPT_105-267) primerler için 30 ng genomik DNA, 5.05 μ l H₂O, 0.225 μ l 10 μ g/ μ l ileri ve geri primer ve 7.5 μ l Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermofisher) kullanılarak 15 ul'lik RT-qPCR reaksiyonları kurulmuştur. Hazırlanan reaksiyon karışımları Applied Biosystems StepOne RT-qPCR sistemi kullanılarak pre-inkübasyon, amplifikasyon, erime ve soğutma basamakları takip edilerek analiz edilmiştir. Referans gen (β -tubulin: 7.5;15; 30;60; 120 ve 240 ng domates genomik DNA'sı) ve *SARK::IPT*ye özgün (IPT_105-267: 7.5; 15; 30; 60; 120 ve 240ng plazmid DNA) primerler için farklı DNA konsantrasyonları için standart grafikler çizilmiş ve söz konusu primerlerin çalışma için uygunluğu test edilmiştir (elde edilen grafiklerin lineer olması (R^2 değerlerinin 1'e yakınlığı) ve PCR verimlerinin uygun olmaları sebebiyle). Ayrıca, referans gen ve *SARK::IPT*ye özgün primeler için erime eğrisi analizleri yapılmış ve söz konusu primerlerin tek ve spesifik ürün oluşturduğu teyit edilmiştir. Test edilen transgenik bitkilerin homozigot ya da heterozigot oldukları $\Delta\Delta Ct = Ct; IPT - Ct; \beta$ -tubulin_örnek 2 - _Ct; IPT -Ct; α -tubulin_örnek 1 ve 2 $\Delta\Delta Ct$ formülleri ile hesaplanmıştır. Böylelikle homozigot ve heterozigot transgenik olduğu belirlenen T2 bitkilerinden tohumlar saklanmıştır.

3.6. Transgenik T1 Bitkilerinin *IPT* mRNA İfadelenme Düzeylerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

IPT geninin mRNA düzeyinde ifadelenme oranlarının belirlenmesi için RT-qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle *IPT* genine özgün ve Sybr Green RT-qPCR yöntemine uygun primerler Thornton vd., (2011) tarafından belirtilen esaslar dikkate alınarak Primer3 programı ile dizayn edilmiştir (Tablo 2). Dizayn edilen primerler *IPT* genine özgünlükleri için test edilmiştir ve PCR koşulları optimize edilmiştir. Yine RT-qPCR çalışmalarında kullanılan referans genler olarak daha önceki çalışmalarda domates dokusunda stabil olarak ifadelenildiği tespit edilen "TIP41-like family protein" (*TIP41*), "Clathrin adaptor complexes medium subunit/Endocytic pathway" (CAC) (Expósito-Rodríguez vd. 2008), Ribosomal Protein *L2* (Lovdal ve Lillo, 2009) ve *Ubiquitin* (Fiorellini vd., 2009) genleri için primerler kullanılmıştır.

Tablo 1. RT-qPCR deneylerinde kullanılan primerlerinin dizi bilgileri

IPT_105-267	Primer Dizileri	Erime Sıcaklığı	Ürün Boyutu
İleri primer	GGCTTCCAGTCCTTTTCGCTT	63	162

Geri primer	GTCGTTCCCTTTTCAGTTCTTCCAC		
TIP41		TM	
İleri primer	ATGGAGTTTTTTGAGTCTTCTGC	60	235
Geri primer	GCTGCGTTTCTGGCTTAGG		
CAC		TM	
İleri primer	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	60	173
Geri primer	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG		
Ubiquitin		TM	
İleri primer	ACCAAGCCAAAGAAGATCAAGC	60	173
Geri primer	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG		
Ribosomal protein L2		TM	
İleri primer	GTCATCCTTTTCAGGTACAAGCA	60	156
Geri primer	CGTTACAAACAACAGCTCCTTC		

Serada büyütülen iki farklı T0 bitkisinden (T6 ve T19) gelen T1 bitkilerinden 200 mg yaprak (olgun ve genç yaprak dokuları) ve kök dokusu kullanılarak Qiagen RNeasy plant mini kit ile toplam RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (her bir hat için 4 farklı bitkiden ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir). RNA ekstraksiyonundan sonra RNA derişimi NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer) ile belirlenmiştir. Toplam RNA kalitesini değerlendirmek için 3'er ul RNA %0,8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Toplam RNA ekstraksiyonundan sonra elde edilen toplam RNA genomik DNA kontaminasyonunun uzaklaştırılması için DNase I (Life Technologies Ambion DNaseI Turbo Kit) enzimi ile muamele edilmiştir. Bu amaçla 10 ug toplam RNA 2U DNaseI ve 1x DNaseI reaksiyon tamponundan oluşan 50 ul'lik Dnase I reaksiyonu kurulmuştur ve reaksiyon 37 °C 30 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Dnase I fenol/kloroform ekstraksiyonu yöntemi ile temizlenen toplam RNA örneklerinden uzaklaştırılmıştır. Fenol kloroform ekstraksiyonu için 1/1 fenol kloroform karışımı eşit hacimde RNA örneğine eklenmiş ve 4 °C en yüksek hızda santrifüjden sonra üstte kalan sulu faz temiz bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen sulu fazın üzerine 1/10 hacim 3 M Na-asetat ve 2.5 hacim %100 EtOH eklendikten sonra 2 saat -20 °C'de inkübe edilmiştir ve sonrasında 4 °C en yüksek hızda 10 dk santrifüjlenerek RNA çöktürülmüştür. Sonrasında çökrülen RNA %70'lik EtOH ile üç kez yıkanmış ve 20 ul DEPC (Diethylpyrocarbonate) su içerisinde çözülmüştür.

Genomik DNA uzaklaştırıldıktan sonra RNA konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Daha sonrasında elde edilen bu toplam RNA örneklerinden cDNA sentezi Thermo RevertAidH Minus First Strand cDNA sentez kiti (Thermo) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez reaksiyonu kalıp olarak 1 ug toplam RNA ve anchored oligo(dT)₁₈ primerleri spesifik olarak mRNA dizilerini çoğaltmak için üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Bu amaçla 1 ug toplam RNA ve 50 pmol of anchored oligo(dT)₁₈ primerleri

kariştirilmiş, son hacim su ile 13 ul'ye tamamlanmıştır ve sonrasında bu karışım RNA ve primer dizilerinin denaturasyonu için 65°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Denaturasyondan sonra 4 ul reverse transkriptaz tamponu, 0.5 ul RNase inhibitörü, 0.5 ul reverse transkriptaz ve 2 ul deoksiniükletid karışımı eklenerek son reaksiyon hacmi 20 ul'ye tamamlandıktan sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için 50°C'de 60dk inkübe edilmiştir. Reverse transkripsiyon ile cDNA sentezlenmesinin ardından sentezlenen cDNA'lar 1/3, 1/12, 1/48 olacak şekilde üç farklı seyreltme yapılmıştır ve *IPT* genine özgü primerler (IPT_105-267) ile RT-qPCR reaksiyonları kurulmuştur. RT-qPCR reaksiyonlar için Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix kiti kullanılmıştır. 15 ul'lik RT-qPCR reaksiyonlarında 2 ul seyreltilmiş cDNA, 5.05 ul su, 0,225 ul 10 ug/ul ileri ve geri primer, 7.5 ul reaksiyon karışımı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyonlar Applied Biosystems StepOne PCR cihazı ile pre-inkübasyon, amplifikasyon, erime ve soğutma basamaklarından oluşan program ile analiz edilmiştir. Kullanılan seyreltmeler içerisinde 15 ve 35 arasında Cq değerleri elde edebilmek için 1/3 oranında seyreltme oranı çalışma boyunca kullanılmak üzere seçilmiştir. Hedef gen ve referans gen primerleri için 1/3, 1/12, 1/48, 1/96, 1/192, 1/768'lik oranlarda seyreltilmiş cDNA'lar kullanılarak reaksiyonlar kurulmuş ve standart grafikler hazırlanmıştır (Şekil 9). Her bir primer için standart grafikleri kullanılarak PCR verimlilikleri hesaplanmıştır (Applied Biosystems StepOne programı) ve verimlilikleri %85-110 arasında olan primler quantifikasyon için kullanılmıştır. Ayrıca, kullanılan primler için erime eğrisi analizleri yapılmış ve söz konusu primerlerin tek ve spesifik ürün oluşturduğu teyit edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak olan primerlerin uygunluğu test edildikten sonra test edilecek her bir örnek için ikişer tekrarlı olacak şekilde IPT_105-267, CAC, TIP 41, Ubiquitin ve Ribo L2 primerleri için RT-qPCR deneyleri yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonrasında her bir örnek için Cq değerleri StepOne™ System programı kullanılarak tespit edilmiştir. Daha sonrasında hedef gen (IPT_105-267) ve hedef gen ifadenme düzeylerinin normalizasyonu için referans genler (TIP 41, CAC, Ubiquitin ve Ribo L2) için belirlenen Cq değerleri kullanılarak *IPT* mRNA rölatif ifadenme düzeyleri qBase (<https://www.biogazelle.com/qbaseplus>) programı ile hesaplanmıştır (Hellemans vd., 2007). RT-qPCR deneyleri sonucunda T1-6 ve T1-19 transgenik hatlarında *IPT* geninin mRNA seviyesinde genç, olgun yaprak ve kök dokularındaki rölatif ifadenme düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar için iki faktörlü ANOVA analizleri R programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.7. Geliştirilen SARK::*IPT* Transgenik Bitkilerin Fizyolojik ve Verim Karakterleri Bakımından Değerlendirilmesi

Geliştirilen transgenik bitkilerin büyüme ve verim karakterlerinin belirlenmesi için transgenik (T6, T19 homozigot ve heterozigot hatlar) ve transgenik olmayan kontrol Moneymaker hatları hidroponik olarak taş yünü (rockwool) matrikslerde sera koşullarında büyütülmüştür. Homozigot bitkilerin elde edilmesi için daha önceki denemelerde homozigot olduğu RT-qPCR deneyleri ile doğrulanan bitkilerden elde edilen tohumlar kullanılırken heterozigot bitkilerin eldesi için ise heterozigot olduğu daha önceki RT-qPCR deneylerinde doğrulanan bitkilerden gelen tohumlar kullanılmıştır. Heterozigot bitkilerin belirlenmesi için çimlenen bitkiler geçen rapor döneminde anlatıldığı gibi RT-qPCR ile test edilmiş ve heterozigot olanlar seçilmiştir. Her bitki için 10 biyolojik replika kullanılmıştır. Domates tohumları taş yünü matrikslerin içine ekilmiş, üzerleri perlitte kapatılmıştır ve taş yünü matriksler domates fertigasyon solüsyonu ile sulanmıştır. İki hafta sonra 4 yapraklı hale gelen domates bitkileri geri kalan süre boyunca büyütülecekleri büyük taş yünü matrikslere yerleştirilmiştir. Bitkiler çiçeklendikten sonra her 4 günde bir açık çiçekler mekanik olarak tozlandırılmıştır. Deney boyunca bitki boyu, yaprak sayısı, meyve sayısı ve ağırlığı iki haftada bir kayıt edilmiştir. Deney toplamda 3 ay sürdürülmüştür ve deney sonunda toplam meyve ağırlığı, yaş ve kuru yaprak ağırlığı ölçülmüştür. Deneyler boyunca elde edilen verilerle transgenik (homozigot ve heterozigot T6 ve T19 hatları) ve transgenik olmayan Moneymaker hatları yaprak sayısı, toplam meyve ağırlığı, toplam meyve sayısı, bitki uzunluğu yaprak sayısı, yaprak yaş ağırlığı ve yaprak su miktarı ((yaprak yaş ağırlığı – yaprak kuru ağırlığı)/yaprak kuru ağırlığı) incelenmiştir. Her bir karakter için kutu grafikleri R programında ggplot2 paketi kullanılarak çizilmiştir (Şekil

12). Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek için Non-parametric Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Grafiklerde birbirinden istatistiksel olarak farklı olan gruplar farklı harflerle işaretlenmişken aynı olan aynı harflerle işaretlenmiştir.

3.8. Geliştirilen SARK::IPT Transgenik Bitkilerde Kuraklık Stresi Denemeleri

Fizyolojik karakterler ve verim değerlendirilmesi için yapılan denemelerde özellikle homozigot transgenik hatlarda fizyolojik karakterlerde istenmeyen değişimler gözlenmiştir. Özellikle bu değişimlerin çiçeklenme ve meyve tutma döneminde ağırlaştığı tespit edilmiştir. Literatürdeki bilgiler ışığında bu semptomların yüksek sitokinin sentezinden kaynaklandığı, Ayrıca, gerçekleştirilen bu projedeki denemelerde de homozigot bitkilerde söz konusu semptomları daha yoğun görülmeside yine *IPT* geninin kopya sayısından ötürü yüksek miktarlarda sentezlenmesi ve sitokinin miktarının çokluğuna işaret etmektedir. Literatürdeki çalışmalardan bilindiği üzere SARK promotörü olgun yaprak dokusunda aktivite göstermekte ve abiyotik stres koşulları ile daha da indüklenebilmektedir. Bu nedenle projede öngörülen kuraklık stresi testlemelerinde değişiklik (bitkilerin hidroponik olarak Hoagland solüsyonunda büyütülmüştür) yapılmıştır. Projede öngörülen testlemede bitkilerin perlitte çimlendirilip 2 hafta sonra köklerindeki perlitler temizlenerek Hoagland solüsyonu içeren kaplara aktarılması planlanmıştır. Ancak Hoagland solüsyonuna aktarma basamağı bitkiler için ek stres yaratacağı için (bu durum da SARK promotörünün indüklenip *IPT* ekspresyonunun artışına sebep olabileceği için) bitkilerin toprakta büyütülmesi uygun bulunmuştur. Bu amaçla tohumlar 1.5 L'lik deliksiz saksılarda önceden nemlendirilmiş ve her bir saksı için eşit olarak tartılmış topraklara ekilmiş ve nem kaybını önlemek için saksılar streç film ile kapatılmıştır. Tohumlar çimlendikten sonra streç filmde küçük delikler açılmıştır. Saksılar her hafta tartılarak saksıların ağırlıkları eşit olacak şekilde sulanmıştır. Bitkiler 6 hafta boyunca 25 °C'de %40 nem koşullarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olarak ayarlı büyütme kabinde büyütülmüştür. Altı hafta sonunda kontrol grubu bitkiler normal sulanırken stres grubu bitkiler kuraklık stresine maruz bırakmak amacıyla 2 hafta boyunca sulanmamıştır ve bu sürenin sonunda bitkilerin fotoğrafları çekilip proteomik analizlerde kullanılacak doku hasat edilip sıvı azotta dondurulup -80 °C'de saklanmıştır. Deney T6 ile T19 homozigot ve heterozigot hatlar ile transgenik olmayan MoneyMaker hatlarından 40'ar adet tohum ile başlatılmıştır. Homozigot hatların eldesi için daha önce homozigot olduğu RT-qPCR ile doğrulanmış bitkilerden alınan tohumlar kullanılmıştır. Heterozigot bitkilerin seçilmesi için ise yine daha önceki deneylerde RT-qPCR ile heterozigot olduğu doğrulanmış bitkilerden alınan tohumlar kullanılmış ve çimlenen bitkilerden homozigot olanlar yine RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Deneyde her uygulama (kontrol ve kuraklık stresi) ve her bir hat için (MoneyMaker, T6 homozigot, t6 heterozigot, T19 homozigot, T19 heterozigot) olmak üzere 4 er biyolojik replika kullanılmıştır.

3.9. Kuraklık Stresi ve Kontrol Koşullarında Rölatif Su Kullanım Verimliliği testi

Kuraklık testleri süresince bitkiler sürekli tartılarak ağırlıkları eşit olacak şekilde sulanmış ve buharlaşma ile topraktan su kaşını önleyecek şekilde saksıların üzeri streç film ile kapalı olacak şekilde bitkiler büyütülmüştür. Kuraklık stresine maruz kalan ve kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol ve transgenik bitkiler için ölçülen toplam su kullanım miktarları ve deney sonucunda ölçülen toplam bitki biyokütlesi kullanılarak $RSKV = \frac{\text{toplam biyokütle}}{\text{toplam su kullanımı}}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Sharma ve ark., 2015)

3.10. Yaprak Yaşlanma Testi

Yaprakların yaşlanma belirtileri açısından değerlendirmesi için yaprak yaşlanma testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için transgenik olmayan kontrol ve transgenik T_19 bitkilerinin olgun yaprakları koparılmış petri kutuları içindeki nemlendirilmiş filtre kağıtlarının üzerine yerleştirilmiş ve 20° C karanlıkta 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Anlatılan şekilde inkübe edilen yaprakların 14 gün sonra fotoğrafları çekilmiştir.

3.11. Yaşlanma Testi Öncesi ve Sonrası Klorofil a ve Klorofil b Ölçümleri

Yaşlanma testi öncesi ve sonrasında her bir örnekten dörder replika olacak şekilde yaprak örnekleri alınmıştır. Klorofil ölçümleri Warren (2008) tarafından tanımlanan yöntemle göre

spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50 mg yaprak örneği TissueLyser (Qiagen) ile homojenize edilmiş ve üzerine 1 ml %100 metanol eklenerek vorteks edilmiştir. Elde edilen süspansiyon santrifüj edilmiş ve süpernatanttan 100 ml mikroplak okuyucu spektrofotometre plakalarına pipetlenmiştir ve üzerlerine 100 ml daha saf metanol eklenmiş ve vorteklenerek 665 ve 652 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Klorofil a ve b miktarları sırası ile $Chl\ a\ (\mu g/mL) = -8.0962 A_{652,1\ cm} + 16.5169 A_{665,1\ cm}$ ve $Chl\ b\ (\mu g/mL) = 27.4405 A_{652,1\ cm} - 12.1688 A_{665,1\ cm}$ formülleri ile hesaplanmıştır.

3.12. Malondialdehit ölçümleri

Kuraklık stresine maruz bırakılan ve kontrol koşullarında büyütülen bitkilerden alınan yaprak örneklerinden Heath ve Packer (1968) tarafından tanımlanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. 100'er mg yaprak dokusu TissueLyser ile homojenize edilmiş ve üzerine %10'luk TCA içerisinde hazırlanan %0.25'lik TBA solüsyonundan 1.5 ml eklenmiştir. Örnekler 95 °C'de 30 dk bekletilmiş ve sonrasında santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatanttan 200 ul mikroplak okuyucu spektrofotometre tabakalarına pipetlenmiştir ve vorteksenerek 532 ve 600 nm'de absorbansları ölçülmüştür. MDA-TBA kompleksi miktarı $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ olan molar ekstiksiyon katsayısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.13. Yaprak Nükleus Zenginleştirilmesi ve Protein İzolasyonu

Proteomik çalışmalarda kullanılmak üzere nükleus proteinlerinin zenginleştirilip izolasyonun yapılabilmesi için öncelikle nükleus izolasyonu için yöntem optimize edilmiştir. Bu amaçla Sikorskaite vd., (2013) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek nükleus ekstraksiyon çalışmaları için kullanılmıştır. Bu amaçla 5g dondurulmuş (-80 °C'de saklanan) yaprak dokusu politrone homojenizatörde 40 ml nükleus izolasyon tamponu (4 mM MES-KOH, 4 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1mM DTT, 1 mM PMSF pH 5.4, % 0.5 triton X-100) içerisinde soğuk koşullarda homojenize edilmiş ve soğuk koşullarda 20 dk çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Homojenat 4 katlı miracloth filtre kağıdından süzülmüş ve 15 dk daha çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında homojenat 4 °C'de 1000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Hücre debrisi, diğer organeller ve nükleusu içeren pelletin en üst kısmı (pelletin kloroplast açısından zengin kısmı) nükleus 2.5 ml izolasyon tamponu ile yıkanarak nazikçe uzaklaştırılmıştır ve pelletin geri kalan kısmı (tüpün dibine yakın beyaz pellet) 10 ml nükleus izolasyon tamponunda çözülerek son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde %10'luk triton X-100 tamponundan eklenmiştir. Elde edilen süspansiyon soğuk koşullarda 10dk çalkalamalı inkübatörde bekletilmiş ve 4 °C'de 1000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pellet çöktürüldükten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 5 ml nükleus ekstraksiyon tamponunda çözülmüştür. Çözülen pellet 2.5 M sükröz ve %60 percoll gradientinin üzerine gradienti bozmayacak şekilde eklenmiş ve 4 °C'de 1000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Nükleusları ve bir miktar kloroplast ve hücre debrisini içeren 2.5 M sükröz fazı diğer fazlardan ayrılmış ve 5 hacim nükleus izolasyon tamponu ile seyreltilerek 4 °C'de 1000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 2 ml nükleus izolasyon tamponu ile yıkanıp 4 °C'de 1000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve bu işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son olarak süpernatant uzaklaştırılıp nükleer pellet elde edilmiştir. Elde edilen nükleer pellet nükleus saklama tamponunda çözülmüş (20mM HEPES, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, %20 gliserol, %0.1 proteaz inhibitör kokteyli (Sigma), pH 7.2) ve -80 °C'de saklanmıştır. Elde edilen ekstraktta nükleus saflığı ve bütünlüğünü test etmek için izole edilen ekstrakt nükleusa spesifik boya DAPI ile boyanarak floresans mikroskop ile görüntülenmiştir.

Nükleer protein ekstraksiyonu için TriPure (Roche) izolasyon kimyasalı kullanılmıştır. Bu amaçla elde edilen nükleus 1 ml TriPure solüsyonu içinde pipetleme yapılarak çözülmüş ve ardından sonik banyoda oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında TriPure solüsyonunun üzerine 200 ul kloform eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk boyunca çalkalandıktan sonra 12000 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonrasında proteinleri içeren organik faz temiz bir tüpe ayrılmış ve proteinlerin çöktürülmesi için soğuk %100 izopropanol eklenmiştir ve -20 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında proteinlerin çöktürülmesi için 12000 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen protein pelleti 1 ml %95 EtOH'da hazırlanmış 0.3 M guanidyum HCl solüsyonuyla yıkanmıştır ve 12000 g'de 4 °C'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Yıkama basamağı iki kere daha tekrar edilmiştir ve son olarak pellet %100 aseton ile yıkanmıştır. Yıkama basamaklarının ardından pellet oda koşullarında kurutulmuş ve sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır. Elde edilen protein pelletleri rehidrasyon tamponunda (100mM tris, 8M urea, 1% DTT) çözülmüş ve protein konsantrasyonları 2D quant kit ile (GE Lifesciences) üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. Yöntem için hazırlanan standart grafiğine göre konsantrasyonu bilinmeyen protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.14. Yaprak Toplam Protein Ekstraksiyonu

Yaprak toplam protein ekstraksiyonu, kontrol MoneyMaker ile homozigot T_19 transgenik hatlarından kontrol ve kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerden toplanan yapraklarda gerçekleştirilmiştir. Protein ekstraksiyonu phenol protein ekstraksiyonu yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Carpentier vd., 2005). Bu amaçla 150 mg yaprak dokusu sıvı azot varlığında metal boncuklar ile 30 saniye TissueLyser II (Qiagen) ile homojenize edilmiştir. Toz haline getirilen yaprak örneklerinin üzerine 750 ul ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.1 % DTT, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, % 0.1 proteaz inhibitörü kokteyli (Sigma) eklenerek hızlıca karıştırılmıştır ve sonrasında eşit miktarda tris ile tamponlanmış fenol eklenmiş ve 4 °C'de 15 dk çalkalanmıştır. Sonrasında karışım 12000 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek fenol fazı yeni tüplere ayrılmıştır. Fenol fazlarının üzerine eşit hacimde ekstraksiyon tamponu eklenerek 4 °C'de 10 dk çalkalanmıştır ve 12000 g'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında fenol fazı tekrar yeni tüpe ayrılmış ve üzerine 4 hacim olacak şekilde çöktürme solüsyonu (MetOH'ta 100mM amonyum asetat) eklenmiştir ve karışım 1 gece -20 °C'de proteinlerin çökmesi için bekletilmiştir. Protein çökeltilerinin olduğu solüsyonlar 12000 g'de 4 °C'de 30 dk santrifüjlenmiş ve %0.2 DTT içeren soğuk aseton çözeltisi ile 3 kez yıkandıktan sonra oda koşullarında kurutulmuştur. Kurutulan protein pelletleri protein rehidrasyon tamponu (100mM tris, 8M urea, 1% DTT) içerisinde çözülmüş ve protein konsantrasyonu 2D-Quant Kit (GE Lifesciences) ile üreticinin talimatlarına göre belirlenmiştir. Tablo 4'de her bir örnek için hesaplanan protein konsantrasyonları gösterilmiştir.

3.15. Kalitatif Proteomik Shotgun Proteomik Analizleri

Proje baaşvurusunda A planı olarak yaprak toplam ve nükleer zenginleştirilmiş proteome analizleri için 2D-PAGE yöntemi ile proteinlerin ayrılacağı ve sonrasında, spot büyüklüklerine bakılarak farklı ifadelenen proteinlerin kütle spektrometrisi ile tanımlanacağı belirtilmişti. Ancak 2D-PAGE protein analizleri için yüksek miktarda örneğe ihtiyaç olunması (en az 400 mg saflaştırılmış yüksek kaliteli protein örneği) ve yaprak nükleer zenginleştirilmiş protein örneklerinin miktarlarının düşük olması (50 mg civarında) sebebiyle, 2D-PAGE protein analizlerinden vargeçilmiştir. LC-MS/MS protein profillemesi gerek proteinleri ayırma gücü gerekse kompleks proteomda az görülen protein türlerinin de tanımlanabilmesini mümkün kılan hassiyete sahip bir yöntem olması açısından yapılacak deneylerde tercih edilmiştir.

LC-MS/MS ile proteinlerin ayrılması ve tanımlanabilmesi için öncelikle proteinler tripsin proteolitik enzimi ile aşağıda anlatılan şekilde peptitlerine parçalanmıştır. Yukarıda anlatıldığı şekilde izole edilen toplam yaprak proteinlerinden 200 ug alınarak solüsyon içinde parçalama yöntemi ile triptik peptitlerine ayrılmıştır. Bu amaçla protein solüsyonu son konsantrasyonu 0.02 M olacak şekilde 0.2 M DTT solüsyonun seyreltilmiş ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında 0.5 M IAA (iodo asetat) solüsyonu ile son konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde seyreltilmiştir ve oda sıcaklığında 30 dk alkilasyon için inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra solüsyon son konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde 0.5 M amonyum bikarbonat çözeltisi ve 2 ug tripsin eklenerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Parçalanmış proteinleri içeren karışım LC-MS/MS analizi öncesi C18 Spin Colonu (Pierce) ile tuzlarından arındırılmıştır. Elde edilen solüsyon vakum evaporatörde tamamen kurutulmuş ve peptitler 20 ml % 4 asetonitril ve % 0.1 formik asit solüsyonunda çözülmüştür.

Kalitatif proteomik analizler jelsiz non-HPLC ve MS/MS analizine dayalı shotgun proteomik protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Černý vd., 2013; Baldrianová vd., 2015). Çalışmalarda

LC-MS/MS analizleri Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-UPLC sistemi ile bağı (Thermo) CaptiveSpray nanoESI source (Bruker) ile bağı UHR maXis impact q-TOF Bruker kütle spektrometrisi ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada uygulanan yöntem optimizasyon çalışmalarında en yoğun toplam iyon kromatogramları ve spektral ayırım 40 cm uzunluğundaki C18 ters faz (Zorbax nanocolumn 0.1 mm inner diameter; Agilent) UPLC kolon ile 180 dk'lık asetonitril gradineti (%4-80 arasında) ile elüsyon ve 1.5 ul enjeksiyon hacimlerinde gözlemlendiğinden deneylere aynı ayırma koşullarında devam edilmiştir. Spektrumlar MS spectrumu başına 2 Hz'de toplanmış. MS/MS için spektrumlar ise 10-20 Hz arasında toplam döngü süresi 7 saniye olacak şekilde toplanmıştır. MS/MS veriye bağımlı ölçüm sonuçları Bruker Data Analysis programı ile işlenmiştir ve sonrasında elde edilen MS/MS spektrumlarından peptitlerin tanımlanması (her protein için yüksek doğrulukla tanımlanmış $p < 0.05$ olan farklı peptitler) ve bunlardan da proteinlerin tanımlanması için veritabanı taramasına bağı yöntem ile (veritabanı arama kriterleri: tripsin; değışken modifikasyonlar-metiyonin oksidasyonu, NQ deaminasyonu, asetilasyonu ve N-terminalde E/Q dan pyro-Glu değışimi; ST fosforilasyonu; peptit toleransı 35 ppm; tek hatalı kesime izin ve - 0.1 Da MS/MS toleransı) Thermo's Proteome Discoverer 2.0 (target FDR<1%) ve Maxquant programları kullanılmıştır. Kantitatif farkların bulunması için ise spektral sayım yöntemi kullanılmıştır (Černý vd., 2013). Söz konusu analizler sonucunda elde edilen aday proteinler sonrasında hedefe yönelik proteomik analiz için SRM (seçilmiş reaksiyon izleme) yöntemi ile Thermo TSQ Quantiva kütle spektrometri cihazı ile analiz edilmiş (en yüksek skorlu stransitionlar için Q1 ve Q3 çözünürlüğü 0.7 Da, döngü süresi <4 saniye) veri analizleri ise Skyline 3.1 (MacCossLab Software, <https://skyline.gs.washington.edu>) programı ile gerçekleştirilmiştir.

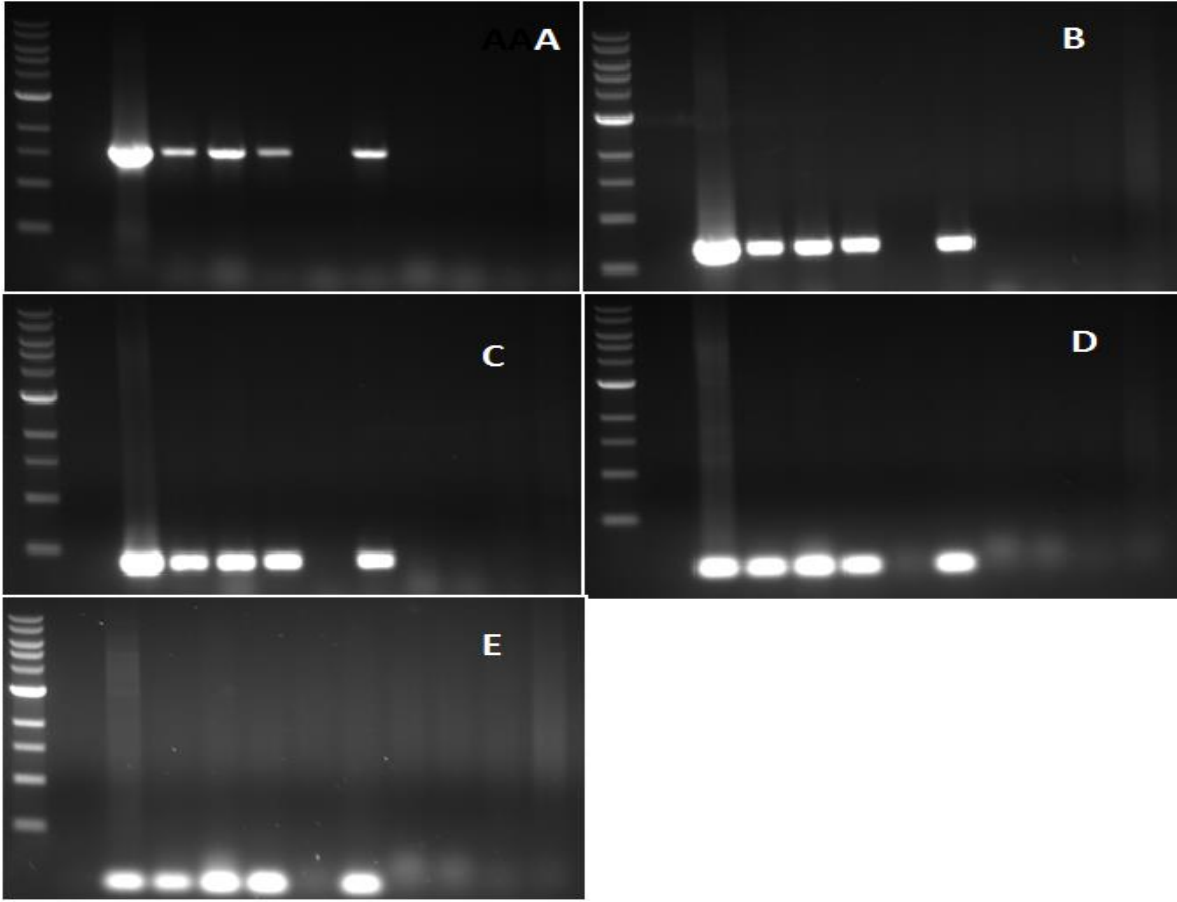
3.16. Seçilmiş Metabolitlerin Analizi

Bazı amino asitler ve bazı organik asitler Thiele vd., (2012) tarafından geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla 150 mg yaprak dokusu sıvı azot varlığında Qiagene TissueLyzer cihazı ile homojenize edilmiştir ve 0.5ml %50 etanolde hazırlanmış 50 mM HCl içinde çözülmüştür ve 4 °C'de 5 dk karıştırılarak inkübe edilmiştir. Söz konusu karışım 12000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüjlenmiştir ve oluşan süpernatant Millipore Ultrafree-CL mikro santrifüj filtre ile temizlenmiştir. Her örnek grubu için iki biyolojik üç de teknik replika olacak şekilde analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 15 cm Luna SCX kolona (2 mm inner diameter; Phenomenax, www.phenomenex.com) bağı Thermo TSQ Quantiva triple kuadropole kütle spektrosu ile analiz edilmiştir. Kalitatif analizler için MS profilleri DataAnalysis 4.1, ProfileAnalysis 2.1 ve Skyline 3.1 programları kullanılarak analiz edilmiştir. Test edilen örnek grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunup bulunmadığının anlaşılması için tek yönlü ANOVA ve Tukey's HSD test analizler R programı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Elde Edilen Transformant T0 Bitkilerinin PCR ile IPT Geninin Varlığı İçin Doğrulanması

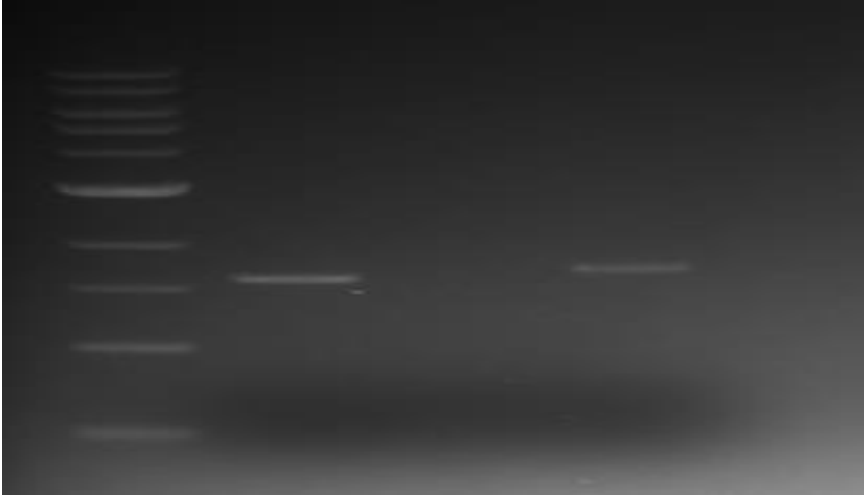
Transformasyon çalışmaları ve transgen içeren bitkilerin doğrulanması için gerçekleştirilen çalışmalar boyunca dört farklı zamanda yaklaşık olarak 200 domates bitkisi ekilmiş ve bunlardan oluşan kotiledonlar transformasyon için kullanılmıştır. Transformasyon esnasında 35 bitki rejenere edilmiş ve farklı zamanlarda yapılan PCR testleri ile transgenik bitkiler tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerin tespit edilmesi için yapılan testlemelerde *SARK::IPT* DNA'sına özgün 5 farklı PCR primeri kullanılmıştır. Bu PCR primerlerinden "PSARKIPT" toplam uzunluğu 1625 bp olan *SARK::IPT* bölgesinin yaklaşık 1400bp kısmını çoğaltan ürün oluşturmaktadır (Şekil 2-A). Transformasyon sonunda toplamda 6 adet pozitif transformant T0 bitkisi elde edilmiştir. Şekil 2'de 4 transgenik bitki için PCR sonuçları bulunmaktadır. Rejenere edilen diğer iki bitki Şekil 3'te gösterilen bitkilerden daha sonra elde edildiği için sonuçlarda görülmemektedir. Elde edilen 4 transgenik bitkiden ikisi daha sonraki kısımlarda anlatılacağı şekilde *IPT* genini mRNA düzeyinde ifadelediği için yeni bitkilerin geliştirilmesi için transformasyon çalışmalarına devam edilmemiş yeterli tohum elde edilen iki (T0_6 ve T0_19) T1 transgenik bitkileri ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 2. T0 bitkilerinden elde edilen genomik DNA örnekleri için *SARK::IPT* gen bölgesine özgü dört farklı primer çifti ile gerçekleştirilen PCR tepkimesi ürünlerinin %0,8'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. A=1.4 kb'lık ürün oluşturan pSARKIPT primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları; B=600 bp'lik ürün oluşturan pSarkF1/iptR1 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları; C=400 bp'lik ürün oluşturan iptF2/iptR2 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları; D=166 bp'lik ürün oluşturan ipt354/520 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları; E=162 bp'lik ürün oluşturan ipt105/267 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları. Kolon 1=DNA makörü (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb); Kolon 2=negatif kontrol (kalıp DNA içermeyen); Kolon 3=pozitif kontrol (transformasyonda kullanılan plazmid DNA); Kolon 4=4, 5, 6, 7, 8, 9 T0 bitkileri için PCR ürünleri; Kolon 5=10, 11 negatif kontrol (transgenik olmayan domates).

4.2. T0 Transgenik Bitkilerinde Transgen Kopya Sayısının Southern Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Transformasyon çalışmaları sonrasında rejenere edilen ve PCR analizleri sonucunda transgenik olduğu belirlenen T0 bitkilerinin transgen kopya sayısının belirlenmesi için Southern Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Southern Blot deneylerinde hedef gen bölgesinin tespit edilmesi için gereken DIG (digoksinin işaretli) DNA probları DIG işaretli dNTP'ler kullanılarak *SARK::IPT* gen bölgesine özgü primerler kullanılarak PCR yöntemi ile sentezlenmiştir (Şekil 3). Test edilen her bir T0 hattı için (T0_4, T0_6, T0_11 ve T0_19) tek bant gözlemlenmiştir (sırasıyla Kolon 3, 4, 5 ve 6) (Şekil 4). Dolayısı ile test edilen T0 hatların hedef transgen DNA bölgesini içerdiği doğrulanmış ve bu hatların genomlarına tek kopya *SARK::IPT* gen bölgesinin eklendiği gösterilmiştir.



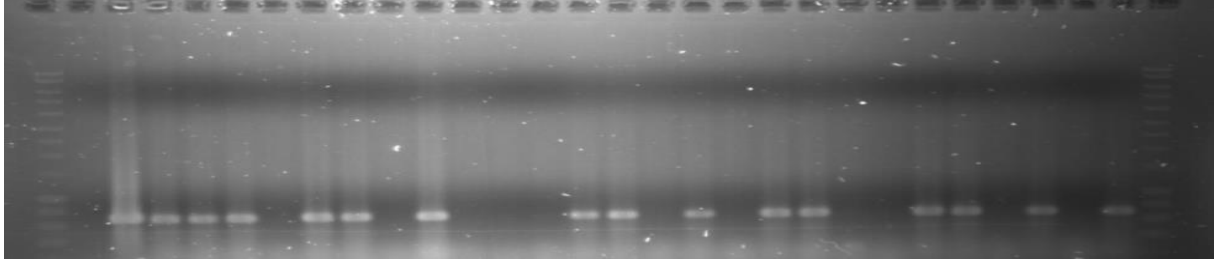
Şekil 3. DIG işaretli PCR ürünlerinin % 0.8 agaroz gel görüntüsü. Kolon 1 ladder (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb); Kolon 2 işaretsiz dNTP kullanılan kontrol. Kolon 3 1/2 seyreltilmiş DIG labelling karışımı.



Şekil 4. *SARK::IPT*ye özgün proplar ile işaretlenmiş T0 domates bitkileri için Southern Blot sonuçları. *SARK::IPT*ye özgün DIG ile işaretli proplar için T0 bitkileri için Kolon 1=ladder (154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1.033, 1.230, 1.766 ve 2.176 bp); Kolon 2=pozitif kontrol (transformasyonda kullanılan *SARK::IPT* bölgesini içeren plazid DNA); Kolon 3=T0_4 hattın için sonuç; Kolon 4=T0_6 hattı için sonuç; Kolon 5=T0_11 hattı için sonuç; Kolon 6=T0_19 hattı için sonuç.

4.3. Transgenik T2 Bitkilerinin Elde Edilmesi

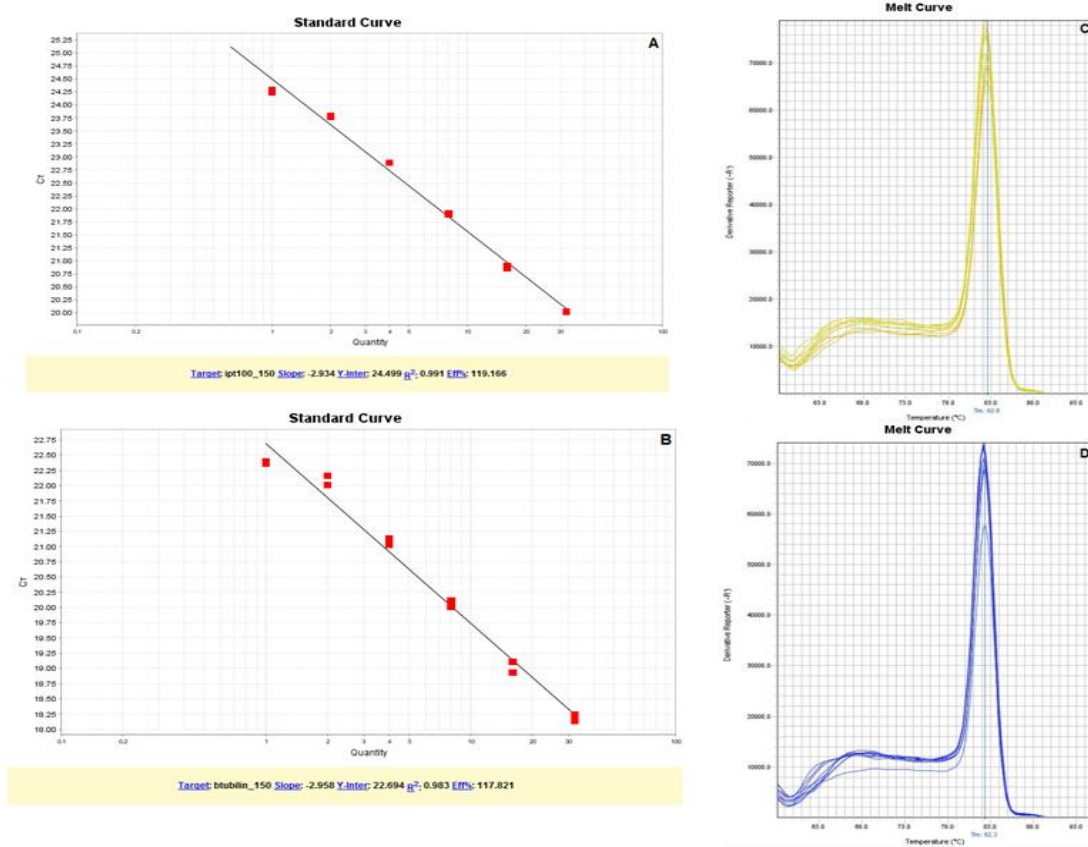
Transgenik olduğu PCR ve Southern Blot ile gösterilen T6 ve T19 transgenik hatları sera koşullarında büyütülmüş ve kendilenerek bu hatlar için T1 tohumları elde edilmiştir. Elde edilen T1 tohumlarından bitkiler tekrar sera koşullarına büyütülmüş ve bitkiler kendilenerek T2 tohumları elde edilmiştir. T1 bitkileri transgen için açılım gösterdiği için elde edilen T1 bitkilerinin transgenik olduğunu doğrulanması için transgene spesifik primerler ile PCR yapılmış ve PCR pozitif T1 bitkilerinden T2 tohumları toplanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. T1 (T0_6 ve T0_19) bitkilerinden elde edilen genomik DNA örnekleri için iptF2/iptR2 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları. Kolon 1=DNA makörü (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb); Kolon 2=negatif kontrol (kalıp DNA içermeyen); Kolon 3=pozitif kontrol (transformasyonda kullanılan plazmid DNA); geri kalan kolonlar test edilen T1 bitkileri.

4.4. Transgenik Bitkilerde Zigotluk Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmada homozigot transgenik hatların kullanılması için homozigot hatlar belirlenmiştir. Bu amaçla genomik DNA'daki transgen kopya sayısı RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. RT-qPCR çalışmaları PCR primerlerinin uygunluğunu test edilmesi için uygun kontrol DNA kullanılarak standart grafikleri çizilmiş ve erime eğrileri elde edilmiştir (Şekil 6). Çalışmalar için uygun özelliklere sahip olan PCR primerleri kullanılarak RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir ve yöntem kısmında açıklanan formül kullanılarak test edilen hatlar için Ct değerleri kullanılarak zigotluk düzeyleri hesaplanmıştır (Tablo 2). Bu analizler sonucunda homozigot ve heterozigot transgenik olduğu belirlenen T2 bitkilerinden tohumlar saklanmıştır. Test edilen ve zigotluk düzeyleri belirlenen bitkiler fizyolojik analizlerde kullanılmıştır.



Şekil 6. T2 transgenik bitkilerde zigotluk düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan referans gen (β -tubilin) ve *SARK::IPT*'ye özgün (*IPT_105-267*) primerler için standart grafikler ve erime eğrileri. A = *IPT_105-267* için standart grafik; B = *IPT_105-267* erime eğrisi; C = β -tubilin için standart grafik; D = β -tubilin için erime eğrisi.

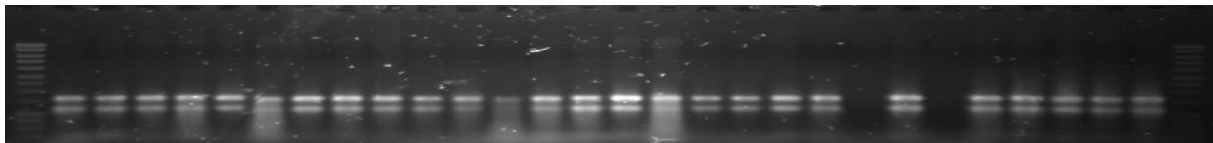
Tablo 2. Zigotluk düzeylerinin belirlenmesi için RT-qPCR sonuçları ve hesaplamaları

Bitki #	Ct ortalama (IPT100)	Ct ortalama (β -tubulin)	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	Zigotluk düzeyi
t6-2	22.88	21.08	1.81	0.99	1.99	Homozigot
t6-20	23.34	21.56	1.77	1.02	2.03	Homozigot
t6-34	22.80	20.91	1.89	0.90	1.87	Homozigot
t6-40	23.34	21.64	1.70	1.09	2.14	Homozigot
t6-25	23.23	21.48	1.74	1.05	2.07	Homozigot
t6-29	22.84	20.96	1.88	0.92	1.89	Homozigot
t6-15	23.44	20.79	2.66	1.11	2.16	Homozigot
t6-21	23.56	20.90	2.66	1.10	2.15	Homozigot
t6-12	24.07	21.27	2.80	0.00	1.00	Heterozigot
t6-45	24.46	21.69	2.77	0.02	1.01	Heterozigot
t6-33	24.29	21.47	2.82	0.02	0.99	Heterozigot
t6-11	25.08	22.20	2.88	0.08	0.94	Heterozigot
t6-30	24.23	21.40	2.83	0.04	0.97	Heterozigot
t6-35	24.43	21.90	2.53	0.27	1.20	Heterozigot
t6-8	24.26	21.51	2.76	0.04	1.03	Heterozigot
t6-7	25.89	21.81	4.08	0.31	0.80	Heterozigot
t6-9	25.16	21.54	3.62	0.15	1.11	Heterozigot
t6-10	25.27	21.69	3.58	0.18	1.14	Heterozigot
t6-38	25.33	21.79	3.54	0.23	1.17	Heterozigot
t6-41	24.96	21.32	3.64	0.12	1.09	Heterozigot
t6-43	25.02	21.42	3.60	0.16	1.12	Heterozigot
t6-3	25.47	21.24	4.24	0.32	1.25	Heterozigot
t19-2	24.97	20.47	4.50	1.06	2.08	Homozigot
t19-20	25.90	21.42	4.48	1.08	2.12	Homozigot

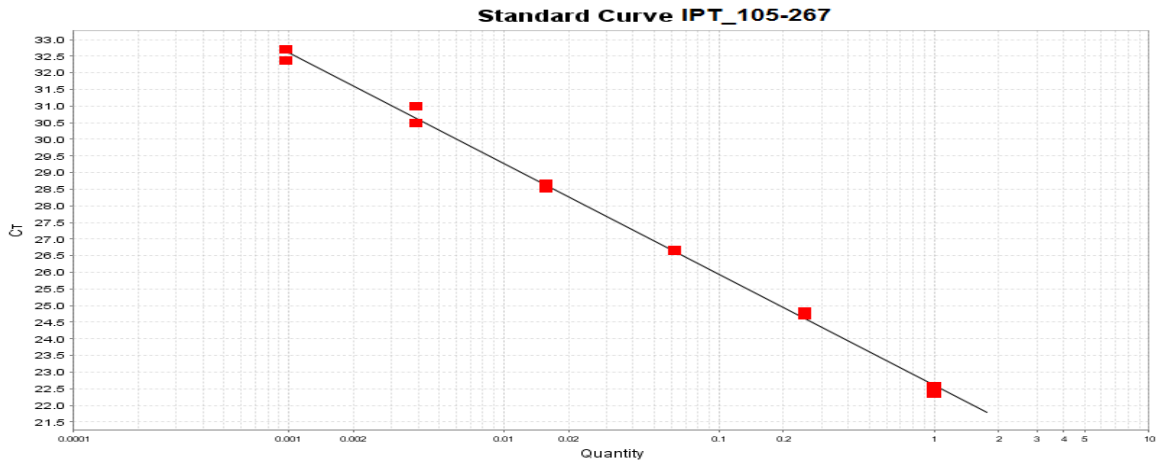
t19-24	25.89	21.40	4.49	-	1.07	2.10	Homozigot
t19-34	26.15	21.93	4.22	-	1.34	2.54	Homozigot
t19-35	25.46	21.16	4.30	-	1.26	2.40	Homozigot
t19-7	27.08	21.71	5.37	-	0.19	1.14	Heterozigot
t19-9	26.30	20.97	5.33	-	0.23	1.17	Heterozigot
t19-13	27.84	22.19	5.65	-	0.09	0.94	Heterozigot
t19-17	26.73	21.14	5.59	-	0.03	0.98	Heterozigot
t19-19	27.68	22.11	5.57	-	0.01	0.99	Heterozigot
t19-22	27.39	21.83	5.56	-	-	1.00	Heterozigot
t19-25	27.05	21.55	5.50	-	0.06	1.05	Heterozigot
t19-27	27.07	21.67	5.41	-	0.15	1.11	Heterozigot
t19-29	27.31	21.77	5.54	-	0.02	1.01	Heterozigot
t19-30	27.88	22.37	5.51	-	0.05	1.03	Heterozygote

4.5. Transgenik T1 Bitkilerinin IPT mRNA İfadelenme Düzeylerinin RT-qPCR ile Velirlenmesi

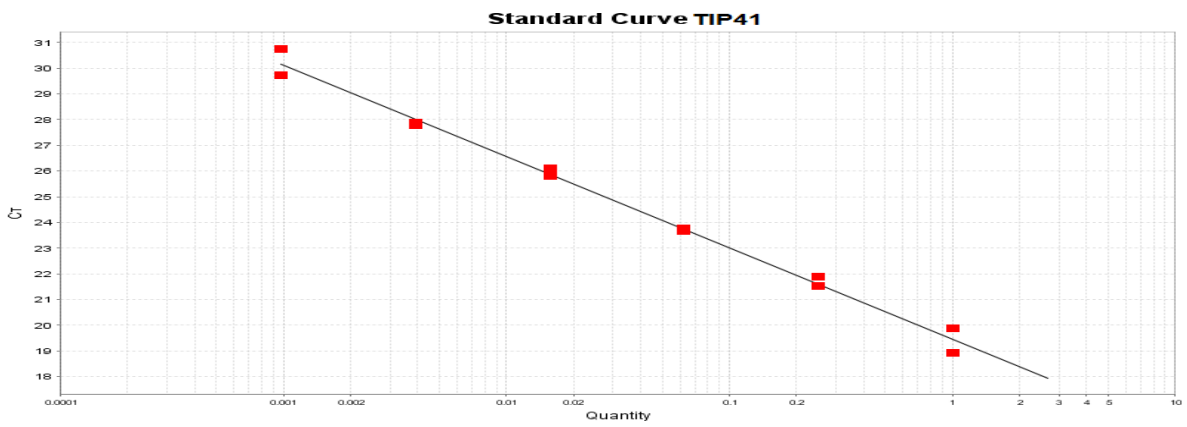
RT-qPCR çalışmaları için uygunluğu test edilen (standart grafik ile PCR verimleri belirlenen ve erime eğrisi analizleri yapılan) (Şekil 8 ve 9) PCR primerleri kullanılmış, agaroz jelde görüntülenerek iyi kalitede olduğu belirlenen toplam RNA'lar ((Şekil 7) kullanılarak yöntem kısmında anlatıldığı şekilde cDNA'lar sentezlenmiş ve bunlar kullanılarak *IPT* gen ifadenme düzeylerinin belirlenmesi için RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda T1-6 ve T1-19 transgenik hatlarında *IPT* geninin mRNA seviyesinde genç, olgun yaprak ve kök dokularındaki relatif ifadenme düzeyleri belirlenmiştir (Şekil 10). Elde edilen sonuçlar için iki faktörlü ANOVA analizleri R programı ile gerçekleştirilmiştir. ANOVA analizleri sonucunda T1-6 ve T1-19 hatları ve farklı dokular arasında *IPT* geninin ifadenme düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $p = 0.0060$ ve $p = 2.55e-06$). Ayrıca,, yine aynı veriler için R programı ile Tukey's HSD testi gerçekleştirilmiştir ve gruplar ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. Gerek T1-6 gerek T1-19 hatlarında olgun yaprak dokularında *IPT* geninin genç yaprak dokusu ve kök dokusu ile kıyaslandığında daha yüksek düzeylerde ifadelendiği belirlenmiştir (Şekil 10). RT-qPCR deneyleri sonucunda *IPT* geninin SARK promotörü kontrolünde daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi olgun yaprak dokusunda daha fazla ifadelendiği görülmüştür (Rivero vd., 2007).



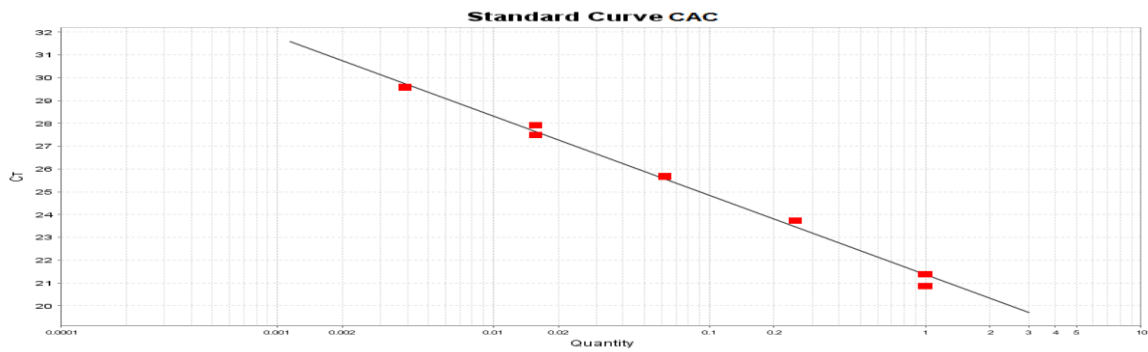
Şekil 7. T1 bitkilerinden izole edilen ve %0,8'lik agaroz jelde yürütülen toplam RNA örnekleri. Kolon 1 = DNA makörü; geri kalan kolonlar ise T1 bitkileri için toplam RNA.



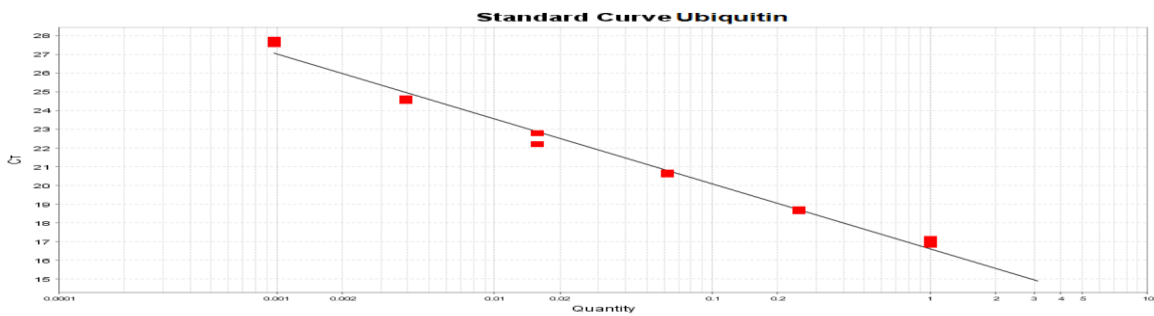
Target: ipt100/150 Slope: -3.334 Y-Inter: 22.611 R²: 0.997 Eff%: 99.511



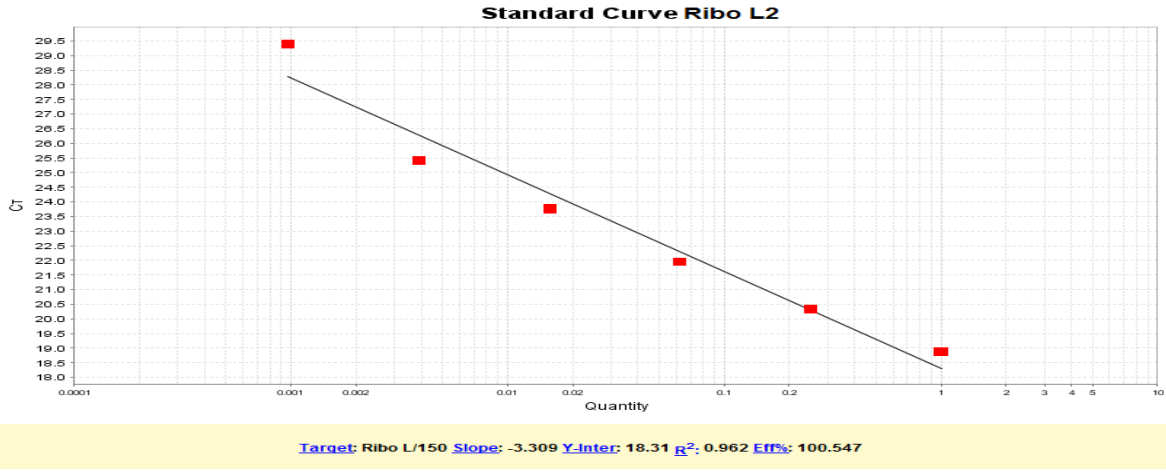
Target: tip41/150 Slope: -3.554 Y-Inter: 19.461 R²: 0.992 Eff%: 91.146



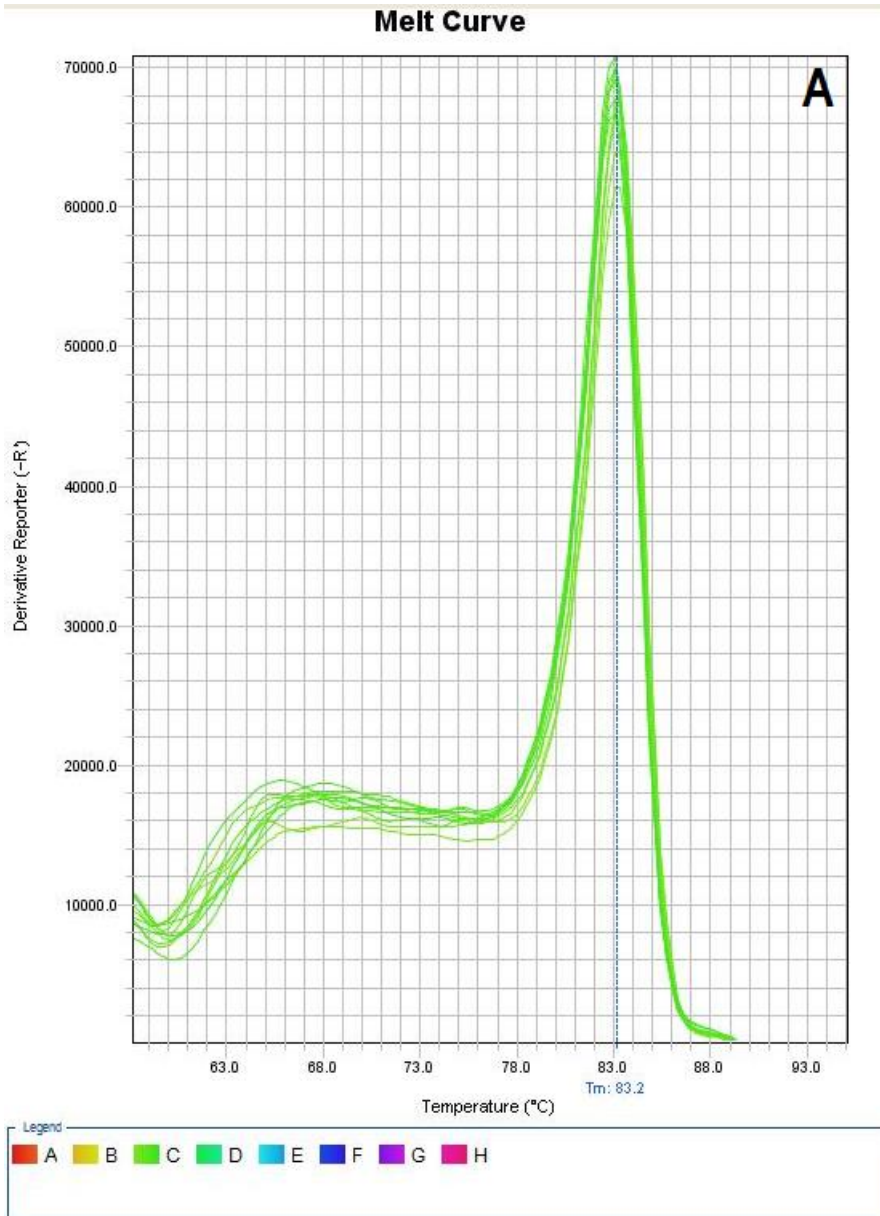
Target: CAC Slope: -3.472 Y-Inter: 21.383 R²: 0.993 Eff%: 94.097

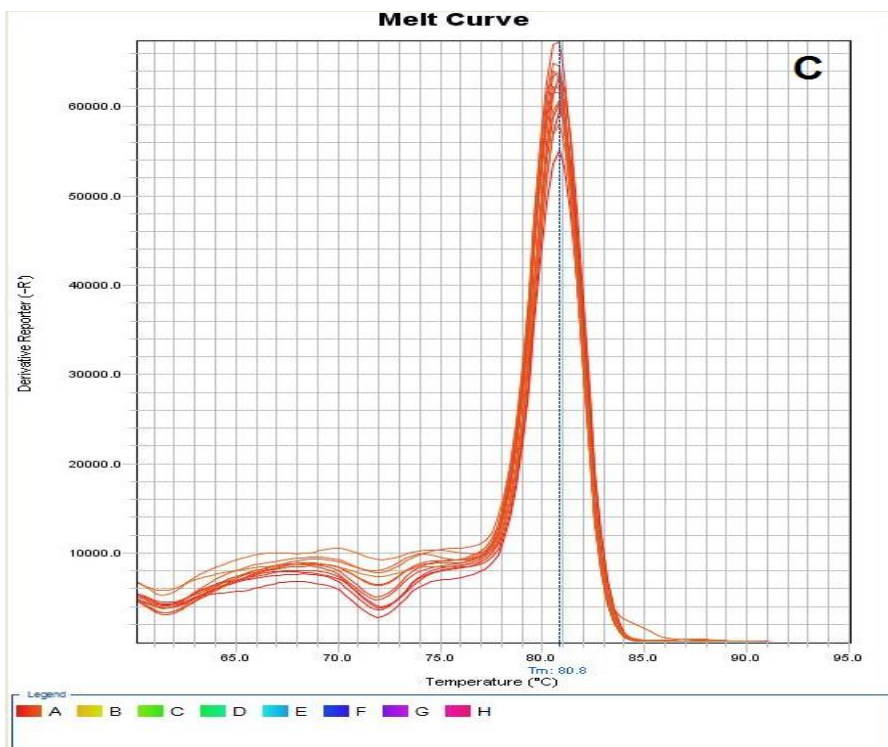
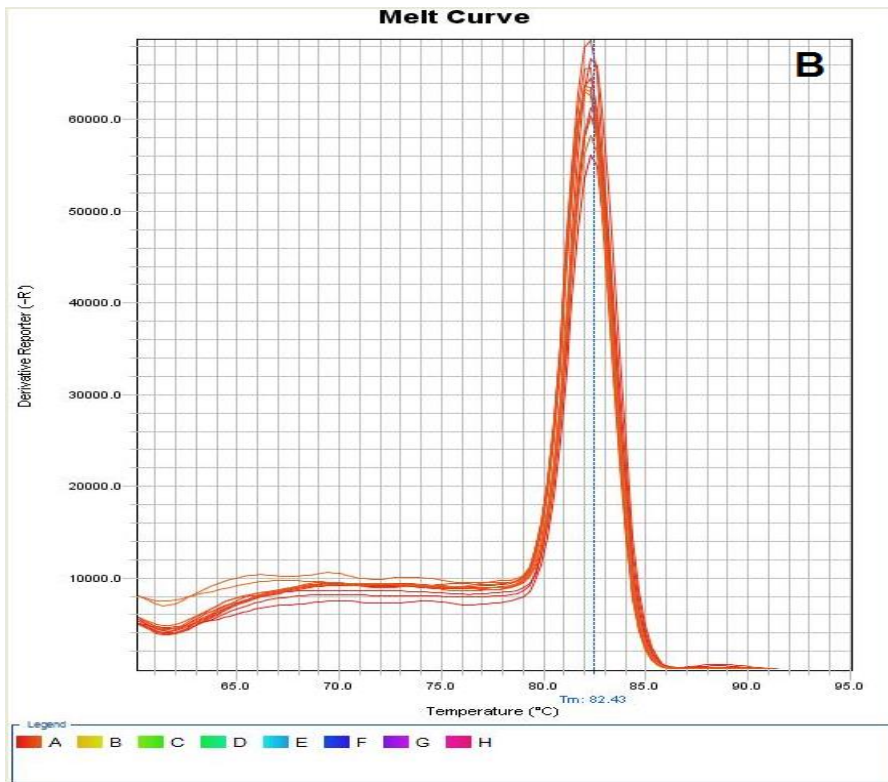


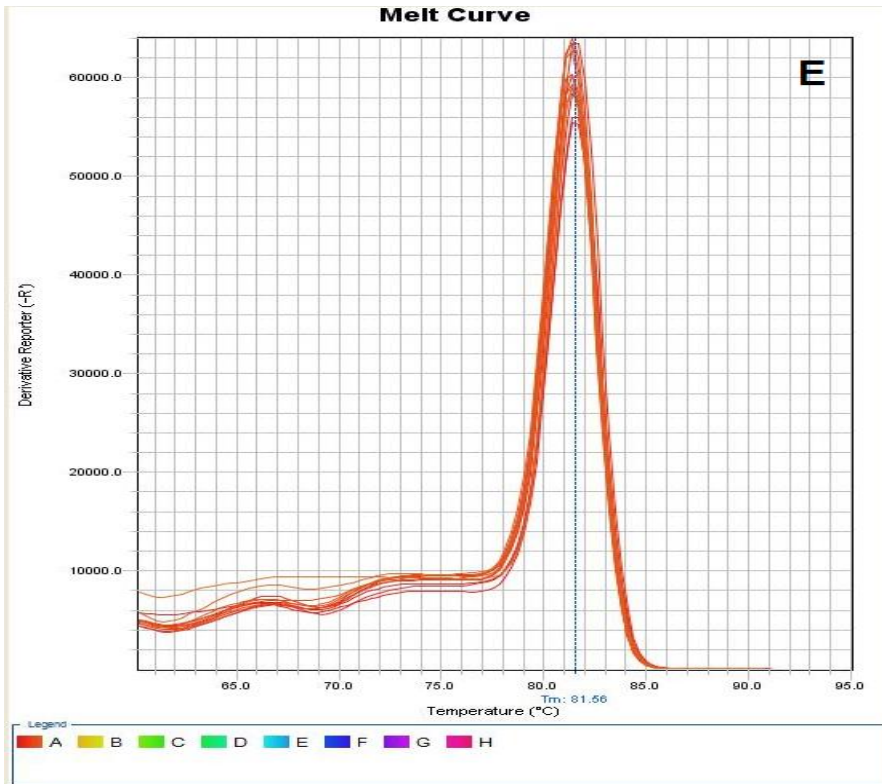
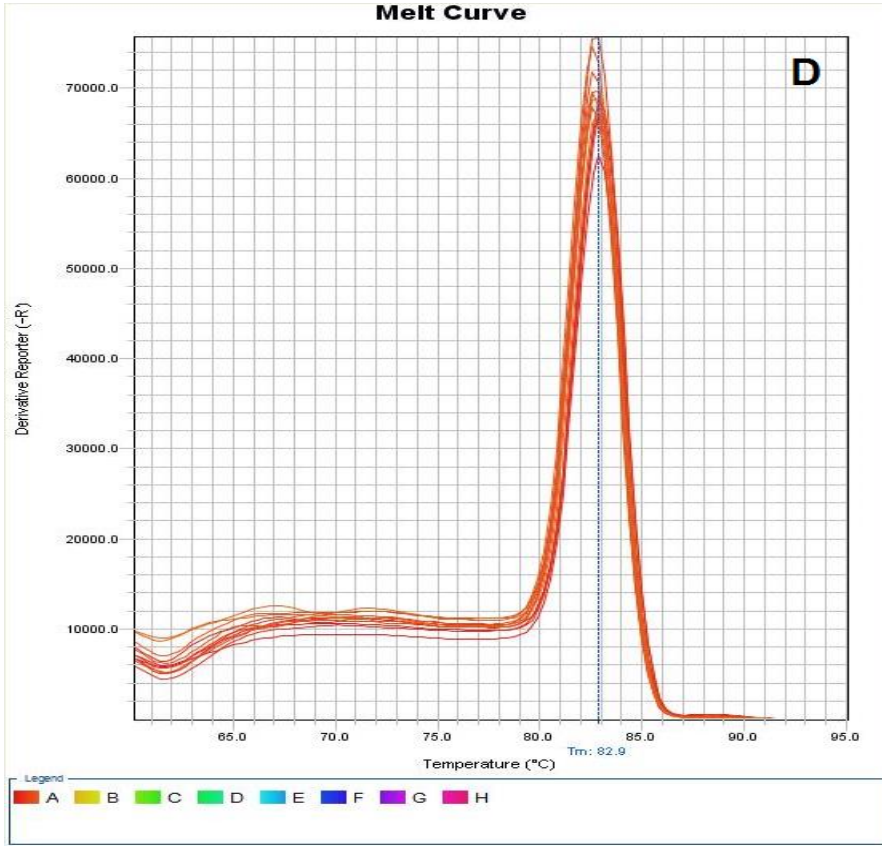
Target: UBI/150 Slope: -3.464 Y-Inter: 16.636 R²: 0.987 Eff%: 94.376



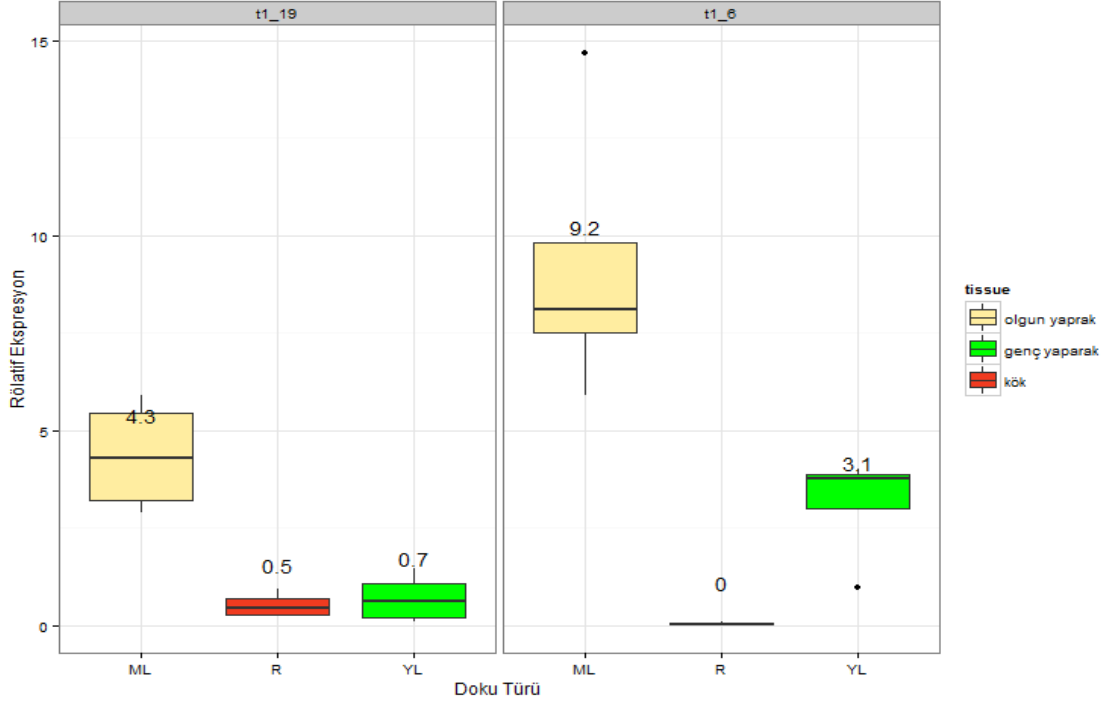
Şekil 8. IPT_105-267, TIP 41, CAC, Ubiquitin ve Ribo L2 primerleri için RT-qPCR standart grafikleri.







Şekil 9. IPT_105-267 (A), TIP 41 (B), CAC (C), Ubiquitin (D) ve Ribo L2 (E) primerleri için RT-qPCR erime eğrileri



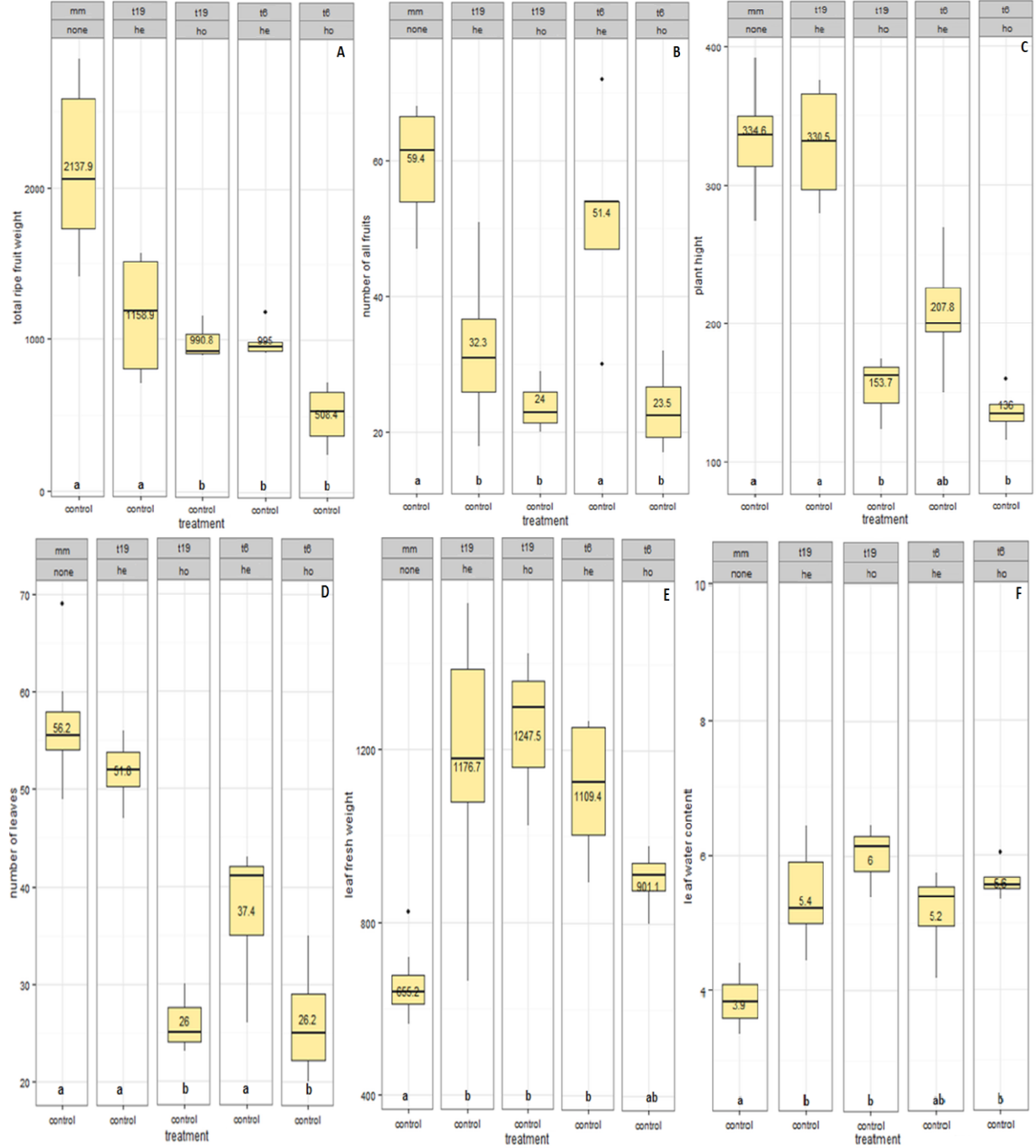
Şekil 10. Test edilen T1-6 ve T1-19 hatlarında farklı dokularda IPT genin mRNA rölatif ifadenme düzeyleri için kutu grafiği (Tukey's HSD test sonucuna göre p değerleri t1-19 YL-ML 0.085, t1-19 ML-R 0.066, T1-6 YL-ML 0.0016, T1-6 ML-R 0.000012).

4.6. Geliştirilen SARK::IPT Transgenik Bitkilerinin Fizyolojik ve Verim Karakterleri Bakımından Değerlendirilmesi

T6 ve T19 homozigot ve heterozigot bitkileri daha önce ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sera koşullarında üç ay boyunca büyütülmüştür ve toplam meyve ağırlığı, meyve sayısı, bitki uzunluğu, toplam yaprak sayısı, yaprak yaş ağırlığı ve yaprak su içeriği gibi parametreler ölçülmüştür. Çiçeklenme döneminden itibaren transgenik bitkilerde yeni büyüyen yaprakların uç kısımlarında nekroz, bitki boyunda azalma (bodur bitkiler), bitki apeksinin tamamen ölmesi ve petiollerden yeni filizlerin büyümesi gibi bazı semptomlar gözlenmiştir. Bahsedilen semptomlar homozigot hatlarda heterozigot olanlara göre daha büyük sıklıkla görülmüştür. Homozigot hatlarda heterozigot ve transgenik olmayan hatta göre ölçülen bütün karakterler açısından daha düşük performans gözlenmiştir. Çiçeklenme evresinden sonra bahsedilen semptomlar gözlenmeye başlamış ve sonrasında daha da ağırlaşmıştır. Homozigot bitkilerde çiçeklenme evresinden sonra apeks ölmeye başlamıştır dolayısı ile yeni yaprak oluşturamamıştır. Ancak var olan yapraklar bitkide korunmuştur. Heterozigot bitkilerde apex ölümü, bodurluk ve petiollerden yaprak büyümesi gibi semptomlar görülmemiş ancak çiçeklenme sonrasında bazı bitkilerde apekte yeni büyüyen yaprak uçlarında nekroz gözlenmiştir. Gerek homozigot gerekse heterozigot transgenik hatlarda verim açısından herhangi bir iyileşme gözlemediğimiz gibi transgenik olmayan kontrole göre de daha düşük performans gözlenmiştir (Şekil 11 a ve b). Transgenik bitkilerde hem meyve sayısı hem de meyve ağırlığında düşüş gözlenmiştir. T19 heterozigot hattı hariç diğer hatlar transgenik olmayan kontrollere kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı düşüş gözlenmiştir (Şekil 11 c). Yaprak sayısı heterozigot hatlarda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşmemiş ancak homozigot hatlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir (Şekil 11 d). Ancak bütün transgenik hatlarda yaprak yaş ağırlığında artış görülmüştür (Şekil 11 e). Yine yaprak su içeriğinin de transgenik hatlarda daha yüksek olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda SARK promotorunun *A. thaliana*'da (Delatorre vd., 2012) ve tütünde (Rivero vd., 2007) olgun yapraklarda aktif olduğu ve abiyotik stresle de indüklendiği ancak

diğer dokularda düşük düzeylerde aktif olduğu gösterilmiştir. Mevcut literatüre uygun olarak bir önceki dönem raporunda gösterildiği üzere RT-qPCR deney sonuçlarında *IPT* geninin genç yaprak ve kök dokusunda olgun yapraklardan daha az miktarda ifadelendiği gözlenmiştir. Daha önce mısırdaki (Robson vd., 2004) yine *IPT* geni *SEE1* yaşlılıkla indüklenen promotörü kontrolünde over-ekspres edilmiş ancak bitkilerin bodurlaşması, genç yapraklarda nekroz gibi bu çalışmada da gözlenen benzer semptomlar ortaya çıkmıştır. Gözlenen semptomların *IPT* geninin etkisiyle oluştuğu ve bu durumda sitokininlerin yüksek miktarda sentezlendiğine işaret etmiştir (Robson vd., 2004). Gerçekleştirilen bu projede de benzer bir durumun söz konusu olabileceği gibi olgun yapraklarda sentezlenen sitokininlerin genç yaprak dokusu gibi diğer dokulara transportu da bahsedilen semptomların oluşmasına sebep olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 11. Ölçülen fenotipik ve verim karakterlerine ilişkin kutu grafikleri. A=Toplam meyve ağırlığı; B=Toplam meyve sayısı; C=Bitki uzunluğu; D=Toplam yaprak sayısı; E=Yaprak yaş ağırlığı; F=Yaprak su içeriği.

4.7. Geliştirilen SARK::IPT Transgenik Bitkilerde Kuraklık Stresi Denemeleri

Yöntem kısmında ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi homozigot ve heterozigot RT-qPCR ile belirlenen T6, T19 ve transgenik olmayan Moneymaker bitkileri 6 hafta boyunca bütülmüş ve stres grubu bitkileri ise 2 hafta boyunca sulanmamıştır. Kuraklık stresi uygulaması sonunda Moneymaker kontrol hattının dehidrasyon sebebiyle yapraklarının tamamen buruştuğu ancak transgenik hatlarda yapraklardaki dehidrasyonun daha az olduğu görülmüştür (Şekil 12, 13, 14, 15). Transgenik olmayan kontrol hattında yaşlı yapraklarda sararma ve dökülme gözlenirken transgenik bitkilerde yaşlı yapraklarda sararma ve dökülme gözlenmemiştir. Ancak bir önceki denemedeki gibi özellikle homozigot hatların transgenik olmayan hatta göre daha kısa boylu olduğu gözlenmiştir (Şekil 16, 17, 18, 19). Ancak daha önceki deneyde görülen diğer semptomlar gözlenmemiştir (Daha önce belirtildiği gibi bu semptomlar çiçeklenme dönemi sonrasında gözlenmiştir). Deney sonucunda transgenik bitkilerde susuzluk stresine karşı transgenik olmayan Moneymaker hattına göre daha yüksek tolerans gözlenmiştir. Proteomik çalışmalarda yaşlılık ve stres proteinlerinin profili domine etmemesi için kuraklık stresi orta düzeyde tutulmuştur. Yaprak toplam protein analizi için en genç açılmış yapraktan sayarak 4. yapraktan örnek alınmış, nükear proteomik için ise en yaşlı yapraklar hariç geri kalan tüm yapraklar toplanmıştır ve deneyler için -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 12. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 heterozigot transgenik bitkiler (sağ).



Şekil 13. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 homozigot transgenik bitkiler (sağ).



Şekil 14. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 heterozigot transgenik bitkiler (sağ).



Şekil 15. Kuraklık stresi uygulaması sonrası transgenik olmayan kontrol MM (sağ) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sol).



Şekil 16. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 heterozigot transgenik bitkiler (sağ).



Şekil 17. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T6 homozigot transgenik bitkiler (sağ).



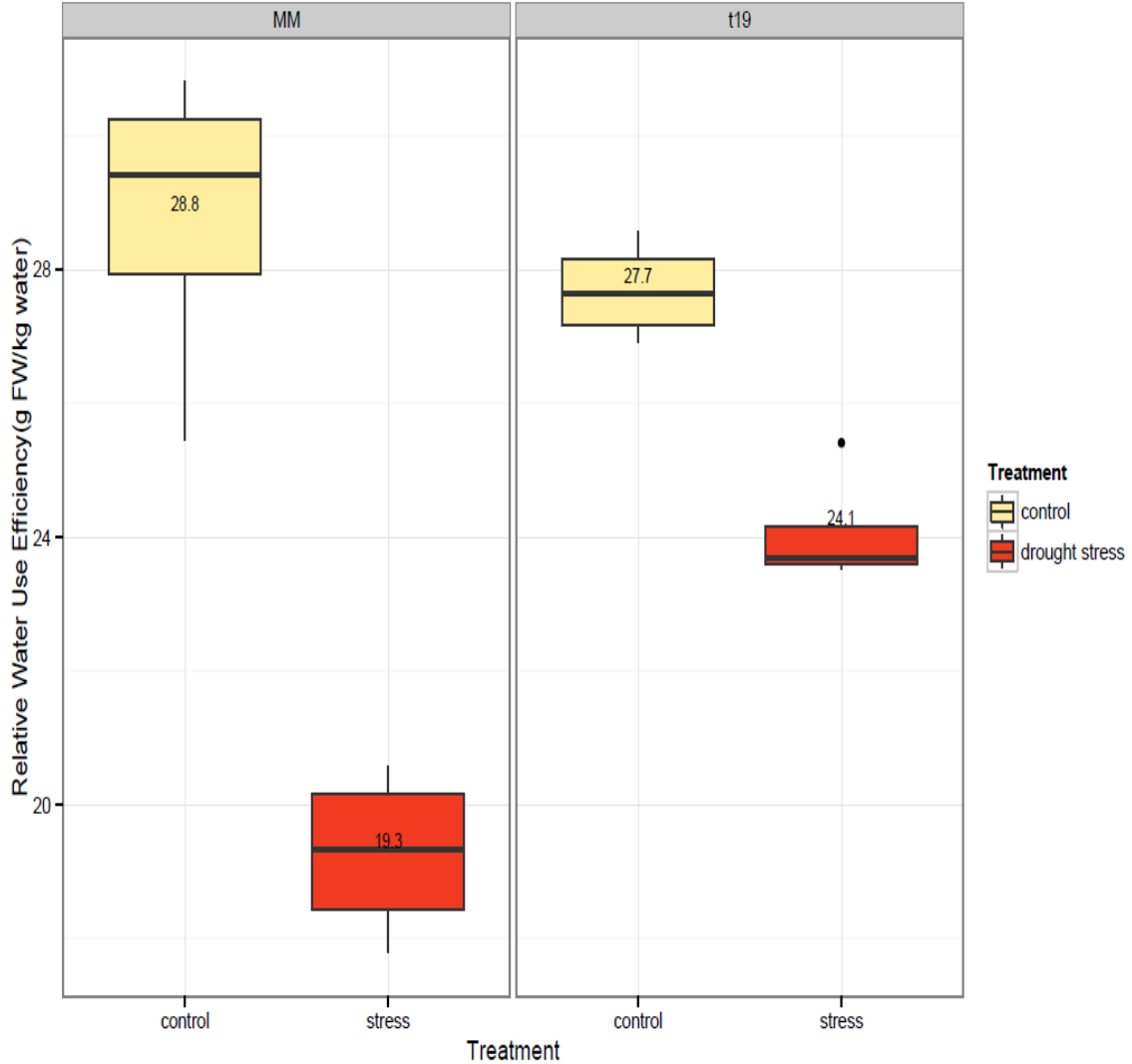
Şekil 18. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 heterozigot transgenik bitkiler (sağ).



Şekil 19. Kontrol koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sağ)

4.8. Kuraklık Stresi ve Kontrol Koşullarında Rölatif Su Kullanım Verimliliği testi

Yöntem bölümünde anlatıldığı gibi kuraklık testleri süresince bitkiler sürekli tartılarak ağırlıkları eşit olacak şekilde sulanmış ve buharlaşma ile topraktan su kaçışını önleyecek şekilde saksıların üzeri streç film ile kapalı olacak şekilde bitkiler büyütülmüştür. Deney sona erdirildiğinde her bitkinin kullandığı toplam su miktarı ve bitki biyokütlesi için elde bulunan sonuçlar kullanılarak su kullanım verimlilikleri hesaplanmıştır. Su kullanım verimleri bitkinin büyüttüğü birim biyokütle başına kullandığı su miktarını ifade etmektedir. Dolayısı ile yüksek su kullanım verimi az miktarda su ile daha fazla biyokütle oluşturulduğunu göstermektedir. Kontrol koşullarında transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde su kullanım verimi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir (Şekil 20). Kuraklık koşullarında transgenik olmayan kontrol bitkilerinde su kullanım veriminde ciddi bir düşüş görülmektedir. Kuraklık koşullarında transgenik bitkilerde su kullanım veriminde düşüş gözlenmiştir ancak söz konusu düşüş transgenik olmayan kontrol bitkilerine kıyasla oldukça azdır. Deney sonuçlarında transgenik bitkilerin su kullanım verimlerinin daha yüksek olduğu açıkça görülmekte bu da söz konusu bitkilerin kuraklık stresi koşullarını daha iyi tolere edebildiğini göstermektedir.



Şekil 20. Kontrol ve kuraklık koşullarında büyütülen transgenik ve transgenik olmayan bitkiler için rölatif su kullanım verimleri. Sol transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sağ)

4.9. Yaprak Yaşlanma Testi

Projenin metot kısmında da anlatıldığı şekilde inkübe edilen yaprakların 7 gün sonra fotoğrafları çekilmiştir. Transgenik hattan alınmış yapraklar herhangi bir bozulma olmaksızın yeşil durumlarını korumuşlar ancak transgenik olmayan kontrol bitkisinden gelen yapraklarda sararmayla beraber çürüme belirtileri de görülmektedir (Şekil 21).

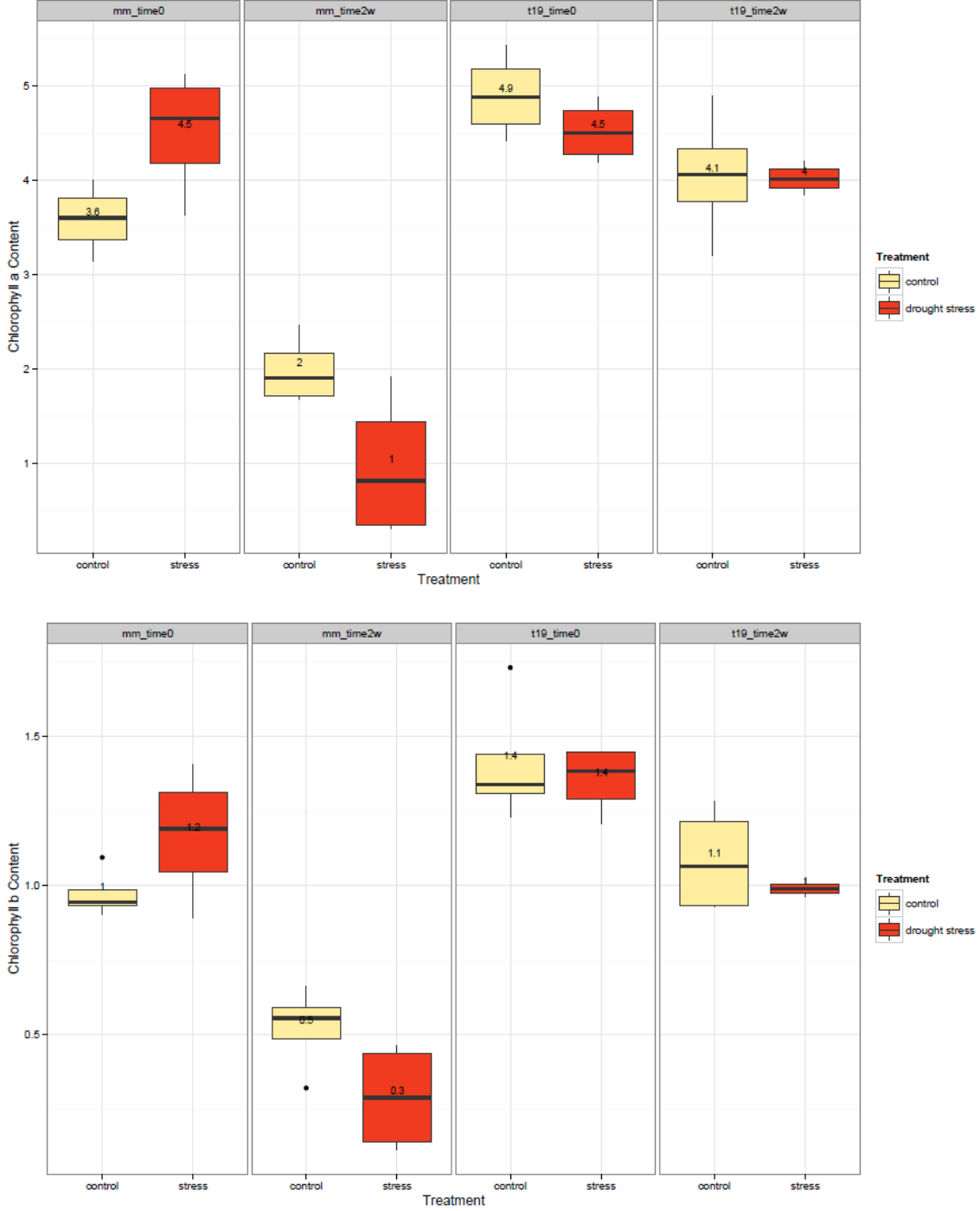


Şekil 21. Transgenik olmayan kontrol (MM) ve transgenik T_19 hattından alınan, 14 gün karanlıkta nemli filter kağıdı üzerinde bekletilen yaprakların fotoğrafları. Üstte transgenik olmayan kontrol ilk sıra kontrol koşullarında büyütülen 2. Sıra kuraklık stresi koşullarında büyütülen. Alt iki sıra transgenik bitkiler, 3. Sıra kontrol koşullarında büyütülen, 4. Sıra kuraklık stresi koşullarında büyütülen.

4.10. Yaşlanma Testi Öncesi ve Sonrası Klorofil a ve Klorofil b Ölçümleri

Yaşlanma testi öncesi ve sonrasında her bir bitkiden yaprak örnekleri alınmış ve klorofil miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Böylelikle yaprak yaşlanma testi öncesi ve sonrası yapraklarda gerçekleşen klorofil degradasyonu sayısal olarak ifade edilebilirlik kazanmıştır. Yapılan klorofil ölçümleri sonucunda kontrol koşullarında dahi transgenik bitkilerin transgenik olmayan kontrol bitkilerine göre daha yüksek klorofil oranlarına sahip oldukları görülmüştür (Şekil 22). Transgenik olmayan kontrol bitkilerinde yaşlanma testi deney başlangıcında kuraklık stresi koşullarında kontrol koşullarına göre az da olsa yüksektir ancak, transgenik bitkide yaşlanma testi deney başlangıcında kuraklık stresi koşullarında kontrole göre yüksek bir değer gözlenmemiştir. Yaşlanma testi deney sonunda gerek transgenik olmayan kontrol gerekse, transgenik bitkilerde deney başlangıcına göre klorofil a ve b miktarlarının düştüğü gözlemlenmiştir. Ancak transgenik bitkilerde söz konusu düşüşün, ki bu da yaşlanma ile oluşan klorofil yıkımı sonucundadır, transgenik olmayan kontrol bitkilerine göre çok daha az olduğu gözlenmektedir. Gerek kontrol ve gerek kuraklık stresi maruz bırakılmış

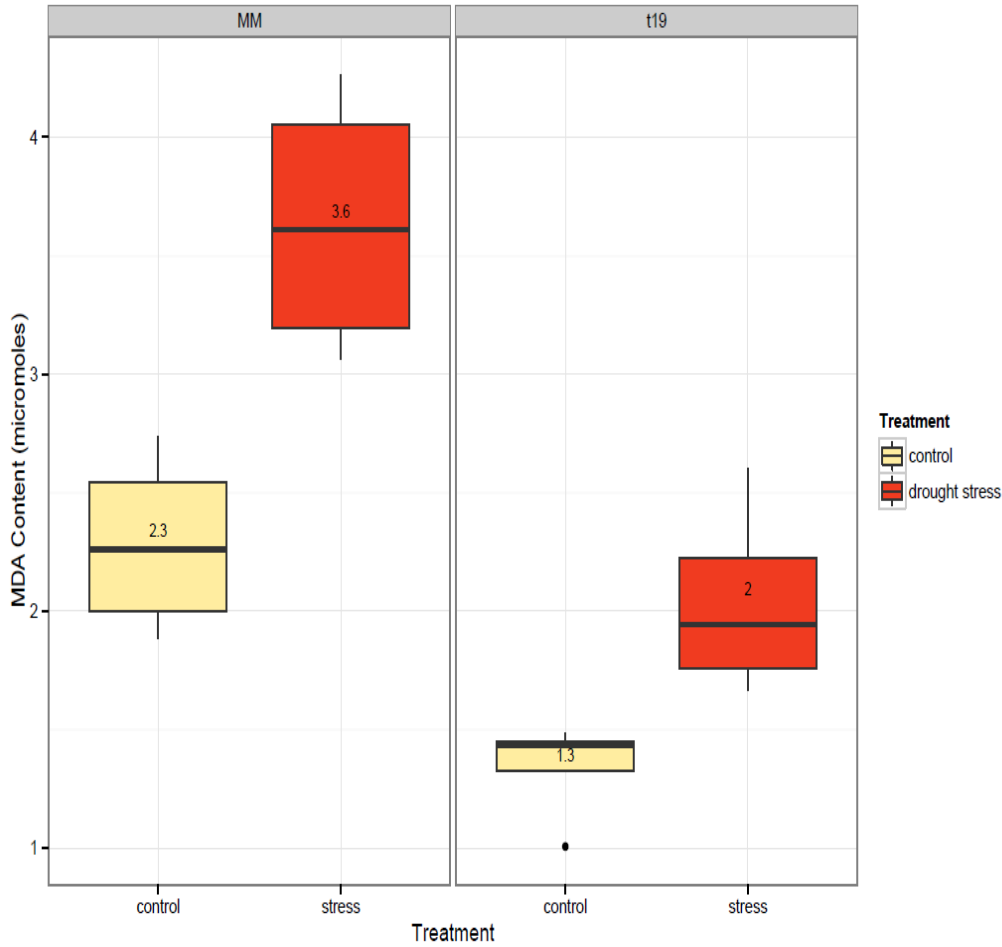
bitkilerden alınan yapraklarda gerçekleştirilen yaşlanma testi sonucunda transgenik bitkilerde transgenik olmayan kontrol bitkiler ile kıyaslandığında yaşlanma ile oluşan klorofil degradasyonunun daha düşük düzeylerde olduğu görülmüştür. Bu da sitokinin miktarlarındaki artışın klorofil degradasyonunu engellediği ve fotosentetik mekanizmanın korunmasına yardımcı olduğu şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 22. Kontrol ve kuraklık koşullarında büyütülen transgenik ve transgenik olmayan bitkilerden koparılan yapraklardan, yaprak yaşlanma testi öncesi ve sonrasında alınan örneklerden gerçekleştirilen klorofil a ve klorofil b ölçüm sonuçları. Transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sağ).

4.11. Malondialdehit ölçümleri

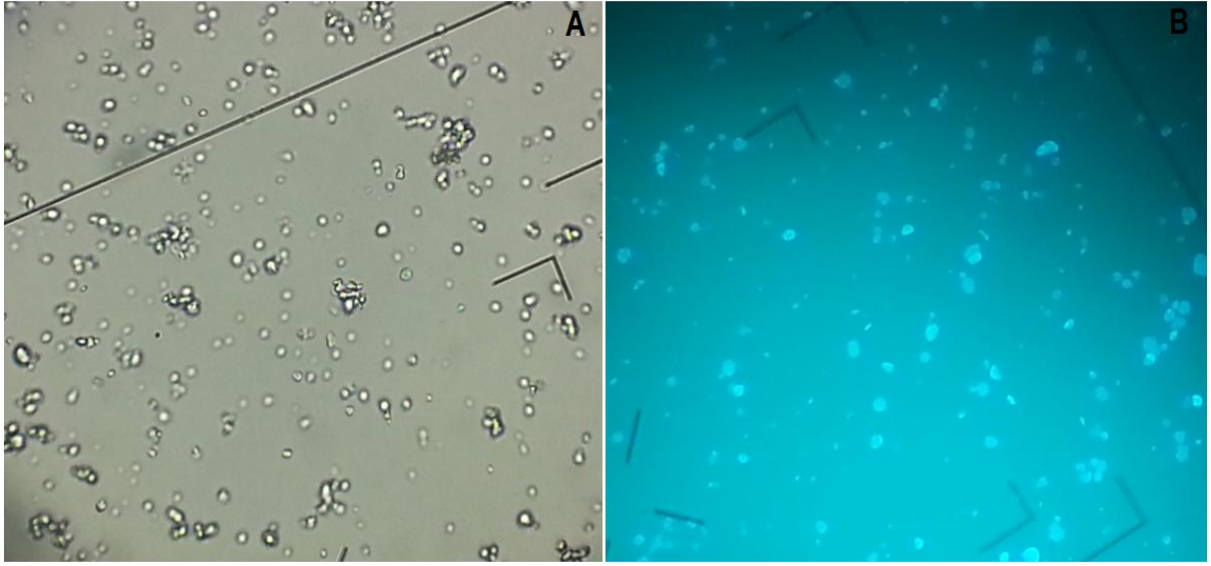
Kuraklık ve kontrol koşulları altında büyütülen transgenik olmayan kontrol ve transgenik bitkilerde lipit peroksidasyonu düzeylerinin anlaşılması için lipit peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda hem transgenik olmayan kontrol bitkilerinde hem de transgenik bitkilerde kuraklık stresi koşullarında MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir (Şekil 23). Ancak, gerek kontrol koşulları altında gerekse kuraklık stresi koşulları altında transgenik bitkilerde MDA düzeylerinin transgenik olmayan kontrol bitkilere göre daha düşük düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda transgenik bitkilerde lipit peroksidasyon düzeylerinin daha düşük olduğu görülmüştür ki bu da özellikle lipit membranlardaki oksidatif stresin daha az olduğuna işaret etmektedir. Düşük oksidatif stres ise transgenik bitkilerin kuraklık koşullarını daha iyi tolere edebildiğini göstermektedir.



Şekil 23. Kontrol ve kuraklık koşullarında büyütülen transgenik ve transgenik olmayan bitkilerden koparılan yapraklardan gerçekleştirilen malondialdehit ölçüm sonuçları. Transgenik olmayan kontrol MM (sol) ve transgenik T19 homozigot transgenik bitkiler (sağ).

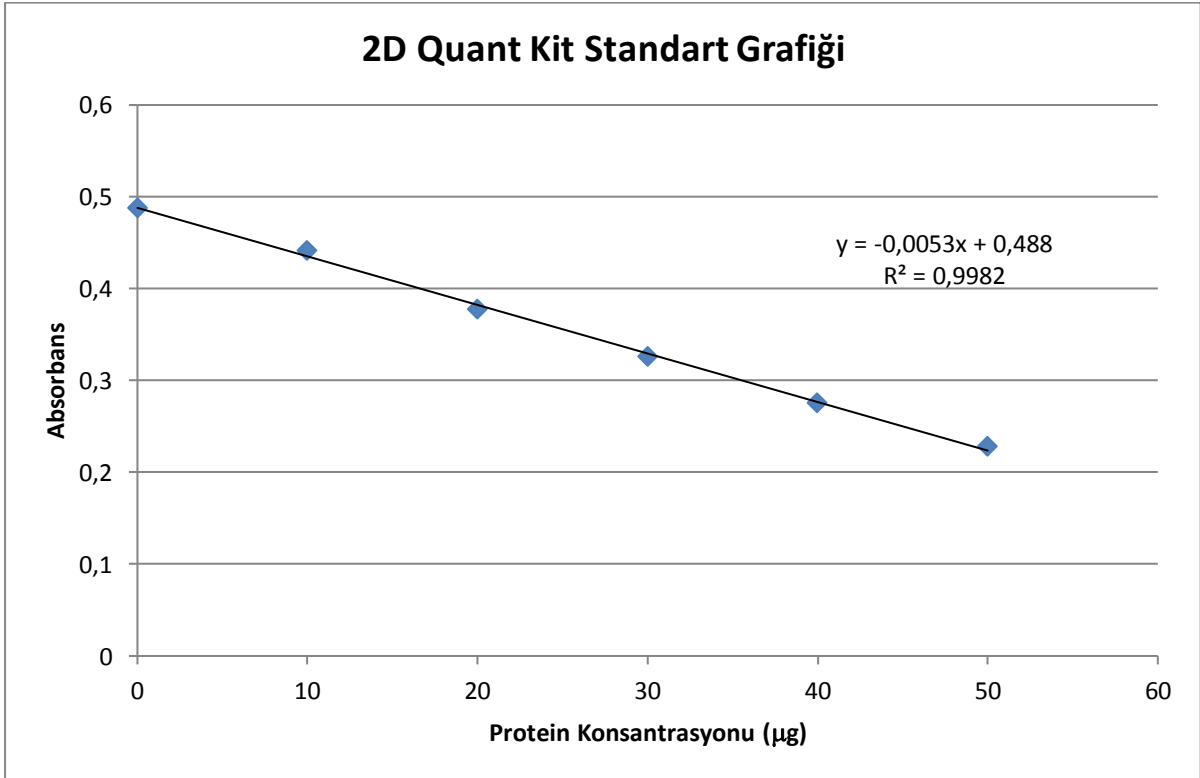
4.12. Yaprak Nükleus Zenginleştirilmesi ve Protein İzolasyonu

Transgenik homozigot T19 ve transgenik olmayan kontrol grubu ve kuraklık stres grubu bitkilerden yaparak dokusu hasat edilmiş ve yöntem kısmında anlatıldığı şekilde nükleus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen nükleus örneklerinin kalitesinin doğrulanması için nükleusa spesifik boya DAPI ile boyanarak floresans mikroskop ile görüntülenmiştir. Boyanmamış nükleer ekstrakt örneklerinde küre şeklinde partiküller görülürken DAPI ile boyanmış örneklerde floresans mikroskop altında mavi boyanmış kürecikler şeklinde nükleuslar görülmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. Yaprak dokusundan izole edilen nükleer ekstraktın mikroskop görüntüsü. A. Boyanmamış nükleus örnekleri ışık mikroskobu altında. (40X).B. DAPI ile boyanmış nükleus örnekleri floresans mikroskop altında 40X.

Mikroskop altında incelenen nükleus örneklerinden protein ekstraksiyonu Tripure kimyasalı ile gerçekleştirilmiştir ve ekstrakte edilen protein örneklerinin konsantrasyonu 2D Quant kit (GE Healthcare Life Sciences) hazırlanan standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 25, Tablo 3). Elde edilen nükleer protein örnekleri proteomik analizler gerçekleştirilene kadar -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 25. 2D Quant Kit protein standart grafiği.

Tablo 3. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen nükleer ekstraktan izole edilen proteinlerin konsantrasyonları.

	mg/ul	100ul'de
MM_cont1	0.50	75.59
MM_cont2	0.39	57.85
MM_cont3	0.24	35.90
MM_stres1	0.51	76.86
MM_stres2	0.57	85.30
MM_stres3	0.44	65.46
T19_cont1	0.26	38.85
T19_cont2	0.32	48.14
T19_cont3	0.23	33.78
T19_stres1	0.78	117.40
T19_stres2	0.55	82.77
T19_stres3	0.51	76.44

4.13. Yaprak Toplam Protein Ekstraksiyonu

Transgenik homozigot T19 ve transgenik olmayan kontrol grubu ve kuraklık stres grubu bitkilerden yaprak dokusu hasat edilmiş ve yöntem kısmında anlatıldığı gibi toplam protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen protein örneklerinin konsantrasyonu 2D Quant kit (GE Healthcare Life Sciences) hazırlanan standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 25 , Tablo 4). Elde edilen nükleer protein örnekleri proteomik analizler gerçekleştirilene kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Tablo 4. Yaprak toplam protein ekstraktlarından konsantrasyonları.

	mg/ul	100ul'de
MM_cont1	9.16	91
MM_cont2	8.66	87
MM_cont3	10.02	100
MM_stres1	8.44	84
MM_stres2	9.2	92
MM_stres3	8.14	81
T19_cont1	8.68	87
T19_cont2	8.04	80
T19_cont3	9.58	96
T19_stres1	7.88	79
T19_stres2	6.76	68
T19_stres3	7.54	76

4.14. Kalitatif Shotgun Proteomik Analizleri

Kuraklık ve kontrol koşulları altında büyütülen transgenik (SARK::IPT) ve transgenik olmayan (MM) kontrol bitkilerinde kuraklık cevap mekanizmalarını anlaşılması için proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz LC-MS/MS shut gun proteomik analizleri sonucunda yaprak toplam proteomunda FDR<1% ile yaklaşık 5400 tekrarlamayan peptit tanımlanmış ve bunlardan da 1714 protein tanımlanmıştır. Yaprak zengileştirilmiş nükleer proteom analizlerinde ise FDR<1% ile toplamda 3100 tekrarlamayan peptit tanımlanmış bunlardan ise 980 adet protein tanımlanmıştır. Miktarları değişen proteinleri tanımlamak için protein

miktarının belirlenmesini mümkün kılan tanımlanan peptitleri spektra sayımına dayalı yöntem ve MRM'ye dayanan yöntem kullanılmıştır. MRM (çoklu reaksiyon izlenmesi) yöntemi ile seçili aday proteinlerin yüksek doğrulukta kantitatif analizinin gerçekleştirilmesi için hedef peptit seçimi yukarıda sonuçlarından bahsedilen LC/MS-MS analizleri ile elde edilen veri setinden ve daha önce kuraklık ve sitokinin cevabıyla ilgili olduğu bilinen proteinler için bilgiler kullanarak gerçekleştirilmiştir. MRM analizleri sonucu yaklaşık olarak 180 proteinin transgenik olmayan kontrol ya da transgenik bitkilerde kuraklık koşulları altında kontrol koşullarına göre 1.4 kattan az ya da çok olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı ifadelendiği tespit edilmiştir (Tablo 5). Yaprak zenginleştirilmiş proteom örneklerinde ise hedef proteinlerin (domates proteinleri ya da aynı proteinlerin farklı bitki türlerindeki homologlarının) nükleusta lokalize oldukları GO ontoloji analizleri (<http://www.pantherdb.org/>) ve literatürden bakılarak doğrulanmıştır sadece nükleusta lokalize olan proteinler seçilmiştir ve bunlardan da 80 proteininin kontrol ya da transgenik bitkilerde kuraklık koşulları altında kontrol koşullarına göre 1.4 kattan az ya da çok olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı ifadelendiği tespit edilmiştir (Tablo 6). Kuraklık stresine cevaben farklı ifadelenen ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde farklı ifadelenen pek çok bitki transgenik bitkilerde de farklı ifadelenmiştir. Tanımlanan tüm proteinlerin ve tanımlanan bu proteinler için GO sınıflandırma kategori bilgileri EK Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir. Yaprak toplam proteomunda 69 protein hem transgenik olmayan kontrolde hem de transgenik bitkilerde farklı ifadelenmiştir. Transgenik bitkilerde 97 proteinin ifadelenmesi azalmış 71'inin ise artmıştır. Transgenik olmayan kontrol bitkilerinde ise 48 proteinin ifadelenmesi azalmış 47 proteinin ise ifadelenmesi artmıştır.

Tablo 5. Yaprak toplam proteinlerinden T19 homozigot hat ve Moneymaker transgenik olmayan kontrol hatlarda kontrol ve kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinler.

Gen ID	Açıklama	T19_Ho_S / T19_H0_K_oranı	T test	MM_S / MM_K_oranı	T test
Solyc03g005780.1.1	Chlorophyll a-b binding protein 3C-like IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	4.130	0.000	-1.668	0.024
Solyc09g011080.2.1	Ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase_oxygenase activase 1 IPR003959 ATPase. AAA-type. core	-2.202	0.006	-3.757	0.000
Solyc02g065400.2.1	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II IPR002628 Photosystem II manganese-stabilizing protein PsbO	-1.718	0.000	-1.113	0.232
Solyc02g071000.1.1	Chlorophyll a_b binding protein IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	1.849	0.002	-1.140	0.121
Solyc07g066600.2.1	Phosphoglycerate kinase IPR001576 Phosphoglycerate kinase	-1.926	0.059	-1.324	0.069

Solyc12g006140.1.1	Chlorophyll a-b binding protein 37. chloroplastic IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	1.301	0.004	-1.434	0.006
Solyc06g071100.2.1	H-ATPase IPR006534 ATPase. P-type. plasma-membrane proton-efflux	-2.337	0.009	-1.258	0.076
Solyc08g006890.2.1	Tubulin alpha-3 chain IPR002452 Alpha tubulin	-2.771	0.007	-1.074	0.390
Solyc07g065840.2.1	Heat shock protein 90 IPR003594 ATP-binding region. ATPase-like IPR001404 Heat shock protein Hsp91	-2.029	0.010	1.243	0.111
Solyc10g081510.1.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase IPR006276 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	-2.093	0.003	1.067	0.286
Solyc09g031780.2.1	Tic110 family transporter chloroplast inner envelope protein Tic111	-2.046	0.012	-1.169	0.053
Solyc07g055060.2.1	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1 IPR015813 Pyruvate_Phosphoenolpyruvate kinase. catalytic core IPR001449 Phosphoenolpyruvate carboxylase	-1.824	0.006	-1.005	0.445
Solyc02g086820.2.1	Carbonic anhydrase IPR015892 Carbonic anhydrase. prokaryotic-like. conserved site	2.170	0.001	-1.256	0.096
Solyc10g080500.1.1	Actin IPR004000 Actin_actin-like	-1.914	0.001	-1.328	0.039
Solyc06g071920.2.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase IPR000173 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-1.749	0.003	-1.006	0.464
Solyc08g079180.2.1	Elongation factor G IPR004540 Translation elongation factor EFG_EF3	-1.548	0.002	-1.396	0.000

Solyc01g105030.2.1	Chlorophyll a-b binding protein. chloroplastic IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	3.865	0.000	-1.180	0.121
Solyc02g085950.2.1	Ribulose biphosphate carboxylase small chain IPR000894 Ribulose biphosphate carboxylase. small chain	4.486	0.000	-1.531	0.134
Solyc10g077040.1.1	Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester IPR008434 Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester aerobic oxidative cyclase	-4.123	0.001	-3.624	0.000
Solyc01g108630.2.1	Nitrite reductase IPR006067 Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S region	-1.900	0.003	-1.666	0.001
Solyc12g011450.1.1	Chlorophyll a-b binding protein 13. chloroplastic IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	2.540	0.000	-1.318	0.000
Solyc10g082030.1.1	Peroxiredoxin IPR000866 Alkyl hydroperoxide reductase_ Thiol specific antioxidant_ Mal allergen	1.928	0.036	-1.072	0.320
Solyc11g056680.1.1	LRR receptor-like serine_ threonine-protein kinase. RLP	-2.151	0.002	1.634	0.020
Solyc03g115980.1.1	Geranylgeranyl reductase IPR011774 Geranylgeranyl reductase. plants and cyanobacteria	-2.956	0.013	-2.262	0.001
Solyc10g086150.1.1	Single-stranded DNA binding protein IPR000504 RNA recognition motif. RNP-2	-2.742	0.003	-1.647	0.001
Solyc07g054210.2.1	Protochlorophyllide reductase like protein IPR005979 Light-dependent protochlorophyllide reductase	-3.085	0.000	-2.652	0.000
Solyc02g079950.2.1	Oxygen-evolving enhancer protein 3 IPR008797 Photosystem II oxygen evolving	5.516	0.000	-1.273	0.054

	complex protein PsbQ				
Solyc12g013710.1.1	Protochlorophyllide reductase IPR005979 Light- dependent protochlorophyllide reductase	-10.072	0.000	-4.608	0.001
Solyc07g017780.2.1	H-ATPase IPR006534 ATPase. P-type. plasma-membrane proton-efflux	-2.203	0.008	-1.345	0.010
Solyc08g067030.2.1	Os01g0611000 protein (Fragment) IPR006946 Protein of unknown function DUF643	-3.515	0.000	-1.769	0.000
Solyc03g111810.2.1	Sieve element- occluding protein 3	-2.386	0.003	-1.217	0.031
Solyc05g054760.2.1	Dehydroascorbate reductase (Fragment) IPR017933 Glutathione S- transferase_chlorid e channel. C- terminal	2.216	0.008	1.639	0.000
Solyc03g113220.2.1	SPFH domain_band 7 family protein IPR001107 Band 7 protein	1.030	0.147	-1.507	0.000
Solyc06g075340.2.1	Carbamoyl- phosphate synthase large chain IPR006275 Carbamoyl phosphate synthase. large subunit. glutamine- dependent	-1.508	0.003	-1.121	0.057
Solyc02g090890.2.1	Zeaxanthin epoxidase. chloroplastic	-1.558	0.022	-1.348	0.002
Solyc04g073990.2.1	Annexin IPR009118 Annexin. type plant	1.656	0.011	3.113	0.004
Solyc12g089210.1.1	Ornithine carbamoyltransfera se IPR002292 Ornithine carbamoyltransfera se	-1.498	0.005	-1.718	0.001
Solyc11g011250.1.1	Chloride intracellular channel 6 IPR017933 Glutathione S- transferase_chlorid e channel. C- terminal	1.558	0.003	1.032	0.292
Solyc07g042440.2.1	Alkyl hydroperoxide reductase_Thiol specific antioxidant family protein	2.152	0.001	1.137	0.052

	IPR000866 Alkyl hydroperoxide reductase_ Thiol specific antioxidant_ Mal allergen				
Solyc09g090330.2.1	Harpin binding protein 1 IPR006843 PAP fibrillin	1.652	0.018	1.079	0.330
Solyc11g010560.1.1	Kinesin-like protein IPR001752 Kinesin. motor region	-1.757	0.001	-1.380	0.000
Solyc01g010580.2.1	Ribosomal protein IPR002942 RNA-binding S4 IPR018079 Ribosomal protein S4. conserved site IPR001912 Ribosomal protein S6	-1.555	0.036	1.499	0.007
Solyc09g009430.2.1	Cell division protein ftsZ IPR000158 Cell division protein FtsZ. N-terminal	-1.366	0.002	-1.283	0.000
Solyc01g060470.2.1	Importin alpha-1b subunit IPR011989 Armadillo-like helical	1.637	0.013	-1.158	0.000
Solyc11g020040.1.1	Chaperone DnaK IPR012725 Chaperone DnaK	1.568	0.012	-1.376	0.100
Solyc12g011280.1.1	Chlorophyll a-b binding protein 8. chloroplastic IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	5.526	0.000	-1.011	0.478
Solyc09g008280.1.1	S-adenosylmethionine synthase IPR002133 S-adenosylmethionine synthetase	-1.595	0.003	-1.353	0.000
Solyc01g007150.2.1	Coatomer subunit beta-1 IPR016460 Coatomer. beta subunit	-1.513	0.008	1.065	0.023
Solyc01g057830.2.1	30S ribosomal protein S1 IPR003029 Ribosomal protein S1. RNA binding domain	-1.118	0.002	1.819	0.000
Solyc08g081010.2.1	Glutamate-cysteine ligase IPR011556 Glutamate--cysteine ligase. plant	-1.589	0.024	-1.476	0.015
Solyc01g097460.2.1	Ribose-5-phosphate isomerase IPR004788 Ribose 5-phosphate isomerase	1.717	0.030	-1.432	0.003

Solyc03g025270.2.1	rRNA 2_apos-O-methyltransferase fibrillarlin IPR000692 Fibrillarlin	-2.175	0.011	1.179	0.094
Solyc10g080710.1.1	Asparaginyl-tRNA synthetase 2 IPR004522 Asparaginyl-tRNA synthetase. class IIb	-2.000	0.001	1.029	0.326
Solyc04g007790.2.1	Major latex-like protein IPR000916 Bet v I allergen	-1.029	0.176	-1.724	0.000
Solyc05g009530.2.1	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex IPR001078 2-oxoacid dehydrogenase acyltransferase. catalytic domain	-1.556	0.005	-1.312	0.000
Solyc06g048410.2.1	Superoxide dismutase IPR019833 Manganese_iron superoxide dismutase. binding site IPR001189 Manganese_iron superoxide dismutase	3.159	0.006	-1.476	0.008
Solyc04g008310.1.1	Glucosyltransferase IPR002213 UDP-glucuronosyl_UDP-glucosyltransferase	-1.732	0.004	1.029	0.296
Solyc03g082940.2.1	Importin subunit beta IPR011989 Armadillo-like helical	-2.354	0.062	-1.058	0.256
Solyc12g009400.1.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit E1 component. alpha subunit. subgroup	-1.894	0.003	-1.617	0.000
Solyc08g006040.2.1	40S ribosomal protein S6 IPR014401 Ribosomal protein S6. eukaryotic	3.315	0.003	-3.379	0.000
Solyc06g082940.2.1	Photosystem I reaction center subunit XI IPR003757 Photosystem I reaction centre. subunit XI PsaL	3.479	0.000	-1.294	0.001
Solyc03g115820.2.1	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase IPR000056 Ribulose-	1.412	0.057	-1.536	0.004

	phosphate 3-epimerase				
Solyc11g022590.1.1	Kunitz trypsin inhibitor 4 (Fragment) IPR002160 Proteinase inhibitor I3. Kunitz legume	2.100	0.003	-9.466	0.013
Solyc12g013810.1.1	Thioredoxin IPR005746 Thioredoxin	2.160	0.001	-1.349	0.020
Solyc03g025320.2.1	Hydroxycinnamoyl transferase IPR003480 Transferase	-2.089	0.005	-1.695	0.000
Solyc06g071290.2.1	Betaine aldehyde dehydrogenase IPR015590 Aldehyde dehydrogenase	1.532	0.006	-1.024	0.415
Solyc08g082280.2.1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase IPR000873 AMP-dependent synthetase and ligase	-2.347	0.001	-1.440	0.029
Solyc06g071000.2.1	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase IPR015590 Aldehyde dehydrogenase	1.842	0.008	2.749	0.000
Solyc03g122310.2.1	Aldehyde dehydrogenase 7b IPR015590 Aldehyde dehydrogenase	-2.399	0.008	-1.792	0.000
Solyc02g086730.1.1	50S ribosomal protein L12-C IPR015608 Ribosomal protein L12. chloroplast	2.149	0.003	1.209	0.002
Solyc12g095760.1.1	Diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase IPR011183 Pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase PfpB	-1.560	0.075	1.524	0.001
Solyc11g012110.1.1	60S ribosomal protein L6 IPR000915 Ribosomal protein L6E	1.380	0.000	1.317	0.006
Solyc02g081170.2.1	Plastid-lipid-associated protein. chloroplastic IPR006843 PAP fibrillin	2.114	0.001	2.130	0.000
Solyc02g093640.2.1	3-ketoacyl-CoA reductase 1 IPR002347	-1.565	0.029	-1.149	0.068

	Glucose_ribitol dehydrogenase				
Solyc01g087040.2.1	Thylakoid lumenal 19 kDa protein. chloroplastic IPR016123 Mog1_PsbP. alpha_beta_alpha sandwich	6.296	0.003	1.163	0.379
Solyc01g011410.1.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit D IPR001135 NADH-quinone oxidoreductase. subunit D	-1.380	0.006	-1.001	0.490
Solyc09g018750.2.1	Inosine-5_apos-monophosphate dehydrogenase IPR000644 Cystathionine beta-synthase. core	1.846	0.004	1.308	0.000
Solyc06g053200.2.1	6-phosphogluconolactonase IPR005900 6-phosphogluconolactonase	-1.008	0.371	1.942	0.000
Solyc06g073090.2.1	Ribosomal subunit interface protein IPR003489 Ribosomal protein S30Ae_sigma 54 modulation protein	-1.262	0.003	-1.588	0.000
Solyc01g060020.2.1	Beta-glucanase IPR000490 Glycoside hydrolase. family 17	-1.700	0.004	-1.522	0.000
Solyc03g005260.2.1	Sulfate adenylyltransferase IPR002650 ATP-sulfurylase	-3.413	0.005	-2.398	0.001
Solyc02g082920.2.1	Endochitinase (Chitinase) IPR000726 Glycoside hydrolase. family 19. catalytic	-0.412	0.001	1.948	0.025
Solyc01g095620.2.1	UDP-glucosyltransferase IPR002213 UDP-glucuronosyl_UDP-glucosyltransferase	-1.668	0.008	-1.159	0.061
Solyc04g054980.2.1	Lipoxygenase homology domain-containing protein 1 IPR001024 Lipoxygenase. LH2	3.702	0.001	1.157	0.346
Solyc04g009540.1.1	50S ribosomal protein L10 IPR001790 Ribosomal protein L12	1.175	0.116	1.525	0.001
Solyc03g120640.2.1	Photosystem I reaction center	3.225	0.002	-1.239	0.193

	subunit VI-1. chloroplatic IPR004928 Photosystem I reaction centre subunit				
Solyc04g071620.2.1	ASR4 (Fragment) IPR003496 ABA_WDS induced protein	6.476	0.006	3.873	0.001
Solyc03g118410.2.1	Acyl carrier protein	-1.282	0.007	-1.004	0.475
Solyc09g014760.2.1	Chlorophyll synthase IPR011799 Chlorophyll synthase. ChIG	2.136	0.010	-1.111	0.325
Solyc07g006650.2.1	Xylose isomerase IPR013452 Xylose isomerase. bacterial type	-1.388	0.021	1.758	0.006
Solyc06g076970.2.1	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase IPR002130 Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase. cyclophilin-type	1.089	0.080	1.579	0.000
Solyc01g011480.1.1	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein IPR000932 Photosystem antenna protein-like	-3.551	0.004	-1.239	0.043
Solyc09g090570.2.1	Proton gradient regulation 5	5.269	0.000	-1.138	0.273
Solyc08g013670.2.1	Photosystem I reaction center subunit IPR008796 Photosystem I reaction centre subunit N	2.744	0.001	-1.214	0.123
Solyc12g056230.1.1	Glutathione peroxidase IPR000889 Glutathione peroxidase	3.335	0.009	1.021	0.429
Solyc11g044530.1.1	PAP fibrillin IPR006843 PAP fibrillin	5.517	0.030	-1.587	0.021
Solyc07g041490.1.1	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein IPR013097 Stress responsive alpha- beta barrel	1.579	0.006	-1.079	0.292
Solyc04g056390.2.1	Isopentenyl- diphosphate delta- isomerase IPR011876 Isopentenyl- diphosphate delta- isomerase. type 3	1.584	0.037	1.636	0.000
Solyc01g010640.2.1	Uncharacterized membrane protein IPR001395 Aldo_keto reductase	-1.124	0.295	-1.483	0.019

Solyc05g049950.2.1	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B IPR017131 Small ribonucleoprotein associated. SmB_SmN	2.271	0.068	1.025	0.408
Solyc08g065490.2.1	Serine hydroxymethyltransferase IPR001085 Serine hydroxymethyltransferase	-1.357	0.019	-1.282	0.004
Solyc01g067290.2.1	NAD-dependent epimerase_dehydratase-binding domain	-2.695	0.002	-1.766	0.000
Solyc03g122180.2.1	mRNA 3-UTR binding protein IPR012677 Nucleotide-binding. alpha-beta plait	1.164	0.034	1.461	0.000
Solyc10g047130.1.1	RNA-binding protein RZ-1 IPR015465 RNA recognition motif. glycine rich protein	-1.330	0.026	1.352	0.014
Solyc01g099830.2.1	60S ribosomal protein L22-2 IPR002671 Ribosomal protein L22e	-1.681	0.000	-1.761	0.000
Solyc06g073190.2.1	Fructokinase-like IPR002173 Carbohydrate_puine kinase. PfkB. conserved site	2.139	0.031	1.161	0.304
Solyc01g095150.2.1	Late embryogenesis abundant protein (Fragment) IPR013990 Water Stress and Hypersensitive response	1.248	0.037	3.243	0.000
Solyc07g006790.2.1	Dihydrolipoalysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex IPR006257 Dihydrolipoamide acetyltransferase. long form	2.172	0.008	-1.099	0.281
Solyc06g060800.2.1	Gibberellin 2-beta-dioxygenase IPR005123 Oxoglutarate and iron-dependent oxygenase	-1.257	0.023	1.627	0.006
Solyc12g014390.1.1	50S ribosomal protein L13 IPR005823 Ribosomal protein L13. bacterial-type	-1.298	0.015	1.492	0.000

Solyc07g041900.2.1	Cathepsin L-like cysteine proteinase IPR013128 Peptidase C1A. papain IPR000169 Peptidase. cysteine peptidase active site	2.103	0.001	3.121	0.000
Solyc04g074750.2.1	Polyadenylate-binding protein 1-A IPR000504 RNA recognition motif. RNP-1	-1.922	0.013	-2.014	0.000
Solyc08g074620.1.1	Polyphenol oxidase IPR016213 Polyphenol oxidase. plant	3.172	0.000	2.834	0.001
Solyc08g006720.2.1	Glutathione peroxidase IPR000889 Glutathione peroxidase	4.408	0.000	-1.289	0.090
Solyc09g092710.2.1	Glycine rich protein IPR010800 Glycine rich	4.914	0.000	2.118	0.000
Solyc02g077880.2.1	Auxin-repressed protein IPR008406 Dormancyauxin associated	3.730	0.000	1.390	0.002
Solyc01g101240.2.1	Aspartic proteinase IPR001461 Peptidase A3	-1.721	0.007	1.793	0.000
Solyc05g053340.2.1	Gibberellin 2-oxidase IPR005123 Oxoglutarate and iron-dependent oxygenase	-1.205	0.130	-1.479	0.001
Solyc06g009020.2.1	Glutathione S-transferase IPR004046 Glutathione S-transferase. C-terminal	3.226	0.000	1.111	0.105
Solyc06g076480.2.1	Pentapeptide repeat-containing protein IPR001646 Pentapeptide repeat	1.174	0.033	2.265	0.005
Solyc01g100570.2.1	Nucleolar protein IPR002687 Pre-mRNA processing ribonucleoprotein. binding region	-1.984	0.000	1.270	0.037
Solyc06g005260.2.1	Cytoplasmic glutaredoxin thioltransferase glutathione-dependent disulfide oxidoreductase IPR011899 Glutaredoxin. eukaryotic and viruses	2.204	0.002	-1.199	0.003
Solyc02g036350.2.1	1-aminocyclopropane -1-carboxylate	2.238	0.000	2.783	0.000

	oxidase IPR005123 Oxoglutarate and iron-dependent oxygenase				
Solyc07g063190.2.1	Thioredoxin IPR005746 Thioredoxin	2.493	0.002	1.086	0.217
Solyc06g071050.2.1	Spfh domain _ band 7 family protein IPR01107 Band 7 protein	-1.781	0.002	-1.192	0.108
Solyc06g073540.2.1	Argonaute 4-like protein IPR003165 Stem cell self- renewal protein Piwi	2.115	0.000	-1.361	0.015
Solyc03g082920.2.1	Heat shock protein IPR013126 Heat shock protein 72	-2.011	0.002	-1.035	0.297
Solyc12g094430.1.1	Glutathione S- transferase IPR004046 Glutathione S- transferase. C- terminal	2.290	0.000	-1.200	0.044
Solyc01g007740.2.1	Peroxiredoxin IPR000866 Alkyl hydroperoxide reductase_ Thiol specific antioxidant_ Mal allergen	1.981	0.010	1.052	0.243
Solyc02g079500.2.1	Peroxidase IPR019793 Peroxidases heam- ligand binding site IPR019794 Peroxidase. active site IPR002016 Haem peroxidase. plant_fungal_bacter ial	-2.497	0.000	-1.487	0.000
Solyc09g090430.2.1	Cyanate hydratase IPR008076 Cyanase	2.253	0.004	1.041	0.274
Solyc10g006970.2.1	Thioredoxin m IPR005746 Thioredoxin	2.836	0.001	-1.224	0.110
Solyc01g100520.2.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit IPR018215 Peptidase S14. ClpP. active site	2.237	0.005	-1.022	0.428
Solyc01g088610.2.1	chaperonin IPR001476 Chaperonin Cpn12	1.546	0.001	1.010	0.442
Solyc01g112000.2.1	Expansin-like protein IPR007112 Expansin 45. endoglucanase-like IPR007117 Pollen allergen_expansin. C-terminal	2.819	0.000	-1.050	0.396
Solyc03g097910.2.1	Dihydroorotate dehydrogenase family protein	1.325	0.004	2.086	0.000

	IPR005720 Dihydroorotate dehydrogenase. class 1. core				
Solyc06g049080.2.1	Superoxide dismutase IPR001189 Manganese_iron superoxide dismutase	2.342	0.005	1.049	0.267
Solyc12g013900.1.1	CT099 (Fragment) IPR003245 Plastocyanin-like	5.306	0.006	3.550	0.010
Solyc08g080640.1.1	Osmotin-like protein (Fragment) IPR017949 Thaumatococcus conserved site IPR001938 Thaumatococcus pathogenesis- related	2.591	0.014	1.522	0.193
Solyc01g021670.2.1	POT family domain containing protein expressed IPR007493 Protein of unknown function DUF538	-1.144	0.222	1.786	0.002
Solyc10g055200.1.1	Disease resistance response IPR004265 Plant disease resistance response protein	-2.312	0.005	-1.559	0.003
Solyc06g065490.2.1	PsbP domain- containing protein 6. chloroplastic IPR016123 Mog1_PsbP. alpha_beta_alpha sandwich	3.353	0.005	1.168	0.209
Solyc05g015390.2.1	REF-like stress related protein 1 IPR008802 Rubber elongation factor	5.540	0.006	2.916	0.000
Solyc11g044910.1.1	Beta-xylosidase 1 IPR001764 Glycoside hydrolase. family 3. N-terminal	1.385	0.003	1.296	0.000
Solyc10g078920.1.1	Thioredoxin-like 5 IPR013766 Thioredoxin domain	1.800	0.004	-1.546	0.004
Solyc04g080850.2.1	Thioredoxin IPR015467 Thioredoxin. core	5.885	0.024	1.916	0.001
Solyc01g096240.2.1	Homology to unknown gene	2.521	0.027	-1.330	0.012
Solyc07g064600.2.1	Endoribonuclease L-PSP family protein IPR019897 YjgF-like protein. conserved site	9.540	0.000	2.020	0.007
Solyc11g069040.2.1	Lactoylglutathione lyase IPR004361 Glyoxalase	3.030	0.001	1.496	0.005

Solyc10g075100.1.1	Non-specific lipid-transfer protein IPR000528 Plant lipid transfer protein_Par allergen	26.368	0.000	6.665	0.006
Solyc03g019820.2.1	Aquaporin IPR012269 Aquaporin	93.626	0.002	9.087	0.000
Solyc08g023440.2.1	Early-responsive to dehydration 4 IPR003864 Protein of unknown function DUF223	1.431	0.000	2.551	0.002
Solyc01g006900.2.1	Phosphatidylglycerol_phosphatidylinositol transfer protein IPR003172 MD-2-related lipid-recognition	2.156	0.003	1.341	0.004
Solyc01g108910.2.1	COSII_At2g15890 (Fragment)	1.981	0.000	6.972	0.000
Solyc01g007580.2.1	30S ribosomal protein S8 IPR000630 Ribosomal protein S10	-2.209	0.002	1.139	0.124
Solyc01g067740.2.1	Superoxide dismutase IPR001424 Superoxide dismutase. copper_zinc binding	2.708	0.005	5.527	0.000
Solyc01g105410.2.1	Os06g0220000 protein (Fragment) IPR006766 Phosphate-induced protein 1 conserved region	-1.113	0.163	-2.447	0.002
Solyc01g106480.2.1	Malate dehydrogenase IPR010097 Malate dehydrogenase. NAD-dependent. eukaryotes and gamma proteobacteria	-2.152	0.001	-1.920	0.001
Solyc01g106820.2.1	Peptidase M50 family	1.477	0.004	2.116	0.002
Solyc01g111630.2.1	Glyoxylate_hydroxy pyruvate reductase B IPR006140 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase. NAD-binding	-1.862	0.003	-1.649	0.000
Solyc02g082760.2.1	Catalase IPR018028 Catalase related subgroup	-2.147	0.001	-3.364	0.000
Solyc05g013850.2.1	Sieve element-occluding protein 3	-1.905	0.001	-1.101	0.275
Solyc07g008800.2.1	chaperonin IPR001476 Chaperonin Cpn10	1.840	0.001	1.391	0.001

Solyc06g063370.2.1	Chlorophyll a-b binding protein 1A. chloroplastic IPR001344 Chlorophyll A-B binding protein	2.184	0.018	-1.356	0.005
Solyc06g064470.2.1	Ribosomal protein L7a IPR001921 Ribosomal protein L7A	-1.020	0.097	1.662	0.000
Solyc06g069030.2.1	PAP fibrillin domain containing protein expressed	-1.263	0.015	-1.781	0.000
Solyc07g053280.2.1	Ketol-acid reductoisomerase IPR016206 Ketol-acid reductoisomerase. plant	-1.522	0.033	-1.148	0.008
Solyc07g053540.1.1	Fasciclin-like arabinogalactan protein 4 IPR000782 FAS1 domain	-1.558	0.000	1.251	0.086
Solyc08g042050.2.1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3 IPR011545 DNA_RNA helicase. DEAD_DEAH box type. N-terminal	-2.587	0.008	1.036	0.375
Solyc08g076970.2.1	Acetylmithine deacetylase or succinyl-diaminopimelate desuccinylase IPR011650 Peptidase M20. dimerisation	2.312	0.002	1.366	0.008
Solyc10g008140.2.1	Prohibitin 1-like protein IPR000163 Prohibitin	3.142	0.075	1.175	0.228
Solyc10g008740.2.1	Magnesium chelatase ATPase subunit I IPR011775 Magnesium chelatase. ATPase subunit I	-2.569	0.000	-2.442	0.000
Solyc10g086760.1.1	Tubulin beta chain IPR002453 Beta tubulin	-2.355	0.014	1.481	0.114
Solyc12g056220.1.1	Aquaporin IPR012269 Aquaporin	-1.230	0.003	-2.165	0.004
Solyc12g094620.1.1	Catalase IPR018028 Catalase related subgroup	-1.732	0.003	-2.352	0.000
Solyc01g109660.2.1	Glycine-rich RNA-binding protein IPR015465 RNA recognition motif. glycine rich protein	-1.566	0.001	1.314	0.000

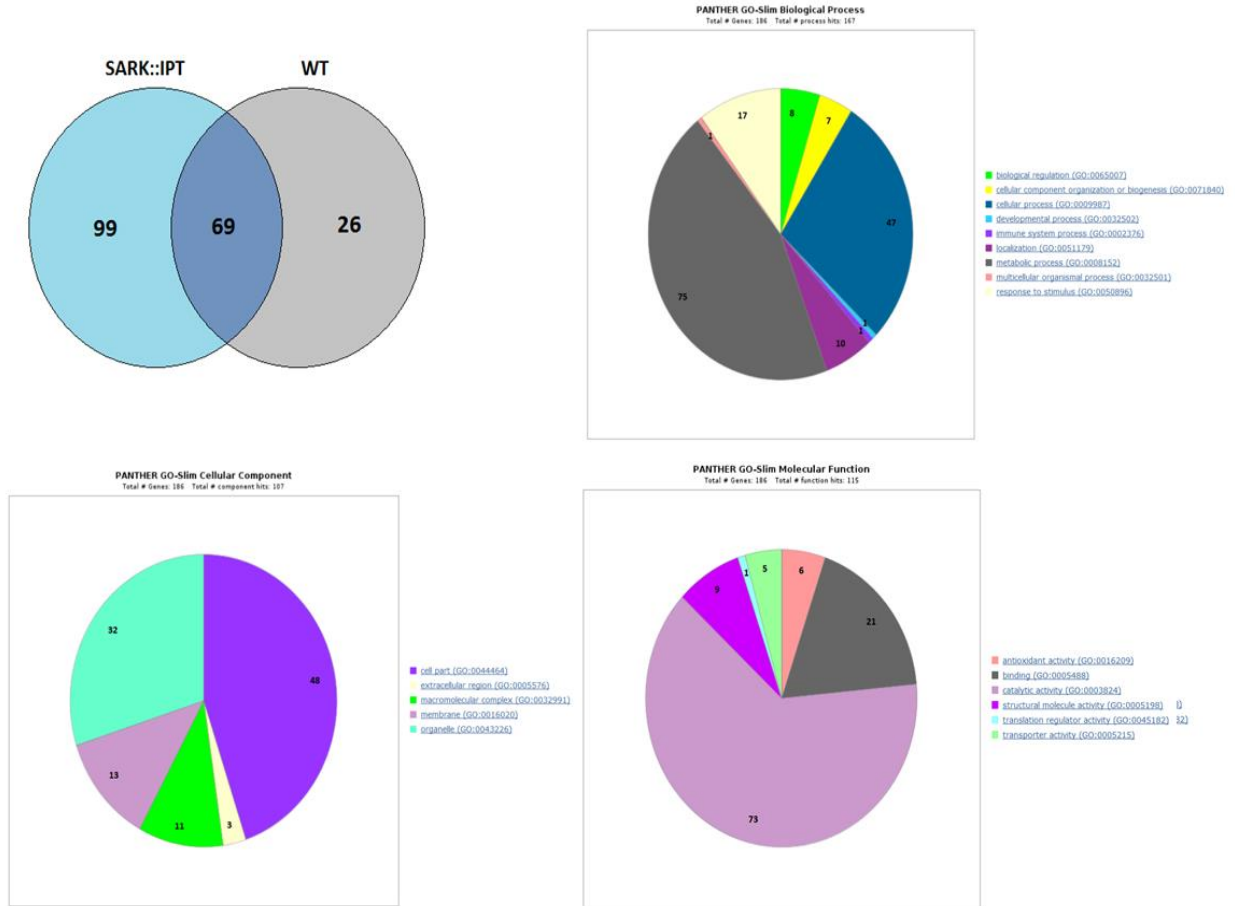
Solyc02g030170.2.1	FAD linked oxidase domain protein IPR006094 FAD linked oxidase. N-terminal	-1.730	0.005	1.234	0.002
Solyc02g064940.1.1	LRR receptor-like serine_threonine-protein kinase. RLP	-1.636	0.000	-1.455	0.001
Solyc06g050980.2.1	Ferritin IPR001519 Ferritin. N-terminal	1.547	0.004	1.822	0.002
Solyc08g079870.1.1	Subtilisin-like protease IPR015500 Peptidase S8. subtilisin-related IPR000209 Peptidase S8 and S53. subtilisin. kexin. sedolisin	-2.606	0.039	-1.762	0.000
Solyc09g007850.2.1	RNA-binding protein IPR000504 RNA recognition motif. RNP-1	-1.400	0.012	-2.883	0.002
Solyc11g069800.1.1	cytochrome P452	-2.328	0.001	-1.339	0.001
Solyc01g008330.2.1	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase IPR004549 Acetyl-CoA carboxylase. biotin carboxylase	-2.260	0.005	-1.207	0.053
Solyc01g059930.2.1	Universal stress protein IPR006016 UspA	1.041	0.258	1.642	0.000
Solyc01g096590.2.1	30S ribosomal protein S10 IPR005729 Ribosomal protein S10. eukaryotic_archaea I	-1.137	0.019	1.512	0.000
Solyc03g082890.2.1	Pentapeptide repeat protein IPR001646 Pentapeptide repeat	1.446	0.003	1.137	0.018
Solyc03g114340.2.1	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase IPR003821 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	-1.829	0.049	-2.112	0.000
Solyc03g115020.2.1	Unknown Protein IPR009500 Protein of unknown function DUF1120	-1.446	0.035	-1.681	0.000
Solyc03g118240.2.1	Magnesium-protoporphyrin ix methyltransferase IPR010251 Magnesium protoporphyrin O-methyltransferase	-1.950	0.001	-1.529	0.000
Solyc03g118510.2.1	Receptor like kinase. RLK	-1.784	0.005	-1.411	0.001

Solyc04g005700.2.1	Major latex-like protein IPR000916 Bet v I allergen	2.236	0.002	1.105	0.210
Solyc04g012120.2.1	14-3-3 protein beta_alpha-1 IPR000308 14-3-3 protein	-1.945	0.000	-1.189	0.014
Solyc06g007760.2.1	Ycf54 protein IPR019616 Protein of unknown function DUF2490	-1.482	0.003	-1.611	0.000
Solyc06g068220.2.1	Hydrolase alpha_beta fold family protein IPR000639 Epoxide hydrolase-like	-1.846	0.008	-1.970	0.000
Solyc09g010630.2.1	heat shock protein IPR013126 Heat shock protein 72	-2.730	0.006	-1.127	0.193
Solyc11g069380.1.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase IPR017178 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase. atypical	-2.231	0.005	-1.461	0.024
Solyc12g042060.1.1	ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit IPR013093 ATPase associated with various cellular activities. AAA-2	-2.406	0.045	-1.214	0.002
Solyc12g099930.1.1	Serine-glyoxylate aminotransferase IPR000192 Aminotransferase. class V_Cysteine desulfurase	-1.983	0.009	-1.954	0.000

Elde edilen proteomik verilerin fonksiyonel GO açıklayıcı ve sınıflandırma analizleri PANTHER veritabanına dayanılarak gerçekleştirilmiştir. PANTHER biyolojik fonksiyon analizlerine göre 186 farklı ifadelenen proteinden 167 (%89.8)'i fonksiyonlarına göre gruplara ayrılabilmiştir (Şekil 26). Gruplara ayrılan proteinlerden büyük çoğunluğu metabolik (75 protein) ve hücrel (47 protein) işlevler ile ilgili oldukları tespit edilmiştir. Diğer önemli kategoriler sırası ile 17 ve 10 protein ile uyarıma tepki ve lokalizasyon ile ilgili proteinlerdir. Toplamda 115 proteinin (toplamda tanımlanan proteinlerin %67'si) ise PANTHER veritabanı analizleri sonucunda moleküler fonksiyonlarına göre gruplara ayrılmıştır. Moleküler fonksiyon sınıflandırmalarına göre en büyük grubu 73 protein ile katalitik aktiviteye sahip proteinler oluşturmuştur (Şekil 26). Diğer protein grupları ise bağlanma (21 protein), yapısal molekül (9), antioksidan (6) ve transporter (5)'lerden oluşmuştur. PANTHER veritabanı analizleri sonucunda yalnızca 107 (%57) farklı ifadelenen protein hücrel kompartmanına göre gruplara ayrılabilmiştir. Bu grupta en çok bulunan proteinler hücre (48), organeller (32), membranlar (13) ve makromolekül kompleksleri (11)' den oluşmaktadır (Şekil 26) .

Elde edilen proteomik verisinde hangi GO fonksiyonel grubuna ait proteinlerin daha çok görüldüğünü belirlemek için fonksiyonel fazla ifadelene testi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu analiz sonucunda yaprak toplam proteomunda sülfür bileşikleri metabolik işlemleri, abiyotik uyarıma tepki, protein katlanması ve birincil metabolizma ile ilgili proteinlerin veri setinde en çok görülen proteinler olduğu PANTHER GO-Slim biyolojik işlem gruplandırmasına göre tespit

edilmiştir (Şekil 28). Veri setindeki sülfür bileşikleri metabolik işlemler grubundaki proteinleri daha çok tiyoredoksin ailesinden proteinler oluşturmakta ve bunlarında proteinlere yönelik oksidatif stresin önlenmesi ile ilgili ve chaperon fonksiyonuna sahip olmaları açısından kuraklık stresi açısından önem arz ettikleri açıktır. Gerçekleştirilen GO biyolojik işlem gruplaması gen zenginleştirme analizlerinde ise klorofil biyosentezi 100 kat; izopentenil difosfat biyosentez işlemi 64 kat; gliserol eter metabolik prosesi 41 kat; pentoz fosfat yanyolağı 36 kat; fotosentez ve ışık mahsülü reaksiyonları 29 kat; oksidatif strese karşı hücresel tepki 26 kat ve protein kromofor bağlanması 19 kat olacak şekilde bulunmuştur (EK Tablo 3). Verisinde zenginleştiği görülen protein yollarında oksidatif strese karşı hücresel tepki ile ilişkili proteinlerin kuraklık stresine dirençte önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mitter, 2002). Ayrıca, yapılan çalışmalarda fotosentez ile ilgili yolların sitokininler tarafından önemli bir şekilde regüle edildiği bilinmektedir (Rivero vd., 2009). Özellikle klorofil bağlayan proteinlerin (Klorofil a/b bağlama proteinleri) transgenik bitkilerde kuraklık koşulları altında daha fazla ifadelendiği görülmüştür; bu durumda, fotosentetik mekanizmanın verimli bir şekilde sürdürülmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, bu proteinlerin stres koşullarına tolerans için daha fazla ifadelenebilir durumlarının mevcut olduğu daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Xu vd., 2012). İzopentenil difosfat biyosentez yolağı ise daha çok sekonder izopren grubu moleküllerin biyosentezinde önem taşımaktadır. Klorofil, karotenoidler ve bazı hormonlar (jasmonik asit ve sitokinlerden bazıları) bu gruba girmektedir (Xu vd., 2012). Bu grubun proje kapsamında geliştirilen verisinde yoğun olarak görülmesi ise bu grup proteinlerin sitokininler tarafından regüle edildiği ve kuraklık koşullarına dirençte önemli rol oynayabilecekleri anlamına gelmektedir.



Şekil 26. Yaprak toplam proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde farklı kuraklık koşullarında farklı ifalenen proteinlerin sayısı ve test edilen bitki grupları arasındaki dağılımı, biyolojik işlev, hücre komponenti ve moleküler işlevlerine göre GO sınıflandırmaları.

Tablo 6. T19 homozigot hat ve Moneymaker transgenik olmayan kontrol hatlarda kontrol ve kuraklık koşullarında yaprak nükleer proteomunda farklı ifadelenen proteinler

Gen ID	Açıklama	MM_S / MM_K_oranı	T test	T19_Ho_S / T19_Ho_K_ oranı	T test
Solyc09g009030.2.1	1 Histone deacetylase 2a-like IPR007087 Zinc finger, C2H2-type	-2.51	0.00	1.06	0.08
Solyc01g107870.2.1	1 Poly(A) RNA binding protein IPR006515 Polyadenylate binding protein, human types 1, 2, 3, 4	-2.16	0.00	-2.99	0.00
Solyc02g014770.2.1	1 Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6 IPR000330 SNF2-related	-2.07	0.00	1.05	0.30
Solyc03g114370.2.1	1 Atp-dependent RNA helicase IPR011545 DNA_RNA helicase, DEAD_DEAH box type, N-terminal	-1.99	0.00	-3.04	0.01
Solyc03g123530.2.1	1 CCAAT-box-binding transcription factor-like protein IPR005612 CCAAT-binding factor	-1.80	0.02	2.08	0.00
Solyc07g047670.2.1	1 Pescadillo homolog 1 IPR010613 Pescadillo, N-terminal	-1.75	0.01	-2.21	0.00
Solyc12g014210.1.1	1 RNA binding protein IPR000504 RNA recognition motif, RNP-1	-1.75	0.00	1.73	0.07
Solyc01g007070.2.1	1 BEL1-like homeodomain protein 1 IPR006563 POX	-1.73	0.06	1.70	0.01
Solyc02g064700.2.1	1 Protein serine_threonine kinase IPR002290 Serine_threonine protein kinase	-1.68	0.00	1.00	0.49
Solyc02g067210.2.1	1 Nucleic acid binding protein IPR018111 K Homology, type 1, subgroup	-1.65	0.00	-1.24	0.00
Solyc12g015880.1.1	1 Heat shock protein 90 IPR019805 Heat shock protein Hsp90, conserved site IPR018249 EF-HAND 2 IPR001404 Heat shock protein Hsp90	-1.65	0.00	-1.20	0.02

Solyc02g081010.1.1	1 Transcription factor jumonji domain-containing protein IPR013129 Transcription factor jumonji	-1.64	0.00	1.00	0.50
Solyc03g082960.2.1	1 Serine_threonine phosphatase family protein IPR015655 Protein phosphatase 2C	-1.57	0.01	1.54	0.08
Solyc04g051370.2.1	1 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 IPR000717 Proteasome component region PCI	-1.57	0.01	-1.17	0.11
Solyc00g323130.2.1	1 Major latex-like protein IPR000916 Bet v I allergen	-1.42	0.00	-1.64	0.02
Solyc01g014850.2.1	1 Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 IPR018111 K Homology, type 1, subgroup	-1.32	0.01	1.25	0.00
Solyc11g072340.1.1	1 Arginine_serine-rich splicing factor IPR000504 RNA recognition motif, RNP-1	-1.24	0.15	-1.78	0.02
Solyc02g087400.1.1	1 Ankyrin repeat domain containing protein IPR002110 Ankyrin	-1.23	0.15	-2.17	0.00
Solyc02g091960.2.1	1 Nuclear matrix constituent protein 2	-1.14	0.33	-1.66	0.00
Solyc06g063140.2.1	1 26S protease regulatory subunit 7 IPR005937 26S proteasome subunit P45	-1.13	0.14	-2.12	0.00
Solyc07g052900.1.1	1 Os09g0451700 protein (Fragment) IPR007592 Protein of unknown function DUF573	-1.03	0.42	-3.94	0.00
Solyc09g075200.2.1	1 U1 small nuclear ribonucleoprotein A IPR012677 Nucleotide-binding, alpha-beta plait	-1.01	0.48	-1.69	0.04
Solyc04g007070.2.1	1 Cc-nbs-Irr, resistance protein	1.01	0.46	-1.52	0.00
Solyc06g052030.2.1	1 Importin subunit beta IPR011989 Armadillo-like helical	1.01	0.48	-1.45	0.00
Solyc11g011130.1.1	1 THO complex subunit 4 IPR012677 Nucleotide-binding, alpha-beta plait	1.05	0.16	-1.63	0.02
Solyc01g107330.2.1	1 SWIB_MDM2 domain protein	1.06	0.28	-3.36	0.05

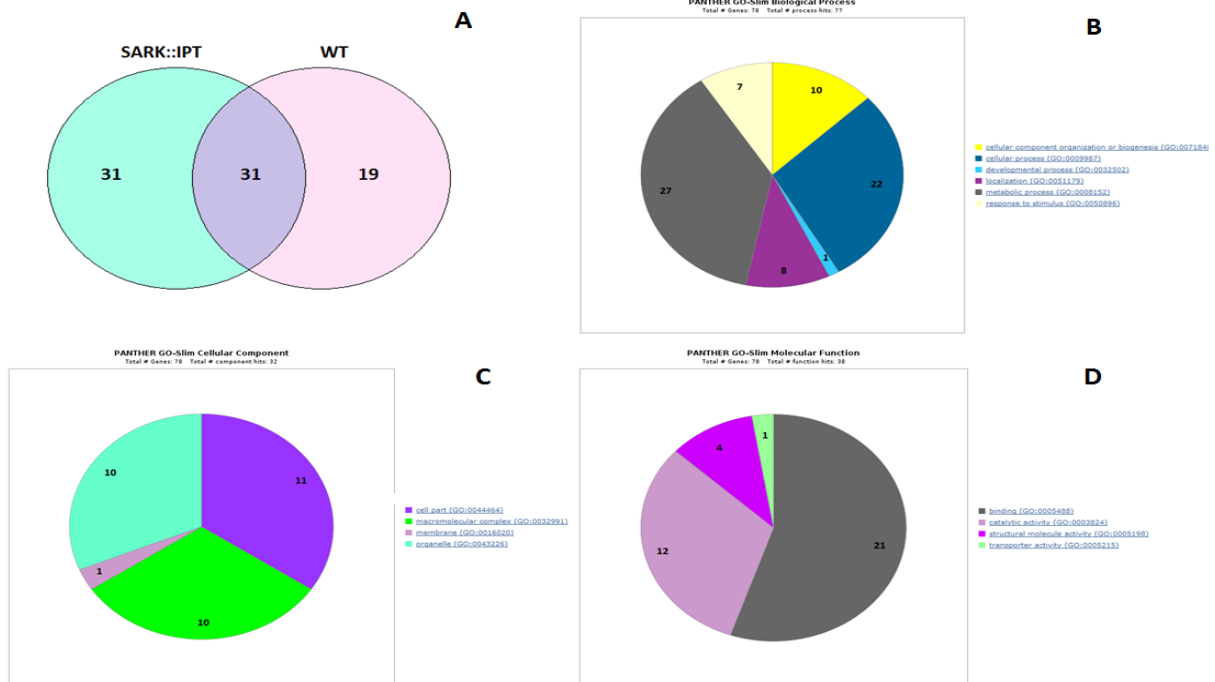
	IPR019835 SWIB domain				
Solyc01g014210.1.1	1 ADP ATP carrier protein-like IPR002113 Adenine nucleotide translocator 1	1.08	0.03	-1.60	0.01
Solyc03g097370.2.1	1 DNA helicase-like IPR003593 ATPase, AAA+ type, core	1.10	0.17	-1.94	0.00
Solyc04g071320.2.1	1 Protein FAM188A IPR003903 Ubiquitin interacting motif	1.11	0.38	-4.85	0.00
Solyc01g066840.2.1	1 40S ribosomal protein S21 IPR001931 Ribosomal protein S21e	1.17	0.01	1.80	0.00
Solyc03g007670.2.1	1 SGT1 IPR007699 SGS	1.25	0.01	-1.85	0.05
Solyc04g008520.2.1	1 Outer envelope protein	1.32	0.07	-2.52	0.02
Solyc07g066030.2.1	1 Proteasome activator subunit 4-like IPR016024 Armadillo-type fold	1.34	0.00	-1.48	0.00
Solyc05g006170.2.1	1 NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5 IPR003590 Leucine-rich repeat, ribonuclease inhibitor subtype	1.38	0.08	-2.44	0.04
Solyc03g118020.2.1	1 Tudor _ nuclease domain-containing protein IPR016685 RNA-induced silencing complex, nuclease component Tudor-SN	1.44	0.00	-1.29	0.01
Solyc12g043110.1.1	1 Heat shock protein 4 IPR013126 Heat shock protein 70	1.46	0.00	1.11	0.28
Solyc09g011450.2.1	1 cDNA clone J075093E01 full insert sequence IPR013886 PI31 proteasome regulator	1.47	0.01	-1.67	0.00
Solyc01g009090.2.1	1 Serrate RNA effector molecule homolog	1.50	0.01	-1.40	0.01
Solyc05g007100.2.1	1 DNA-binding protein p24 IPR013742 Plant transcription factor	1.52	0.00	1.21	0.09
Solyc02g068100.2.1	1 SWI_SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily d member 1	1.53	0.00	-1.46	0.02

	IPR019835 SWIB domain				
Solyc08g080580.2.1	1 Myb IPR015495 Myb transcription factor	1.55	0.01	1.43	0.01
Solyc01g006940.2.1	1 Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 IPR003954 RNA recognition, region 1	1.55	0.00	-1.42	0.02
Solyc11g008500.1.1	1 Actin IPR004000 Actin_actin-like	1.55	0.01	-1.86	0.00
Solyc10g078630.1.1	1 40S ribosomal protein S28 IPR000289 Ribosomal protein S28e	1.56	0.00	-1.06	0.32
Solyc04g005020.2.1	1 WD-40 repeat family protein IPR020472 G-protein beta WD-40 repeat, region	1.56	0.00	-1.13	0.20
Solyc03g121500.2.1	1 Myosin-like protein	1.56	0.00	1.66	0.00
Solyc09g013100.2.1	1 RNA binding protein	1.56	0.00	-1.18	0.10
Solyc06g076520.1.1	1 class I heat shock protein IPR002068 Heat shock protein Hsp20	1.61	0.00	1.83	0.00
Solyc01g097010.2.1	1 Nucleic acid binding protein IPR018111 K Homology, type 1, subgroup	1.62	0.00	-1.33	0.06
Solyc09g092380.2.1	1 Adenosylhomocysteinase IPR000043 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1.68	0.00	1.08	0.04
Solyc04g054880.2.1	1 BZIP transcription factor IPR006867 Protein of unknown function DUF632	1.70	0.00	-1.01	0.44
Solyc02g089260.2.1	1 E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 IPR013993 Zinc finger, N-recogin, metazoa	1.72	0.00	1.15	0.28
Solyc01g099770.2.1	1 Translationally-controlled tumor protein homolog IPR001983 Translationally controlled tumour-associated TCTP	1.72	0.00	-1.93	0.00
Solyc04g014460.2.1	1 RNA binding protein IPR012677 Nucleotide-binding, alpha-beta plait	1.75	0.01	-1.65	0.00
Solyc01g099110.2.1	1 Xaa-pro aminopeptidase IPR000994 Peptidase M24, structural domain	1.75	0.01	-1.99	0.01

Solyc08g015690.2.1	1 Late-embryogenesis abundant protein 2 IPR013990 Water Stress and Hypersensitive response	1.76	0.06	-1.45	0.15
Solyc01g091460.2.1	1 ARF guanine-nucleotide exchange factor 2 IPR000904 SEC7-like	1.78	0.00	1.00	0.48
Solyc11g045180.1.1	1 ATP-dependent RNA helicase IPR001650 DNA_RNA helicase, C-terminal	1.82	0.02	-1.85	0.01
Solyc01g100320.2.1	1 Thioredoxin_protein disulfide isomerase IPR005788 Disulphide isomerase	1.86	0.01	-1.41	0.02
Solyc03g111840.2.1	1 Polyadenylate-binding protein 1-like IPR000504 RNA recognition motif, RNP-1	1.92	0.00	-1.32	0.00
Solyc09g090520.2.1	1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 IPR012677 Nucleotide-binding, alpha-beta plait	1.93	0.01	1.32	0.12
Solyc09g082320.2.1	1 Proteasome subunit beta type IPR001353 Proteasome, subunit alpha_beta	1.94	0.00	-1.21	0.01
Solyc02g093170.2.1	1 Cyclin delta-3	1.95	0.00	-1.53	0.06
Solyc05g009600.2.1	1 Phosphatase 2A regulatory A subunit IPR011989 Armadillo-like helical	1.95	0.03	-1.89	0.00
Solyc10g081030.1.1	1 Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein IPR016641 Nascent polypeptide-associated complex, alpha subunit	1.96	0.01	-1.47	0.03
Solyc03g117780.2.1	1 UV excision repair protein RAD23 IPR004806 UV excision repair protein Rad24	2.01	0.02	2.72	0.00
Solyc01g009080.2.1	1 FHA domain containing protein IPR000253 Forkhead-associated	2.04	0.00	-2.11	0.00

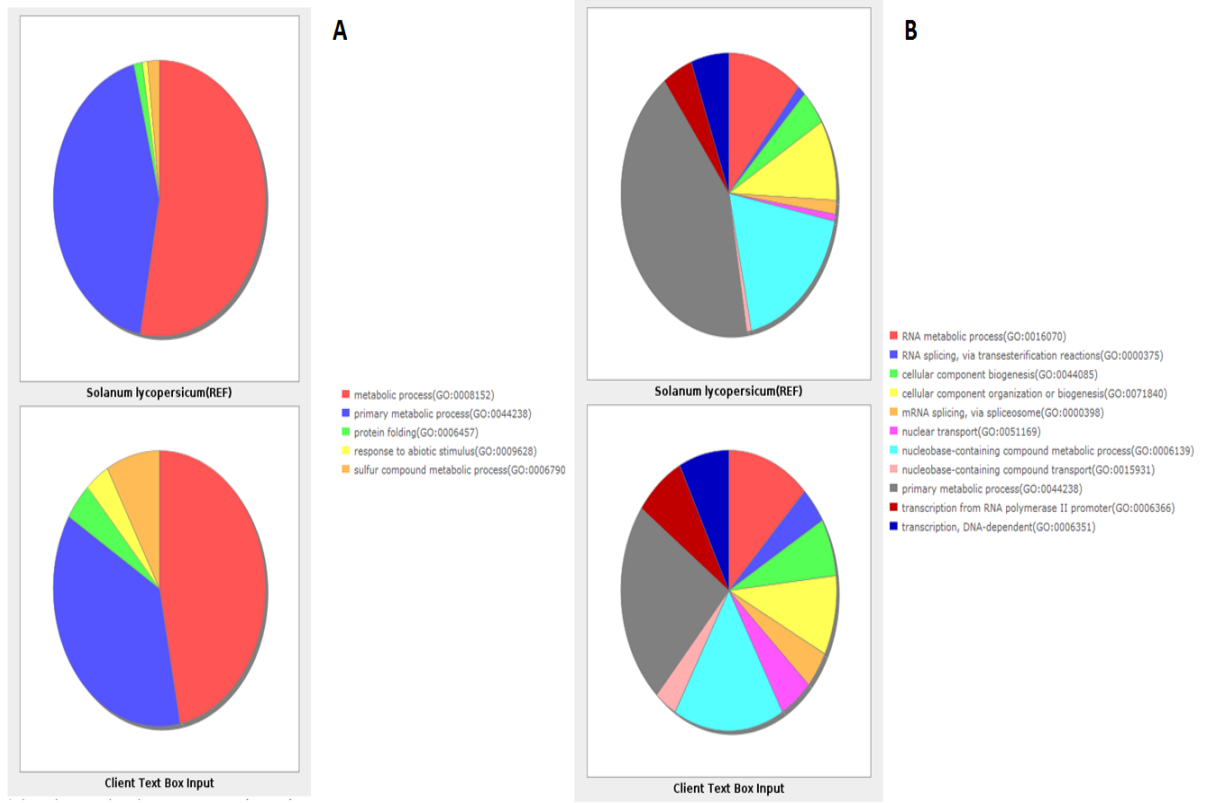
Solyc06g008150.2.1	1 Ulp1 peptidase-like IPR015410 Region of unknown function DUF1985	2.07	0.00	1.85	0.01
Solyc11g068640.1.1	1 Os11g0175900 protein (Fragment) IPR016024 Armadillo-type fold	2.08	0.00	1.06	0.33
Solyc06g062350.2.1	1 Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvB IPR010339 TIP49, C-terminal	2.16	0.00	-1.01	0.46
Solyc01g049680.2.1	1 Transcriptional activator protein Pur-alpha IPR006628 PUR-alpha_beta_gamma , DNA_RNA-binding	2.31	0.01	-1.03	0.43
Solyc04g009410.2.1	1 Penescence-associated protein DIN1 IPR001763 Rhodanese-like	2.52	0.00	1.06	0.38
Solyc02g084240.2.1	1 H1 histone-like protein IPR005818 Histone H1_H6	3.12	0.00	1.32	0.00
Solyc04g082200.2.1	1 Dehydrin IPR000167 Dehydrin	6.22	0.00	1.30	0.10

Yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteomundan ise 78 (%98.7) protein biyolojik işlevlerine göre gruplara ayrılabilmiştir. Toplam proteom analizlerine benzer şekilde en çok görülen grup metabolik (22) ve hücrel (22) işlevler olarak bulunmuştur (Şekil 27). Yine önemli miktarda protein hücrel komponent organizasyonu ve lokalizasyon ve uyarana tepki gruplarına ayrılmıştır. Farklı ifadelen proteinlerden yalnızca %48.7'si moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılabilmiştir. Bu proteinlerden yarısından çoğunun (21 protein) bağlanma aktivitesi ve çok az proteinin ise katalitik ve yapısal molekül aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Yaklaşık olarak proteinlerden %81 ise nükleik asit bağlama ile ilgili fonksiyona sahip oldukarı belirlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. Yaprak nükleer zenginleştirilmiş proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde farklı kuraklık koşullarında farklı ifalenen proteinlerin sayısı ve test edilen bitki grupları arasındaki dağılımı, biyolojik işlev, hücre komponenti ve moleküler işlevlerine göre GO sınıflandırmaları.

Kuraklık koşullarında transgenik olmayan kontrol ya da transgenik bitkilerde farklı ifadelenen yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteom verisetinde de PANTHER gen zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, verisetinde nükleer transport proteini 22.5 kat, transesterifikasyon ile RNA splicing 12 kat ve RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyon 6 kat daha yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 28; EK Tablo 4).



Şekil 28. Yaprak toplam ve yaprak nükleer zenginleştirilmiş proteome analizleri sonucunda transgenik ve kontrol bitkilerde kuraklık koşullarında farklı ifalenen için yapılan GO gen zenginleştirme analiz sonuçları. A. Yaprak toplam proteomu. B. Yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteomu.

Domates proteinlerinin tanımlanması ve GO gruplandırılması ile ilgili veritabanlarının yetersizliğinden ötürü tanımlanan pek çok protein gruplara ayıramamış ya da haklarında bu veri tabanlarında oldukça kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteomunda farklı ifadelenen 16 proteinin transkripsiyon faktörleri oldukları domates için veya bu proteinlerin Arabidopsis homologları kullanılarak veritabanı aramaları ve literatür taraması ile belirlenmiştir. Proje kapsamında geliştirilen verisetinde farklı ifadelendiği tespit edilen transkripsiyon faktörleri aşağıda sıralanmıştır:

- Solyc09g009030.2.1 (Histone deacetylase 2a-like IPR007087),
- Solyc02g014770.2.1 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein),
- Solyc03g123530.2.1 (CCAAT-box-binding transcription factor-like),
- Solyc01g007070.2.1 (BEL1-like homeodomain protein),
- Solyc02g081010.1.1(Transcription factor jumonji domain-containing protein),
- Solyc01g014850.2.1 (Zinc finger CCCH domain-containing protein),

- Solyc07g052900.1.1 (Os09g0451700 protein),
- Solyc01g107330.2.1 (SWIB_MDM2 domain protein),
- Solyc05g007100.2.1 (DNA-binding protein p24),
- Solyc02g068100.2.1 (SWI_SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily d member),
- Solyc08g080580.2.1 (Myb IPR015495),
- Solyc04g054880.2.1 (BZIP transcription factor IPR006867 1.7 1),
- Solyc01g009080.2.1 (FHA domain containing protein),
- Solyc01g049680.2.1 (Transcriptional activator protein Pur-alpha IPR006628),
- Solyc02g081010.1.1 (Transcription factor jumonji domain-containing protein),
- Solyc10g081030.1.1 (nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein)

Transkripsiyon faktörü aktivitesi bulunan Solyc09g009030.2.1 geni Histone deacetylase 2a benzeri protein kodlamaktadır. Bu da transgenik bitkilerde kuraklık koşullarında 2.5 kat ifadelenmesi azalmıştır ancak ifadelenme düzeyi transgenik olmayan kontrol bitkilerde değişmemiştir. Histonların post-transkripsiyonel olarak modifiye edildikleri ve histon deasetilasyonunun da gen represyonu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Berger, 2002). Yapılan çalışmalarda Solyc09g009030.2.1 geninin Arabidopsis homologunun (*AtHD2C*) absisik asit (ABA) ile ifadelenmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı geni aşırı ifadeleyen bitkilerin ABA duyarlılığını yitirdikleri gösterilmiştir (Sridha ve Wu, 2006). Söz proteinin nasıl çalıştığı ya da hang genleri regüle ettiği konusunda herhangi bir bilgi bulunmamakla beraber, ABA tarafından regüle edilmesi abiyotik stres cevabında önemli rol oynama olasılığı olduğunu göstermektedir. Solyc02g014770.2.1 geninin chromatin remodelling 19 protein ailesine mensup bir protein kodladığı ve bunun da transgenik bitkilerde kuraklık koşullarında ifadelenmesinde 2.1 kat azalma olduğu ancak transgenik olmayan kontrol bitkilerinde ifadelenmesinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

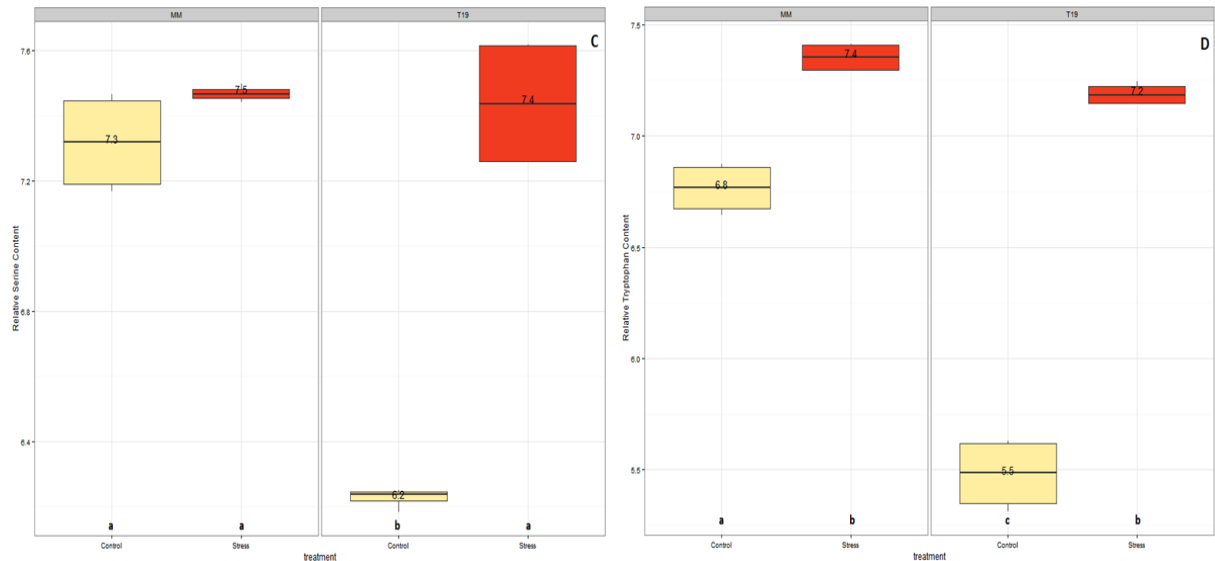
Chromatin remodelling 19 proteininin RNA aracılıklı gen susturulmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Han vd., 2014). Ancak, bitkilerde hangi genlerin ifadelenmelerini kontrol ettiğine dair literatürde ayrıntılı bir bilgi bulunmamaktadır. Sitokinin ya da kuraklık stresi ile ilişkisine dair de herhangi bir veri bulunmamaktadır. Solyc03g123530.2.1 geni CCAAT-box-binding transcription factor-like protein kodlamaktadır ve transgenik bitkilerde ifadelenme düzeyinin 1.8 kat azalmış, transgenik olmayan kontrol bitkilerinde ise kuraklık koşulları altında ifadelenme düzeyleri 2.1 kat artmıştır. Solyc03g123530.2.1 proteininin Arabidopsis homologunun (*EDA25*) nukleolide lokalize olduğu ve dişi gametofit gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2009). Ayrıca, fonksiyon kaybı *EDA25*'in mutantlarının alüminyuma duyarlı olduğu ve düşük poliamin biyosentez düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir (Nezames vd., 2012). Arabidopsis'te yapılan çalışmalar söz konusu geninin bitki gelişimi ve abiyotik strese cevapta önemli olabileceğini göstermekle birlikte hangi genleri regüle ettiği ya da hangi mekanizmalarla bunun gerçekleştiğine dair literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Solyc01g007070.2.1 geni BEL1-like homeodomain protein 1 adlı transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Bu çalışmada söz konusu genin ifadelenmesinin kuraklık koşulları altında transgenik bitkilerde 1.7 kat azaldığı, transgenik olmayan kontrol bitkilerde ise 1.7 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu genin Arabidopsis homologunun (*BHL 1*) sitokinin içeren besiyerinde büyütülen köklerde ifadelenmesinin arttığı gösterilmiştir (Hoth vd., 2003). *Brassica napus* (Bn) SHOOTMERISTEMLESS (*BnSTM*) proteininin az ifadelenmesi ile embryo gelişiminin baskılandığı ve *BHL 1* geninin *BnSTM* geni fonksiyon kaybı mutantlarında fazla ifadelenildiği gözlenmiştir (Elhiti vd., 2012). Yine yapılan başka bir çalışmada *BHL 1* geninin ABA ile uyarıldığı gösterilmiştir (Guo vd., 2009). Başka bir çalışmada ise, *BLH 1* geninin kuraklık stresi koşullarında kavak ve mandalınada fazla ifadelenildiği belirlenmiştir (Yoon vd., 2014; Gimeno vd., 2009). Literatürde *BHL 1* transkripsiyon faktörünün ABA ile regüle edildiği ve abiyotik stres koşullarına cevapta rol oynadığına dair bilgi bulunmasına rağmen bunun hangi genleri regüle ederek gerçekleştirdiğine dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Solyc02g081010.1.1 geni JHDM2 ailesi H3K9

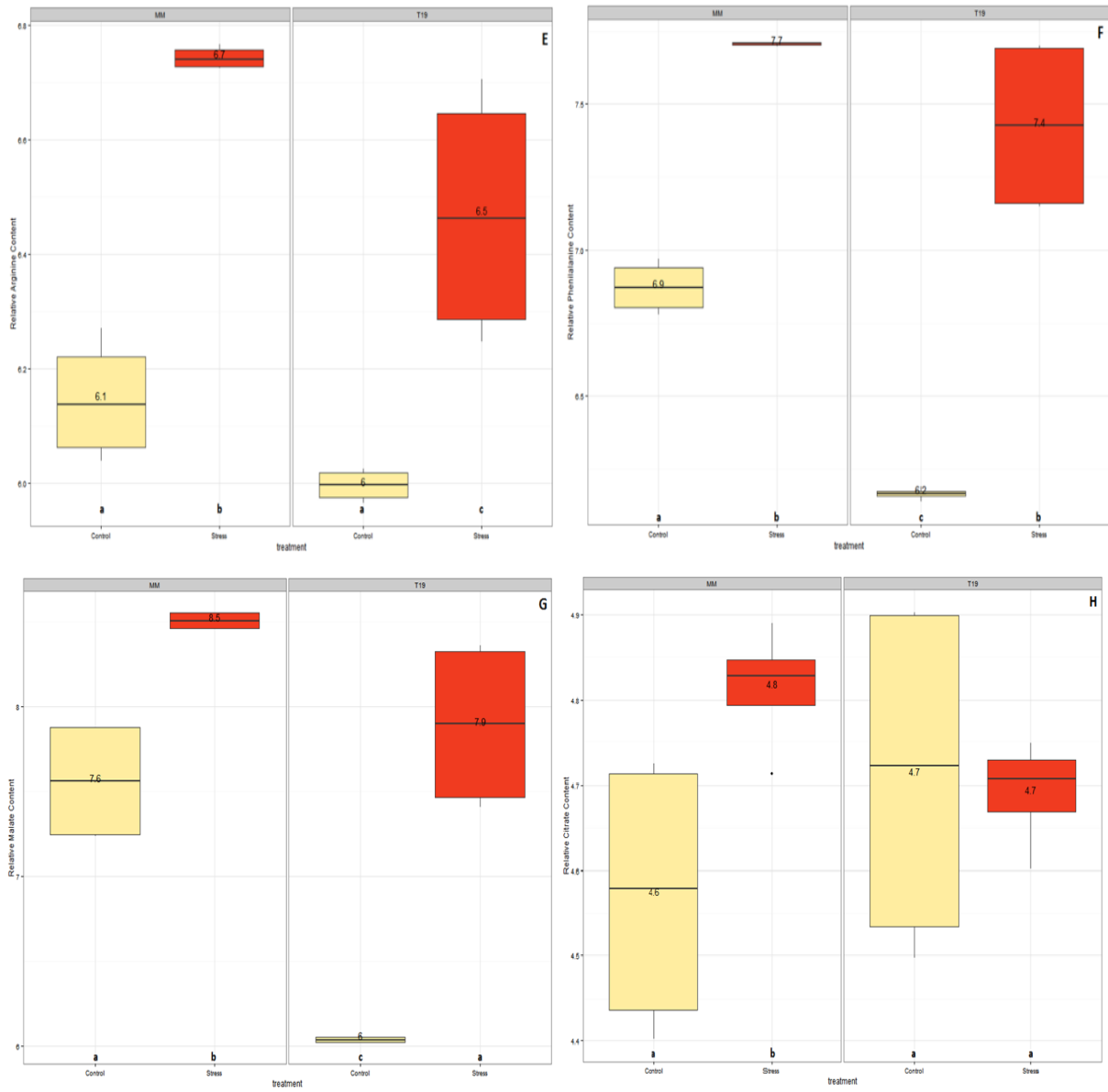
mono- and dimetilasyon gerçekleştiren H3K9 dimethylaaz olan Jumonji C (JmjC) domain proteini (*IBM 1*) kodlamaktadır (Saze vd., 2008). Söz konusu genin bu çalışmada transgenik bitkilerde ifadenemesinin 1.6 azaldığı görülmüş ancak transgenik olmayan kontrol bitkilerde ifadenemesinin değişmediği tespit edilmiştir. *IBM 1* proteini protein kodlayan genleri H3K9 ve non-CG DNA metilasyonu ile baskılanmaktan korurlar (Saze vd., 2008). *IBM 1* geninin RNAi tarafından yönlendirilen DNA metilasyonu ile ilgili komponentleri kontrol ettiği gösterilmiştir (Miura vd., 2009). *IBM1* genindeki fonksiyon kaybı mutantlarının küçük ve dar yaprak oluşması, polen olumunun durması, çiçek organlarında ve ebriyoda anormalliker gibi gelişimsel kusurlara sebep olduğu gösterilmiştir (Saze vd., 2008). *IBM1* geninin bitki gelişimi ile doğrudan etkili olduğu gösterilmiş ancak stres ve sitokinin cevabı ile nasıl ilgili olduğuna dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Solyc01g014850.2.1 geni pek çok farklı biyolojik fonksiyonda rol oynayan transkripsiyon faktörü olan Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 kodlamaktadır (Steger vd., 2002). Solyc01g014850.2.1 geni 80 proteinden oluşan Zinc finger CCCH domain protein ailesinden olan *SIC3H7* kodlamaktadır (Xu, 2014). Ancak literatürde sözkonusu genin hangi genleri ve hangi biyolojik fonksiyonları regüle ettiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Solyc07g052900.1.1 geni Os09g0451700 protein 1 ailesine mensup bir transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. Söz konusu genin ifadenemesi kontrol koşulları altında transgenik bitkilerde değişmemiş ancak transgenik olmayan kontrol bitkilerinde ifadenemesi 3.9 kat azalmıştır. Arabidopsis homologu olan At1g61730 (*stk01*) ve At4g00238 (*stk03*) genlerinin aşırı ifadenemesinin tütünde biyokütle artışı ve gövde büyüklüğünün artmasına sebep olduğu *sturdiness* ve *stk03* geninin yine aynı genin homologu olan At4g00390 (*stk06*) ile etkileştiği gösterilmiştir (Bömer vd., 2011). Ayrıca, yine aynı genin Arabidopsis homologlarını (At2g25650 ve At2g36340) sitokinin cevap mekanizmalarında rol oynadıkları tespit edilmiştir (Chevalier vd., 2008). Sözkonusu genin homologlarının sitokinin cevabında rol oynadığı ve hücre çoğalması ile ilgili potansiyel roller oynatabileceği gösterilmiştir ancak bu transkripsiyon faktörünün hangi genleri regüle ettiğine ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır. Solyc01g107330.2.1 geni SWIB_MDM2 domain proteini kodlamaktadır ve bu protein kromatin yeniden modellenmesinde rol oynayan SWI/SNF protein kompleksinin alt birimi olduğu bilinmektedir (Bennett-Lovsey vd., 2002). Bu genin Arabidopsis homologunun (At2g14880) etilene cevapta rol oynadığı ve etilen uygulaması ile ifadenemesinin azaldığı gösterilmiştir (De Paepe vd., 2004). SWI/SNF kompleks proteinlerinin hormonlar tarafından regüle edildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sarnowska vd., 2016). Ancak, Solyc01g107330.2.1 geninin domateste nasıl bir rol oynadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Solyc02g068100.2.1 geni de yine SWI/SNF kompleks bileşeni protein 12'yi kodlamaktadır. Ancak, sözkonusu proteinin domateste hangi genleri ve biyolojik işlevleri kontrol ettiğine dair bir çalışma mevcut değildir. Solyc05g007100.2.1 geni WHY transkripsiyon faktörü olan DNA-bağlayan protein p24 kodlamaktadır. Bu genin AT1G14410 (*WHY1*) and AT2G02740 (*WHY3*) olmak üzere iki *Arabidopsis* homologu bulunmaktadır. At*WHY1* geninin hastalık direnci ile ilişkili olduğu (Desveaux vd., 2004), Ayrıca, telomeraz inhibisyonu ile ilişkisi olduğu (Yoo vd., 2007) ve ayrıca, salisilik asit aracılıklı patojen cevap yolağında rol oynadığı (Xiong vd., 2009) ve yaprak yaşlanmasının kontrolünde de işlevi olduğu gösterilmiştir (Mio vd., 2013). Sözkonusu genin abiyotik stres ya da sitokinin cevabı ile ilgili rolü daha önce gösterilmemiştir. Solyc08g080580.2.1 geni Myb ailesi transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. Bu genin Arabidopsiste AT4G32730.1 (*MYB3R1*) ve AT5G11510 (*MYB3R4*) olmak üzere iki homologu bulunmaktadır. *MYB3R1* ve *MYB3R4* transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görmek ve sitokinezin pozitif regülatörleridir (Haga vd., 2007). *MYB3R1/4* transkripsiyon faktörü MSA elementlerine bağlanarak hücre döngüsünün G2 ve M fazlarına özgü genlerin ifadenemesini kontrol etmektedir (Haga vd., 2011). Solyc04g054880.2.1 geni BZIP transkripsiyon faktörü IPR006867 kodlamaktadır. BZIP transkripsiyon faktörü ailesi domateste 69 proteinden oluşmaktadır (Li vd., 2015). Bu aileye mensup transkripsiyon faktörleri patojene direnç, abiyotik stres direnç sinyal iletimi, hormon sinyal iletimi, enerji metabolizması ve gelişim ile ilgili biyolojik işlevlerde görev yapmaktadır (Llorca vd., 2014). Ancak, bu genin fonksiyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Solyc10g081030.1.1 geni transkripsiyon faktörü olan nascent polypeptide-associated kompleksi alfa altbirim proteinini kodlamaktadır. Bu genin Arabidopsis homologunun (AT3G12390) çiçek gelişimi ile ilişkili olduğu (Xie vd., 2015) ve

ayrıca, tuzluluk stresine cevapta da rol oynadığı gösterilmiştir (Jiang vd., 2007). Solyc01g049680.2.1 geni transkripsiyon aktivatör proteini Pur-alfa proteinini kodlamaktadır ve bu proteinin tek zincirli DNA'ya bağlandığı ve bitkilerde pek çok fizyolojik fonksiyonu kontrol etmektedir (Knapp vd., 2006). Bu çalışmada söz konusu genin transgenik bitkilerde ifadenemesinin kuraklık koşulları altında 2.3 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak, sözkonusu genin domateste hangi biyolojik fonksiyonda rol oynadığına ilişkin literatürde bir bilgi bulunmamaktadır. Solyc01g009080.2.1 geni transkripsiyon faktörü olan FHA domain içeren protein kodlamaktadır. Bu çalışmada Solyc01g009080.2.1 geni kuraklık koşulları altında transgenik bitkilerde ifadenmesi 2.0 kat arttığı, transgenik olmayan kontrol bitkilerinde ise 2.1 kat azaldığı gözlenmiştir. Söz konusu genin Arabidopsis homoloğu (At2g21530) *SMAD/FHA*'nın abiyotik stres koşullarında regüle olduğu tespit edilmiştir (Rasmussen vd., 2013).

4.15. Seçilmiş Metabolitlerin Analizi

Kontrol ve kuraklık koşullarında büyütülen transgenik olmayan kontrol veya homozigot transgenik bitkide bazı aminoasitlerin ve organik asitlerin miktarları LC-MS/MS yöntemi ile ölçülmüştür (Şekil 29) ve bunların kuraklık koşullarından nasıl etkilendikleri tespit edilmiştir. Alanin miktarının kuraklık koşullarında gerek transgenik olmayan kontrol gerekse transgenik bitkilerde düştüğü gözlenmiştir. Ancak, transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı fark görülmemiştir. Prolin miktarlarını hem transgenik olmayan kontrol hem de transgenik bitkilerde arttığı gözlenmiştir. Kontrol koşullarında transgenik olmayan kontrol bitkilerinin transgenik bitkilere göre daha yüksek düzeyde prolin içerdiği görülmüştür. Prolinin abiyotik stres koşullarında ozmoprotektan olarak işlev gördüğü ve stres koşullarında miktarlarının arttığı bilinmektedir. Serin miktarının ise kontrol koşullarında transgenik olmayan kontrolde transgenik bitkilere göre daha yüksek düzeyde olduğu ancak kuraklıkla birlikte herhangi bir artış veya düşüş göstermediği izlenmiştir. Transgenik bitkilerde ise kuraklık koşulları altında serin miktarlarında ciddi bir artış gözlenmiştir. Triptofan miktarlarında da serin miktarındaki benzer bir durum gözlenmiştir. Triptofan miktarı kontrol koşullarında transgenik bitkilerde daha düşük düzeyde gözlenmiş ancak kuraklık koşullarında triptofan miktarlarında ciddi artış gözlenmiştir. Arjinin miktarı kontrol koşullarında transgenik bitkilerde transgenik olmayan kontroller ile benzer düzeylerde iken kuraklık koşullarında arjinin miktarlarında ciddi artış gözlenmiştir. Fenil alanin miktarı kontrol koşullarında transgenik bitkilerde daha düşük düzeyde gözlenmiş ancak kuraklık koşullarında fenil alanin miktarlarında ciddi artış gözlenmiştir. Malat miktarı kontrol koşullarında transgenik bitkilerde daha düşük düzeyde gözlenmiş ancak kuraklık koşullarında transgenik bitkilerde malat miktarlarında da ciddi artış gözlenmiştir. Kuraklık koşulları altında citrat miktarlarında transgenik olmayan kontrol bitkilerde artış gözlenmiş ancak transgenik bitkilerde kuraklık koşullarında herhangi bir artış görülmemiştir.





Şekil 29. Kalitatif olarak analiz edilen seçilmiş metabolitler için sonuçlar. Grafiklerde farklı harflerle işaretler Tukey's HSD test ($p < 0.05$) sonucuna göre istatistiksel olarak önemli fark olduğunu göstermektedir. A=Relatif Alanin miktarı; B=Relatif Prolin miktarı; C=Relatif Serin miktarı; D=Relatif triptofan miktarı; E=Relatif arjinin miktarı; F=Relatif fenil alanin miktarı; G=Relatif malat miktarı; H=Relatif sitrat miktarı.

5. SONUÇLAR

1. Proje kapsamında *IPT* genini SARK promotörü kontrolünde over-ekspres eden transgenik domates hatları geliştirilmiştir. Söz konusu transgenik hatların transgen kopya sayıları belirlenmiş ve kendilenerak T2 bitkileri oluşturulmuştur ve bunlarında transgen için zigotluk düzeyleri belirlenmiştir.
2. Transgenik hatların normal büyüme koşullarındaki büyüme ve verim özellikleri incelenmiştir. Transgenik hatların meyve verimi açısından transgenik olmayan kontrollere göre daha düşük performans gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak transgenik bitkilerin yaprak biyokütle miktarlarının transgenik olmayan kontrollere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
3. Transgenik hatların kuraklık stresi koşullarında transgenik olmayan kontrol bitkilere göre daha iyi performans gösterdikleri gözlenmiştir. Transgenik olmayan kontrol bitkiler kuraklık koşullarında dehidrasyona daha çok uğrarken transgenik bitkilerde daha az dehidratasyon gözlenmiştir. Transgenik bitkilere kuraklık koşulları altında su kullanım veriminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerde yaşlanma testlerinde klorofil degradasyonun daha düşük düzeylerde kaldığı gözlenmiş sitokininlerin yaprak yaşlanmasını geciktirdiği görülmüştür. Ayrıca, lipid peroksidasyonun yapraklarda daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür, ki bu da oksidatif stresin daha düşük düzeylerde olduğunu ifade etmektedir. Yapılan tester sonucu transgenik bitkilerin kuraklığı daha iyi tolere ettiğini göstermektedir.
4. Homozigot transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerin kontrol ve kuraklık stresi koşulları altında yaprak toplam proteomu ve nükleus proteomu kalitatif olarak shotgun proteomik yöntemi ile yüksek hassasiyette incelenmiştir. Farklı ifadelenen proteinler belirlenmiştir. *IPT* genini fazla ifadeleyen transgenik bitkiler ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde yapılan LC-MS/MS proteomik analizlerinde toplamda 191 proteinin farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 191 proteinden 69'unun hem transgenik hem de transgenik olmayan kontrol bitkilerinde kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Yine tanımlanan 191 proteinden 99'unun yalnızca transgenik hatta kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir, ki toplamda transgenik olmayan kontrol bitkilere göre daha fazla protein (168) transgenik hatta farklı ifadelenmiştir. Farklı ifadelenen proteinler için yapılan GO gen zenginleştirme analizleri sonucunda kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinlerin en fazla abiyotik uyarana tepki, sülfür bileşiklerinin metabolik işlevi ve protein katlanması ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Yine yaprak zenginleştirilmiş nükleer proteomu üzerinde çalışmalarda kuraklık koşulları altında *IPT* genini SARK promotörü kontrolünde ifadeleyen transgenik bitkiler ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde LC-MS/MS proteomik analizlerinde toplamda 81 adet nükleus proteinin farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 81 proteinden 31'inin hem transgenik hem de transgenik olmayan kontrol bitkilerinde kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Yine tanımlanan 81 proteinden 31'inin yalnızca transgenik hatta kuraklık koşullarında farklı ifadelendiği tespit edilmiştir, ki toplamda transgenik olmayan kontrol bitkilere göre daha fazla protein (61) transgenik hatta farklı ifadelenmiştir. Farklı ifadelenen proteinler için yapılan GO gen zenginleştirme analizleri sonucunda kuraklık koşullarında farklı ifadelenen proteinlerin en fazla nükleobaz içeren molekül taşınması, RNA metabolik işlevleri ve transkripsiyon ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kuraklık koşullarında farklı ifadelenen nükleer zenginleştirilmiş 81 proteinden 16'sının transkripsiyon faktörleri olduğu belirlenmiştir ki bu proteinler nükleer gen ifadenmesini doğrudan kontrol etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment*, 32(9), 1147-1160
- Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P. L., Divíšková, E., & Brzobohatý, B. (2015). Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of proteomics*, 120, 7-20.
- Bennett-Lovsey, R., Hart, S. E., Shirai, H., & Mizuguchi, K. (2002). The SWIB and the MDM2 domains are homologous and share a common fold. *Bioinformatics*, 18(4), 626-630.
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development*, 12(2), 142-148.
- Bömer, M., Uhrig, J., Jach, G., & Müller, K. (2011). Increased vegetative development and sturdiness of storekeeper-transgenic tobacco. *Open Life Sciences*, 6(3), 342-351.
- Černý, M., Kuklová, A., Hoehenwarter, W., Fragner, L., Novák, O., Rotková, G., ... & Weckwerth, W. (2013). Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in Arabidopsis identifying both distinct and similar responses to cytokinin down-and up-regulation. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4193-4206.
- Chevalier, F., Perazza, D., Laporte, F., Le Hénanff, G., Hornitschek, P., Bonneville, J. M., & Vachon, G. (2008). GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in Arabidopsis. *Plant physiology*, 146(3), 1142-1154.
- Cowan, A. K., Freeman, M., Björkman, P. O., Nicander, B., Sitbon, F., & Tillberg, E. (2005). Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta*, 221(6), 801-814.
- Delatorre, C. A., Cohen, Y., Liu, L., Peleg, Z., & Blumwald, E. (2012). The regulation of the SARK promoter activity by hormones and environmental signals. *Plant science*, 193, 39-47.
- Desveaux, D., Subramaniam, R., Després, C., Mess, J. N., Lévesque, C., Fobert, P. R., ... & Brisson, N. (2004). A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Developmental cell*, 6(2), 229-240.
- Elhiti, M., Yang, C., Belmonte, M. F., Gulden, R. H., & Stasolla, C. (2012). Transcriptional changes of antioxidant responses, hormone signalling and developmental processes evoked by the Brassica napus SHOOTMERISTEMLESS during in vitro embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 297-311.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC plant biology*, 8(1), 131.
- FAOSTAT, 2012. FAO İstatistik veritabanı websitesi, Food and Agricultural Organisation of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> Son erişim tarihi: 11.03.2014
- Fiorilli, V., Catoni, M., Miozzi, L., Novero, M., Accotto, G. P., & Lanfranco, L. (2009). Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 184(4), 975-987.

- Foolad, M. R. (2007). Current status of breeding tomatoes for salt and drought tolerance. In *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 669-700). Springer Netherlands.
- Frary, A., & Van Eck, J. (2004). Organogenesis from transformed tomato explants. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 141-150.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270(5244), 1986.
- Gimeno, J., Gadea, J., Forment, J., Pérez-Valle, J., Santiago, J., Martínez-Godoy, M. A., ... & Talón, M. (2009). Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant molecular biology*, 70(4), 403-420.
- Guo, J., Wang, J., Xi, L., Huang, W. D., Liang, J., & Chen, J. G. (2009). RACK1 is a negative regulator of ABA responses in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, erp221.
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., ... & Ito, M. (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in Arabidopsis thaliana. *Development*, 134(6), 1101-1110.
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., ... & Ito, M. (2011). Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in Arabidopsis. *Plant physiology*, 157(2), 706-717.
- Han, Y. F., Dou, K., Ma, Z. Y., Zhang, S. W., Huang, H. W., Li, L., ... & He, X. J. (2014). SUVR2 is involved in transcriptional gene silencing by associating with SNF2-related chromatin-remodeling proteins in Arabidopsis. *Cell research*, 24(12), 1445-1465.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M. K., ... & Chua, N. H. (2003). Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters*, 554(3), 373-380.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., & Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(13), 3591-3607.
- Li, D., Fu, F., Zhang, H., & Song, F. (2015). Genome-wide systematic characterization of the bZIP transcriptional factor family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC genomics*, 16(1), 771.
- Llorca, C. M., Potschin, M., & Zentgraf, U. (2014). bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in plant science*, 5, 169.
- Løvdaal, T., & Lillo, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical biochemistry*, 387(2), 238-242.
- Knapp, A. M., Ramsey, J. E., Wang, S. X., Godburn, K. E., Strauch, A. R., & Kelm, R. J. (2006). Nucleoprotein interactions governing cell type-dependent repression of the

mouse smooth muscle α -actin promoter by single-stranded DNA-binding proteins Pur α and Pur β . *Journal of Biological Chemistry*, 281(12), 7907-7918.

- Miao, Y., Jiang, J., Ren, Y., & Zhao, Z. (2013). The single-stranded DNA-binding protein WHIRLY1 represses WRKY53 expression and delays leaf senescence in a developmental stage-dependent manner in Arabidopsis. *Plant physiology*, 163(2), 746-756.
- Miura, A., Nakamura, M., Inagaki, S., Kobayashi, A., Saze, H., & Kakutani, T. (2009). An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *The EMBO journal*, 28(8), 1078-1086.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Nezames, C. D., Ochoa, V., & Larsen, P. B. (2013). Mutational loss of Arabidopsis SLOW WALKER2 results in reduced endogenous spermine concomitant with increased aluminum sensitivity. *Functional Plant Biology*, 40(1), 67-78.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Zabeau, M., & Van Der Straeten, D. (2004). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39(4), 537-559.
- Peet, MM. (2005). Irrigation and fertilization Tomatoes. *Crop Production Science in Horticulture*. UK: CABI Publishing.
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., ... & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in Arabidopsis. *Plant physiology*, 161(4), 1783-1794.
- Rivero, R. M., Shulaev, V., & Blumwald, E. (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, 150(3), 1530-1540.
- Robson, P. R., Donnison, I. S., Wang, K., Frame, B., Pegg, S. E., Thomas, A., & Thomas, H. (2004). Leaf senescence is delayed in maize expressing the Agrobacterium IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 2(2), 101-112.
- Sarnowska, E., Gratkowska, D. M., Sacharowski, S. P., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A. R., ... & Sarnowski, T. J. (2016). The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk. *Trends in plant science*, 21(7), 594-608.
- Saze, H., Shiraishi, A., Miura, A., & Kakutani, T. (2008). Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *science*, 319(5862), 462-465.
- Sharma, B., Molden, D., & Cook, S. (2015). Water use efficiency in agriculture: Measurement, current situation and trends. *Managing water and fertilizer for sustainable agricultural intensification*, 39.
- Sridha, S., & Wu, K. (2006). Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 46(1), 124-133.
- Stege, J. T., Guan, X., Ho, T., Beachy, R. N., & Barbas, C. F. (2002). Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. *The Plant Journal*, 32(6), 1077-1086.

- Stewart Jr, C. N., & Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5), 748-750.
- Tanji, KK. (1990). Nature and extent of agricultural salinity. *Agricultural Salinity Assessment and Management*. Tangi, KK., Am. , New York: Soc. Civil Engineers.
- Thiele, B., Stein, N., Oldiges, M., & Hofmann, D. (2012). Direct analysis of underivatized amino acids in plant extracts by LC-MS-MS. *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols*, 317-328.
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154.
- Xiong, J. Y., Lai, C. X., Qu, Z., Yang, X. Y., Qin, X. H., & Liu, G. Q. (2009). Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression. *Plant molecular biology*, 71(4-5), 437-449.
- Xie, W., Huang, J., Liu, Y., Rao, J., Luo, D., & He, M. (2015). Exploring potential new floral organ morphogenesis genes of Arabidopsis thaliana using systems biology approach. *Frontiers in plant science*, 6, 829.
- Xu, Y., Tian, J., Gianfagna, T., & Huang, B. (2009). Effects of SAG12-ipt expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) under heat stress. *Plant Growth Regulation*, 57(3), 281.
- Xu, Y. H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z. Q., Jiang, S. C., Shen, Y. Y., ... & Zhang, D. P. (2012). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1095-1106.
- Xu, Y. H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z. Q., Jiang, S. C., Shen, Y. Y., ... & Zhang, D. P. (2012). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1095-1106.
- Xu, R. (2014). Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the CCCH zinc finger family in *Solanum lycopersicum*. *Molecular genetics and genomics*, 289(5), 965-979.
- Wang, X., Jiang, D., & Yang, D. (2015). Fast-tracking determination of homozygous transgenic lines and transgene stacking using a reliable quantitative real-time PCR assay. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(2), 996-1006.
- Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 527-538.
- Warren, C. R. (2008). Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *Journal of Plant Nutrition*, 31(7), 1321-1332.
- Yoo, H. H., Kwon, C., Lee, M. M., & Chung, I. K. (2007). Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(3), 442-451.
- Yoon, S. K., Park, E. J., Choi, Y. I., Bae, E. K., Kim, J. H., Park, S. Y., ... & Lee, H. (2014). Response to drought and salt stress in leaves of poplar (*Populus alba* × *Populus glandulosa*): expression profiling by oligonucleotide microarray analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 158-168.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ANNE FRARY
Proje No:	114Z563
Proje Başlığı:	Sitokinin Sentezlemesini Aşırı İfadeleyen Domates Bitkilerinde Kuraklık Stresine Karşı Toplam Yaprak ve Nükleer Proteom Tepkisi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2014 - 01/12/2016
Onaylanan Bütçe:	205640.0
Harcanan Bütçe:	152963.73
Öz:	<p>Sitokininlerin bitki biyolojisinde hücre bölünmesinin uyarılması ve kontrolü gibi çok önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Bu hormon moleküllerinin işlevlerini transkripsiyon faktörlerini kontrol ederek gen ifadenmesini değiştirerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Yapılan yeni çalışmalarda sitokininlerin kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi stres koşullarına dirençte önem rol oynadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sitokinin biyosentezinde kilit önemdeki IPT (izopentenil transferaz) geninin kuraklık koşullarında stres koşullarına duyarlı SARK promotörü kontrolünde over-ekspresyonun kuraklıktan kaynaklanan bitki hasarını; yaprak yaşlanmasını geciktirerek minimuma indirdiği tespit edilmiştir. Sitokininler ile kuraklık stresine toleransın sağlanmasına ilişkin moleküler mekanizmaların anlaşılmasına ilişkin çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların çoğu diğer bitki hormonları, fotosentez ve oksidatif stres ile ilişkili gen ifadenme düzeylerinin incelendiği ya da fotosentez verimliliği, stoma açıklığı, CO2 emilim miktarları gibi fizyolojik değerlendirmelerin yapıldığı çalışmalardır. Sitokininlerin stres koşullarında bitki metabolizmasında asıl fonksiyonel işlev gören molekülleri olan proteinleri nasıl regüle ettiği ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Yalnızca C3 ot türlerinde sitokininler ile yüksek sıcaklık stresi koşullarında toleransın mekanizmaları yaprak total proteom düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca domates bitkisinde de sitokininlerin kuraklık koşullarına nasıl tolerans sağladığına dair herhangi bir proteomik çalışma da bulunmamaktadır. Domateste gerçekleştirilen tek çalışmada IPT geninin sıcaklıkla uyarılan HSP promotörü kontrolünde ifadelendiği ve tuzluluk stresi koşullarına direnç mekanizmalarının kök total proteomu seviyesinde incelendiği çalışmadır. Sitokininlerin kuraklık koşullarında yaprakta metabolizmayı protein düzeyinde nasıl regüle ettiği ve toleransı nasıl sağladığına dair çalışma bulunmamaktadır. Özellikle sitokininlerin kuraklık stresi koşullarında nükleer proteomu ve en önemlisi de transkripsiyon faktörlerini nasıl regüle ederek tolerans sağladığına dair literatürde herhangi bir bitki türünde gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Yapılacak çalışmalar ile sitokininler sayesinde kuraklık stresi toleransında rol oynayan proteinler özellikle de nükleer proteinler olan transkripsiyon faktörleri tespit edilebilecek ve bu proteinler ve onları kodlayan genler özellikle de transkripsiyon faktörleri bu stres koşullarına direnç sağlanması için kullanılabilir hedef genler olarak daha sonraki çalışmalarda kullanılabilirler.</p> <p>Bilimsel çıktıların yanı sıra, TÜBİTAK - ASCR İşbirliği programı kapsamında gerçekleştirilen bu proje ile Türk ve Çek bilimadamları arasında işbirliği oluşturulmuş, bilgi ve uzmanlık paylaşımı gerçekleştirilmiştir. Proje sonuçlarının konu üzerinde Türkiye ve Çekya'da yüksek lisans ve doktora yapmak isteyen genç araştırmacılara ve diğer domates biyoteknoloji ve ıslahçılarına yeni ufuklar açacaktır. Bu proje TÜBİTAK tarafından Prof. Dr. Anne Frary'ye sağlanan destekle yürütülmüştür.</p>
Anahtar Kelimeler:	Domates, sitokinin, kuraklık, isopentenil transferaz, proteomiks, nükleer proteom
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır