



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 35 (2020)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/ omuanajas.624749

Oryza sativa *Osmyb4* geni aktarılmış transgenik patatesten *Osmyb4* gen ifadesinin tuzluluk toleransına etkisi

Gülsüm Aydın

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya, Türkiye

*Sorumlu yazar/corresponding author: agulsum@selcuk.edu.tr, gkalemtas@gmail.com

Geliş/Received 26/09/2019 Kabul/Accepted 29/11/2019

ÖZET

Bu çalışmada *Osmyb4* geni ile transforme edilmiş patatesten MYB4'ün tuz toleransına olan potansiyel etkileri araştırılmıştır. Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada *Osmyb4* geni aktarılmış transgenik patates bitkilerinin yüksek konsantrasyonda tuz içeren ortamda, gen aktarılmamış bitkilerden daha iyi fizyolojik gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu noktadan hareketle MYB4'ün patatesten tuz toleransına etkisini araştırmak amacıyla, transgenik bitkiler (TR) ve gen aktarılmamış bitkiler (WT) 300 mM tuz stresine tabi tutularak elektrolit salınımı, malondialdehit (MDA) miktarı, nispi su içeriği (RWC), hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonu, klorofil içeriği ve prolin miktarı belirlenmiştir. Bunların yanı sıra literatürde tuz stresi ile ilişkili olduğu belirtilen *NAC072*, *NAC024*, *CDPK4* ve *P5CS* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) aracılığı ile incelenmiştir. Biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen veriler elektrolit salınımı, prolin miktarı ve H₂O₂ miktarı bakımından WT bitkiler ile TR bitkiler arasında anlamlı bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur. RWC transgenik S2 hattında transgenik olmayan bitkilere kıyasla anlamlı oranda (P < 0.05) yüksek bulunmuştur. MDA miktarı her iki transgenik hatta (S2 ve M48) WT bitkilere kıyasla anlamlı oranda düşük bulunmuştur. qPCR analizi sonucunda elde edilen relatif ekspresyon değerleri, S2'de *NAC072* geninin ekspresyon seviyesinin WT ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak (P < 0.05) yüksek olduğunu göstermiştir. *NAC024* ve *P5CS* genlerinin ekspresyon seviyeleri de transgenik bitkilerde transgenik olmayanlara oranla yüksek bulunmuştur. *CDPK4* geninin ekspresyon seviyesi ise S2 bitkileri ile WT bitkilerde birbirine yakın seviyede tespit edilmiştir. Elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde MYB4 transkripsiyon faktörünün RWC, MDA miktarı ve stresle ilişkili çeşitli genlerin ekspresyon seviyesini etkilemek suretiyle tuz stresi tolerans mekanizmasında rol oynayabileceğine işaret etmiştir.

Anahtar Sözcükler:

Abiyotik stres
MYB4
Patates
Transgenik
Tuzluluk

Effect of *Osmyb4* gene expression on salinity tolerance of potato transformed with *Oryza sativa* *Osmyb4* gene

ABSTRACT

In this study, potential involvement of MYB4 in salt tolerance of potato transformed with *Osmyb4* was investigated. In our previous studies transgenic potato plants heterologously expressing *Osmyb4* gene displayed better growth compared to non-transgenic plants upon exposure to high salt concentrations. These results have led to a detailed analysis of potential involvement of MYB4 in salt tolerance of potato. For this purpose transgenic (TR) and non-transgenic (WT) plants were subjected to 300 mM salt concentrations and electrolyte leakage, malondialdehyde level (MDA), relative water content (RWC), the amount of hydrogen peroxide (H₂O₂), chlorophyll content and the level of proline was identified. The expression of certain genes reported to be involved in salinity tolerance, namely, *NAC072*, *NAC024*, *CDPK4* and *P5CS* was also investigated by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The data obtained through biochemical tests showed that there were no significant difference between WT and TR plants with respect to electrolyte leakage, proline content and H₂O₂ content. RWC was significantly higher (P < 0.05) in the transgenic line S2 compared to TR plants. MDA content in both transgenic lines

Keywords:

Abiotic stress
MYB4
Potato
Salinity
Transgenic

© OMU ANAJAS 2020

(S2 and M48) were found to be significantly lower compared to WT plants. Relative expression data obtained by qPCR analysis revealed that expression of *NAC072* was significantly higher in S2 compared to WT ($P < 0.05$). Expression level of *NAC024* and *P5CS* genes were also higher in transgenic plants compared to non-transgenic WT. On the other hand expression level of *CDPK4* was similar in WT and transgenic lines. The results have indicated that MYB4 transcription factor may regulate salt stress tolerance mechanism in potato by affecting RWC, MDA content and expression of certain stress related genes.

1. Giriş

Biyotik ve abiyotik stres faktörleri bitki gelişimini önemli ölçüde sınırlandırmakta ve tarımda büyük verim kayıplarına yol açmaktadır (Bray ve ark., 2000; Mahajan ve Tuteja, 2005). Dünyada 800 milyon hektardan daha fazla bir alanda tuzluluk sorunu bulunmaktadır ve bu alan dünyadaki toplam karasal alanın %6'sını oluşturmaktadır. Toprakta yüksek oranda bulunan tuz, bitkileri iki farklı yolla etkilemektedir. Yüksek orandaki tuz hem bitkinin kökleri aracılığıyla topraktan suyu almasını zorlaştırmakta (ozmotik stres) hem de iyonik toksisiteye yol açabilmektedir (Munns ve Tester, 2008). Osmotik stres hücre genişlemesinin ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olur. Osmotik stresin devamında ortaya çıkan iyon toksisitesi evresinde ise, ortamda artmış Na ve Cl iyonları K^+ , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi gerekli besin elementleri ile rekabet ederek bitkilerde, besin eksikliği veya besin dengesizliğine yol açar (Hu ve Schmidhalter, 2005). Tuz stresine maruz kalan bitkiler genotipik farklılıklara bağlı olarak çok farklı cevaplar verirler (Dajic, 2006). Bu strese karşı verilen farklı büyüme cevapları sadece farklı bitki türleri için değil aynı türün farklı çeşitleri için dahi geçerli olabilmektedir (Munns, 2002). Bitkilerdeki tuza tolerans mekanizmalarından biri, Na^+ ve Cl^- iyonlarının köklerden, gövde ve yapraklara taşınımının kısıtlanmasıdır. Örneğin arpa, pasif alım ile kök hücrelerine giren Na^+ ve Cl^- iyonlarını sahip olduğu bariyerler sayesinde yeşil aksama iletmemekte ve bu şekilde tuza yüksek tolerans göstermektedir (Poljakoff-Mayber ve Gale, 1975). Tuza toleranslı olan türlerde Na^+ ve Cl^- iyonlarının organlar ve dokulardaki dağılımı önemlidir. Tuz stresine toleransı yüksek olan bitkilerin en iyi bilinen özelliklerinden biri Na^+ ve Cl^- iyonlarının daha çok yaşlı yapraklarda tutulması ve genç yapraklara iletilmemesidir (Wolf ve ark., 1991).

Bitkiler sahip olduğu doğal adaptasyon mekanizmaları aracılığı ile stres faktörlerine dirençli olabileceği gibi çeşitli manipülasyonlarla da stres toleransları arttırılabilir. Bu amaçla çeşitli ıslah yöntemlerinin yanı sıra bazı biyoteknolojik yöntemler de kullanılabilir. Stres koşullarına dirençli bitki elde edebilmek amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri bitkilere gen transferi yapmaktır (Wang ve ark., 2003). Transkripsiyon faktörlerini (TF) kodlayan çeşitli genlerin bitkilere aktarımı yaygın olarak uygulanan yaklaşımlardan biridir. TFler bitkilerin abiyotik strese verdiği cevabın oluşturulmasında kilit rol oynamaktadırlar (Golldack ve ark., 2014). Çeşitli MYB TFleri abiyotik stres cevabının düzenlenmesindeki rolü

açısından çalışılmıştır (Li ve ark. 2015). MYB TFleri DNA'ya bağlanmayı sağlayan MYB domaini ile karakterize edilirler ve bu domaindeki sekans tekrar sayısına bağlı olarak 4 alt aileye ayrılırlar (1R-MYB, R2R3-MYB, 3R-MYB ve 4R-MYB) (Du ve ark., 2009; Dubos ve ark., 2010). Bitkilerdeki en yaygın transkripsiyon faktör (TF) ailelerinden biri olan MYB TFleri sekonder metabolizmanın düzenlenmesi, hücre morfogenezinin kontrolü, meristem oluşumunun regülasyonu, çiçek ve tohum gelişimi gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal proseslerde rol oynarlar. Ayrıca bazıları da savunma, biyotik/abiyotik stres cevabının oluşturulması ile ışık ve hormon sinyal yollarında rol oynarlar. Bitkilerdeki MYB proteinlerinin çok büyük bir kısmı iki tekrar içeren R2R3-MYB alt ailesine dahildir. R2R3-MYB TFlerinin çeşitli bitkilerde tanımlanmış 100'den fazla üyesi bulunmaktadır. Bu TFler primer ve sekonder metabolizma, hücre akıbeti ve kimliği, gelişme ve biyotik/abiyotik stres cevabı gibi bazı bitkiye özgü proseslerin kontrol edilmesinde önemli rol oynarlar (Chen ve ark., 2005; Dubos ve ark., 2010). MYB4 transkripsiyon faktörü de R2R3-MYB alt ailesine dahil TFlerden biridir.

Arabidopsis thaliana'da tanımlanan *AtMyb4*'ün sinamat 4-hidroksilaz (C4H) enzimini baskılamak suretiyle UV koruyucu bir bileşik olan sinapoil malatın birikimini düzenlediği tespit edilmiştir (Hemm ve ark., 2001; Jin ve ark., 2000). *Oryza sativa*'da tanımlanan *Osmby4* geninin çeltikteki ekspresyonunun ise soğukta absisik asit (ABA) bağımsız yolak ve patojenler aracılığı ile uyarıldığı görülmüştür. *Osmby4*'ün ekspresyonu PAL2, ScD9, SAD ve COR15a gibi soğukla indüklenen promotorları aktive etmiştir. Bu genin Arabidopsiste aşırı ekspresyonu, büyük bir kısmı biyotik ve abiyotik stresle ilişkili olan 250'den fazla genin aktive olmasına sebep olmuştur. Transgenik bitkiler, stres cevabının oluşturulmasında önemli rolü olan çeşitli metabolitleri (prolin, şeker, alanin, glisin betain, aromatik bileşikler vb.) transgenik olmayan bitkilere oranla daha hızlı bir şekilde ve daha yüksek oranda akümüle etmişlerdir. Elde edilen moleküler ve biyokimyasal sonuçlar gen aktarılmış bitkilerin biyotik (virüs, bakteri ve fungus) ve abiyotik (soğuk, donma, kuraklık, tuzluluk, UV, ozon) stres toleransının, gen aktarılmamış olan bitkilere oranla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Vannini ve ark. 2004; Vannini ve ark. 2006). Arabidopsis'te yapılan bir başka çalışmada *Osmby4* ekspresyonunun transgenik bitkilerde kuraklık toleransını artırdığı tespit edilmiştir (Mattana ve ark., 2005). Domateste de

Arabidopsistekine benzer şekilde transgenik bitkilerdeki *Osmby4* ekspresyonunun kuraklık toleransını artırdığı belirlenmiştir. Transgenik domates bitkilerinin virüs hastalıklarına karşı daha dirençli olduğu tespit edilirken soğuk toleransında herhangi bir artışa rastlanmamıştır (Vannini ve ark., 2007). Elmada aşırı ekspres edilen *Osmby4* geni ise transgenik bitkilerin soğuk ve kuraklığa karşı fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyonlarını artırmıştır (Pasquali ve ark., 2008). Benzer şekilde *Osteospermum ecklonis*'te de şeker ve prolin gibi metabolitler daha yüksek oranda akümüle olmuş ve bu durum bitkilerin soğuk ve donma stresine karşı toleransında artışa neden olmuştur (Laura ve ark., 2010). Daha önce tarafımızdan yapılmış olan bir çalışmada *Osmby4* genini ifade eden transgenik patates bitkileri elde edilmiştir. Transgenik bitkilerin yüksek konsantrasyonda tuz içeren ortamda gen aktarılmamış bitkilere oranla daha iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir (Aydın ve ark., 2014). Vannini ve ark. (2006) 300 mM NaCl uygulaması sonucunda *Osmby4* geni aktarılmış transgenik Arabidopsis bitkilerinin yaklaşık % 50'sinin hayatta kaldığını, transgenik olmayan Arabidopsis bitkilerinin ise tümünün öldüğünü göstermişlerdir. Yapılmış olan çalışmada sadece strese maruz bırakılan bitkilerdeki hayatta kalma oranları incelenmiş olduğu için MYB4'ün tuz tolerans mekanizmasındaki rolünün aydınlatılmasına yönelik bir veri bulunmamaktadır.

Tuz stresi, hücre bölünmesini ve uzamasını etkilemek suretiyle, bitkilerde kök ve gövdede hücre sayısının, mitotik aktivitenin ve hücre bölünme oranının azalmasına neden olur (Bursens ve ark., 2000). Bunun bir sonucu olarak bitkinin gövde ile kök uzunluğunda ve ağırlığında azalma; yapraklarda küçülme ve sayılarında azalma; yaprak yüzeyindeki mumsu tabaka ile kutikula tabakasında incelme; vasküler doku farklılaşmasında ve gelişiminde azalma meydana gelir (Mohammad ve ark., 1998; Reddy ve Iyengar, 1999). Dolayısıyla, daha önce yapmış olduğumuz çalışmada (Aydın ve ark., 2014) *Osmby4* geni ile transforme edilmiş patates bitkilerinin, transgenik olmayanlara oranla yüksek tuz konsantrasyonlarında daha iyi gelişim göstermesi, MYB4'ün tuz stresine tolerans sağlayabileceğine işaret etmiştir. Yapılan bu çalışmada ise çeşitli biyokimyasal testler ve gen ekspresyon analizleri aracılığı ile MYB4 transkripsiyon faktörünün patatesta regüle ettiği çeşitli metabolik reaksiyonların ve genlerin açığa çıkarılması ve böylece tuz stresi tolerans mekanizmasındaki potansiyel rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki çeşitleri

Çalışmalarda gen aktarılmamış patates bitkileri (*Solanum tuberosum* L. cv. Kennebec) ile bu bitkilere *Osmby4* geni aktarılması sonucunda elde edilen transgenik patates hatları (S2 ve M48) kullanılmıştır. S2

hattı *Osmby4* genini konstitüif bir promotor olan CaMV35S promotörü kontrolünde taşıyan bir plazmit barındıran *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) aracılığıyla transforme edilmiştir. M48 ise *Osmby4* genini soğukla indüklenen bir promotor olan Cor15a kontrolünde ifade eden bir transgenik hattır. Gen aktarılmamış kontrol bitkileri bundan sonraki kısımlarda WT (wild type) gen aktarılmış bitkiler ise TR (transgenik) bitkiler olarak adlandırılacaktır.

2.2. Bitkilerin büyütülmesi ve tuz stresinin uygulanması

Doku kültüründe büyütülen 4 haftalık bitkiler iklimlendirme kabinine aktarılmış ve 24±1 °C'de 16/8 saat ışık/karanlık altında Hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) içeren su kültüründe 7 gün büyütülmüştür. Su kültürüne adaptasyonu sağlanan WT ve TR fidelere, Hoagland solüsyonuna 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM ve 300 mM konsantrasyonlarında NaCl ilave etmek suretiyle 7 gün tuz stresi uygulanmıştır. Bitki gelişimini sınırlayan tuz konsantrasyonu 300 mM olarak belirlenmiş ve 7. günde yapraklardan örnek alınarak biyokimyasal analizlerde kullanılmıştır.

2.3. Fizyolojik ve biyokimyasal analizler

Tuz uygulamasından sonra WT ve TR bitkilerin yapraklarından örnekler alınarak çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Bütün analizler 3 kez tekrar edilmiş ve herbir tekrarda 2 bitki kullanılmıştır.

Nispi su içeriğinin belirlenmesi için WT ve TR bitkilerin yapraklarından örnek alınmış ve öncelikli olarak yaş ağırlıkları (WM) belirlenmiştir. Numuneler oda sıcaklığında 24 saat süreyle distile suda bekletildikten sonra tekrar tartım yapılarak turgid ağırlıkları (TM) belirlenmiştir. Daha sonra dokular 70 °C'de 48 saat bekletilerek kuru ağırlıkları (DM) belirlenmiştir. Nispi su içeriği (RWC) Smart ve Bingham (1974) tarafından belirlenen eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$RWC (\%) = [WM-DM] / [TM-DM] \times 100$$

Yüksek konsantrasyonda tuz uygulamasına bağlı olarak hücre zarında oluşan hasarı belirlemek için, elektrolit salınımı ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı ölçülmüştür. Elektrolit salınım ölçümünden önce yaprak örnekleri 2-3 kez distile su ile yıkanarak üzerinde bulunabilecek elektrolitlerden arındırılmıştır. Örneklerinin üzerine 0.4 M mannitol solüsyonu ilave edildikten sonra 3 saat süreyle oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Bu süre sonunda örneklerin elektrolit salınım miktarı kondüktivite metre ile ölçülmüş ve C1 değeri olarak kaydedilmiştir. Tüm örnekler 10 dakika kaynayan suda tutulduktan sonra tekrar elektrolit salınım miktarı belirlenmiş ve bu değer de C2 değeri olarak kaydedilmiştir. Daha sonra

elektrolit salınım miktarı (%), $(C1/C2) \times 100$ bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır (Nanjo ve ark., 1999). MDA miktar tayini için yapraklardan alınan 0.2-0.3 g örnek, % 5'lik trikloroasetik asit (TCA) kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenat santrifüjde çöktürüldükten sonra süpernetantın üzerine tiobarbitürik asit (TBA) ve TCA içeren reaksiyon karışımı ilave edilmiş ve 96 °C'de 25 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüjde yapılan çöktürme işleminden sonra süpernetantın absorbanı 532 ve 600 nm'de okunarak MDA miktarı hesaplanmıştır (Madhava Rao ve Srestry, 2000).

H₂O₂ miktarı Bernt ve Bergmeyer (1974)'e göre belirlenmiştir. 0.5-0.6 g yaprak örneği sıvı azotta öğütüldükten sonra potasyum fosfat tamponunda süspand edilmiştir. Homojenat filtre edildikten sonra santrifüj yapılmış ve 0.25 ml supernatant üzerine 1.25 ml peroksidadz reaktifi ilave edilmiştir. 30 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra, 0.25 ml 1N perklorik asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. 5000 g'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernetantın absorbanı 436 nm'de okunmak suretiyle H₂O₂ miktarı tayin edilmiştir.

Yaprak dokusundaki prolin miktarı Bates ve ark. (1973) tarafından belirlenen yöntemle tayin edilmiştir. 0.2-0.3 g doku örneği % 3'lük sülfosalisilik asit kullanılarak homojenize edildikten sonra santrifüjde çöktürülmüştür. Daha sonra bir tüpe sırasıyla 0.2 ml asit ninhidrin, 0.2 ml % 96'lık asetik asit, 0.1 ml % 3'lük sülfosalisilik asit ve 0.1 ml süpernetant ilave edilmiştir. Tüpler 96 derecede 1 saat inkübe edildikten sonra toluen eklenerek tekrar santrifüj yapılmıştır. Süpernetantın absorbanı 520 nm'de okunarak prolin miktarı belirlenmiştir.

Klorofil miktar tayini için WT ve TR fidelerden alınan yaprak örnekleri tartılmış ve daha sonra üzerlerine % 80'lik aseton ilave edilerek 24 saat süreyle 4 °C'de çalkalanmıştır. Örnekler 5dk 3500 rpm'de santrifüj edildikten sonra 647 ve 663 nm'deki absorbanları belirlenmiştir. Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarı Lichtenthaler (1987)'e göre hesaplanmıştır.

2.4. Gen ekspresyon analizleri

Gen ekspresyon analizleri için 24 saat süreyle 150 mM tuz stresine tabi tutulmuş bitkilerin yapraklarından örnek alınmış ve toplam RNA izolasyonu (Thermo Scientific, GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit) yapılmıştır. Stres uygulamasından hemen önce alınan örnekler kontrol olarak kullanılmıştır. Literatürde tuz stresi ile ilişkisi olduğu belirlenmiş olan bazı genlerin ekspresyonu qRT-PCR aracılığı ile incelenmiştir. Bu amaçla $\delta 1$ -pyrroline-5 carboxylate synthase 1 (*P5CS1*), kalsiyum-bağımlı protein kinaz (*StCDPK4*) ve iki farklı NAC transkripsiyon faktörünü (*StNAC024*, *StNAC072*) kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. *StNAC024* ve *StNAC072* genleri için Singh ve ark.

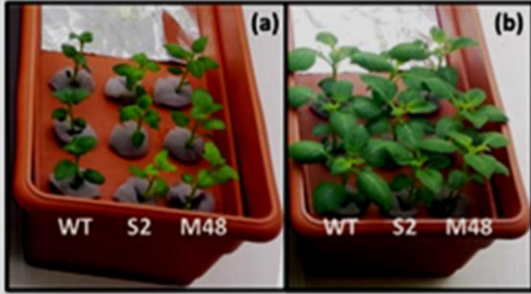
(2013) tarafından belirlenmiş olan primer dizileri kullanılmıştır. Referans gen olarak kullanılan *efl1a* geni için Nicot ve ark. (2005) tarafından belirlenmiş olan primer dizileri kullanılmıştır. *P5CS1* ve *StCDPK4* genleri için NCBI Primer-BLAST programı kullanılarak primerler dizayn edilmiştir. Primer dizisi *P5CS1* geni için 5' primer (5'-TTAAAGAGGACGGAGCTTGC-3') ve 3' primer (5'-CAGTGCATCAGGTCGTGACT-3') şeklinde belirlenmiştir. *StCDPK4* geni için 5' primer (5'-AGTGGCGGTGAGTTGTTTGA-3) ve 3' primer (5'-GAGAATGACACGCCTCCACA-3') şeklinde primer dizileri belirlenmiştir.

qRT-PCR analizi iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada toplam RNA örnekleri kullanılarak ters transkripsiyonla (Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) cDNA sentezlenmiştir. İkinci aşamada cDNA'lardan SYBR Green PCR Kiti kullanılarak (Thermo Scientific, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix) PCR analizi yapılmıştır. PCR karışımı 25 µl toplam hacimde: 12.5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0,3 µM 5' primer, 0,3 µM 3' primer ve 2 µl cDNA içerecek şekilde hazırlanmış ve Thermal Cycler cihazında (Applied Biosystems 7500) çoğaltım gerçekleştirilmiştir. PCR programı 95 °C'de 10 dk ve 40 döngü 94 °C'de 15 sn, 55 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn ile son olarak 72 °C'de 10 dk son uzama olacak şekilde uygulanmıştır. Örneklerin CT değerleri ve söz konusu gene ait kalibrasyon eğrisi kullanılarak herbir örnekteki hedef gen ve referans genin ekspresyon miktarları hesaplanmıştır. Hedef genin örneklerdeki normalize ekspresyon miktarı, hedef genin ekspresyon miktarının referans genin ekspresyon miktarına bölünmesiyle bulunmuştur. Herbir yaprak örneğinin kontrolü aynı bitkiden stres uygulaması öncesinde alınmış olan örnektir. Hedef genin örneklerdeki relatif ekspresyon seviyesi hedef genin normalize ekspresyon miktarının o örneğin kontrolünün normalize edilmiş ekspresyon miktarına bölünmesiyle elde edilmiştir. PCR sırasında melting eğrisi analizi de yapılmış ve tek bir PCR ürününün oluşmuş olduğu kontrol edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Doku kültüründe bir ay süreyle büyütülen WT ve TR patates bitkileri su kültürüne aktarılmış ve 15 gün büyütüldükten sonra 300 mM tuz stresine tabi tutulmuştur. Şekil 1'de su kültüründe büyütülen bitkiler gösterilmektedir. Şekil incelendiğinde WT ve TR bitkilerin tuz stresi uygulamasından önce morfolojik özellikleri bakımından benzer olduğu görülmektedir. Literatürde transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifade edilmesinin bitkilerde genellikle büyüme geriliğine neden olduğu rapor edilmiştir (Kasuga ve ark., 1999; Liu ve ark., 1998). Vannini ve ark. (2004) *Osm4* ile transforme ettikleri Arabidopsis bitkilerinde gözlemledikleri cüce fenotipin, genin ekspresyon seviyesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı

araştırmacı grubu söz konusu genin domateste aşırı ekspres edilmesinin ise transgenik bitkilerde herhangi bir büyüme geriliğine sebep olmadığını açıklamışlardır (Vannini ve ark., 2007). Yapılmış olan bu çalışmada da patates bitkilerinde domatestekine benzer sonuçlar elde edilmiş ve *Osmby4* genini gerek CaMV35S promotor gerekse Cor15a promotörü kontrolünde ekspres eden her iki hat (S2 ve M48) WT bitkiler ile benzer şekilde gelişim göstermiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Su kültüründe büyütülen gen aktarılmamış kontrol bitkileri (WT) ve transgenik bitkiler (S2 ve M48). (a) 1. gün (b) 15. gün.

Figure 1. Non-transgenic control (WT) and transgenic (S2 and M48) plants grown hydroponically. (a) Day-1 (b) Day-15.

Su kültüründe 15 gün büyütülen bitkilere 300 mM tuz uygulandıktan sonra WT ve TR bitkilerin

yapraklarından örnekler alınmıştır. Alınan örneklerle yapılan biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen RWC, elektrolit salınımı, MDA miktarı, H_2O_2 konsantrasyonu, prolin miktarı ve klorofil içeriği ile ilgili veriler Çizelge 1’de sunulmuştur.

RWC hücre hacmi ile yakın ilişkili bir parametredir ve bitkilerde terleme hızı ile yaprak dokusunun su rezervi arasındaki dengeyi gösteren önemli bir belirteçtir (Lugojan ve Ciulca 2011; Farquhar ve ark. 1989). Dolayısıyla RWC bir bitkinin maruz kaldığı stres sonrasında iyileşmesini ve buna bağlı olarak verimini etkilemektedir (Lilley ve Ludlow 1996). Elde edilen sonuçlar RWC’nin S2’de transgenik olmayan bitkilere kıyasla anlamlı oranda yüksek olduğunu göstermiştir. Mattana ve ark. (2005) *Osmby4* ile transforme ettikleri Arabidopsis bitkilerini 15 gün süreyle kuraklık stresine tabi tuttuklarında RWC oranında önemli bir değişim gözlemezken, gen aktarmadıkları kontrol bitkilerinde RWC’nin % 15 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde transgenik olan S2 hattının RWC düzeyinin (% 87.3) gen aktarılmamış bitkilere (% 76.3) oranla daha yüksek olması bu bitkilerin su içeriğini stres koşullarında daha iyi muhafaza edebildiklerini göstermektedir. Bu durum transgenik bitkilerde ekspres edilen MYB4 transkripsiyon faktörünün tuz stresi tolerans mekanizmasında rolü olan bazı genlerin regülasyonunda rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Çizelge 1. Biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen veriler. Veriler, altı örneğin ortalaması \pm SEM değerlerini ifade etmektedir.

Table 1. Data obtained by biochemical analyses. The data represents mean of six samples \pm SEM.

	RWC (%)	Elektrolit salınımı (%)	MDA (nmol g ⁻¹ FW)	H_2O_2 (nmol g ⁻¹ FW)	Prolin (μ mol g ⁻¹ FW)	Toplam klorofil (mg g ⁻¹)
WT	76.3 \pm 2.7	5.7 \pm 0.9	27.7 \pm 2.0	119.8 \pm 24.3	88.8 \pm 1.5	1.8 \pm 0.2
S2	87.3 \pm 4.0*	24.0 \pm 7.0	19.4 \pm 1.0*	154.9 \pm 19.8	86.0 \pm 4.8	1.3 \pm 0.3*
M48	69.4 \pm 2.0	24.4 \pm 13.7	21.8 \pm 0.9*	68.3 \pm 12.8	85.9 \pm 2.2	1.8 \pm 0.4

* Değerler WT bitkilere oranla anlamlı farklılık göstermektedir (P < 0.05).

Stresin hücrede ilk hedef noktası olan hücre zarındaki hasarın bir göstergesi olan MDA miktarı her iki transgenik hatta WT bitkilere kıyasla anlamlı oranda (P < 0.05) düşük bulunmuştur. MYB4 transkripsiyon faktörü R2R3-MYB alt ailesine dahil TFlerden biridir. Yang ve ark. (2012) R2R3-MYB alt ailesine dahil TFlerden biri olan MYB2 ile transforme ettikleri çeltik bitkilerini 200 mM tuz stresine tabi tutmuşlardır. Tuz stresine maruz bırakılan transgenik bitkiler ile gen aktarılmayan kontrol bitkilerini MDA miktarları açısından karşılaştırdıklarında kontrol bitkilerindeki MDA oranının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar OsMYB2’nin aşırı ifade edilmesinin, transgenik bitkileri tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif strese karşı koruduğu ve yüksek tolerans

sağladığı yorumunu yapmışlardır. Raldugina ve ark. (2018) ise *Osmby4* ile transforme ettikleri kanola bitkilerini ağır metal stresine tabi tutmuşlardır. $CuSO_4$ uyguladıkları bitkilerde oksidatif strese bağlı olarak indüklenen lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesini ölçtüklerinde transgenik bitkilerde bu seviyenin daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Her iki araştırmacı grubunun elde ettikleri veriler çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile paralellik göstermektedir. S2 ve M48 transgenik hatlarında stres sonrasında kontrol bitkilerine oranla daha düşük MDA seviyelerinin tespit edilmiş olması MYB4 transkripsiyon faktörünün bu bitkileri tuz stresinin olumsuz etkilerine karşı korumada rolü olabileceğini göstermektedir. Hücre zarındaki hasarın

göstergelerinden bir diğeri olan elektrolit salınımı açısından WT bitkiler ile transgenik bitkiler arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

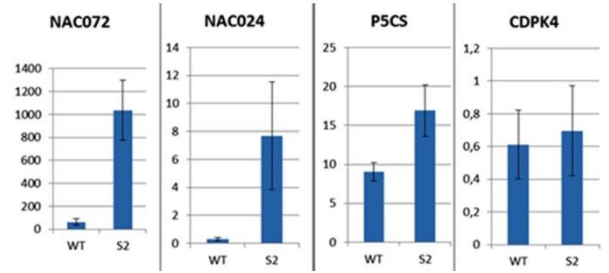
Hidrojen peroksit bitkilerde gerek normal şartlarda gerekse stres koşullarında çeşitli hücrel işlevlerde rolü olan bir moleküldür (Quan ve ark., 2008). Strese maruz kalan bitkilerde H_2O_2 oluşur ve birikerek oksidatif strese neden olur. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler hidrojen peroksitin bitkilerde bir sinyal molekülü olarak rol oynadığını ortaya koymuştur. Dolayısıyla H_2O_2 konsantrasyonunun kontrolü hücre homeostazisi açısından önemlidir (Hernandez ve ark., 2010). Yapılmış olan çalışmada hidrojen peroksit konsantrasyonu S2 transgenik patates hattında WT bitkilere oranla daha yüksek, M48 hattında ise WT bitkilere oranla daha düşük olarak belirlenmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Bitkilerde yaygın olarak bulunan bir aminoasit olan prolin, stres koşullarında sitozolde birikerek ozmotik dengenin ayarlanmasında görev alır. Prolin ozmotik dengeyi sağlamanın yanısıra membran ve protein gibi yapıların stabilizasyonunda, hücrel redoks potansiyelinin korunmasında, serbest radikallerin yakalanmasında ve DNA hasarının engellenmesinde de rol oynayan bir ozmoprotektandır (Çulha ve Çakırlar, 2011). Gomaa ve ark. (2008) ile Mattana ve ark. (2005) *Osmby4* ile transforme ettikleri bitkileri abiyotik strese tabi tuttuklarında bu bitkilerdeki prolin miktarının transforme edilmemiş kontrol bitkilerinden daha yüksek olduğunu ve bu bitkilerin stres toleransının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılmış olan bu çalışmada ise 300 mM tuz stresine maruz bırakılan WT ve TR bitkiler arasında prolin miktarları bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu durum transgenik bitkilerdeki *Osmby4* ifadesinin bitki türüne bağlı olarak farklı etkiler oluşturabileceğine işaret etmektedir. Genellikle stres toleransı yüksek olan bitkilerdeki prolin miktarı strese duyarlı bitkilerden daha yüksek olmaktadır (Szabados ve Savoure, 2010; Sharma ve ark., 2011; Hayat ve ark., 2012). Ancak bu ilişki her zaman bu şekilde olmamaktadır. Tuz stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinin yapraklarında biriken prolin, tuz toleransının değil tuza bağlı olarak oluşan hasarın bir göstergesi de olabilmektedir (Lutts ve ark., 1999). Benzer şekilde tuza toleransları bakımından farklılık gösteren iki sorgum genotipinde, tuza maruz bırakıldıklarında biriken prolin miktarının, tuzluluk toleransına bağlı olarak değil tuz stresinin bir neticesi olarak biriktiği rapor edilmiştir (de-Lacerda ve ark., 2003).

Yüksek tuz konsantrasyonları bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarını etkileyen bir faktördür (Munns ve James, 2003; Bhattacharya ve ark., 2004). Yüksek dozdaki tuz, klorofil sentezini engellemek ya da klorofil yıkımını hızlandırmak suretiyle klorofil miktarının azalmasına neden olabilir (Zhao et al., 2007). Thipyapong ve ark. (2004) klorofil

miktarındaki azalmanın ROS seviyesinin yüksek olması ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Yapılmış olan çalışmada M48 transgenik hattına ait bitkilerdeki klorofil miktarı WT bitkiler ile aynı bulunmuştur. S2 hattına ait bitkilerdeki klorofil miktarının ise WT bitkilerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Bu durum S2 hattındaki bitkilerin H_2O_2 seviyesinin M48 ve WT bitkilere oranla daha yüksek olmasıyla açıklanabilir.

qRT-PCR aracılığı ile belirlenmiş olan *P5CSI*, *StCDPK4*, *StNAC024* ve *StNAC072* genlerinin relatif ekspresyon seviyeleri Şekil 2’de gösterilmektedir. Elde edilen ekspresyon değerleri kullanılarak yapılan t-test sonucunda, S2’de *NAC072* geninin ekspresyon seviyesi WT ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Kuraklık strese ile ilişkili *NAC* transkripsiyon faktörlerinden biri olan *NAC072*’yi yüksek seviyede ifade eden transgenik bitkilerin yüksek kuraklık toleransı gösterdikleri rapor edilmiştir (Tran ve ark., 2004). Bu çalışmada MYB4 transkripsiyon faktörünü yüksek seviyede ifade eden S2 hattına ait bitkilerde *NAC072* gen ifadesinin WT bitkilere oranla daha yüksek tespit edilmiş olması abiyotik stres koşullarında transgenik bitkilerin toleransının daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 2. *StNAC024*, *StNAC072*, *P5CSI* ve *StCDPK4*’ün relatif ekspresyon seviyeleri. Veriler, 3 örneğin ortalaması \pm SEM değerini ifade etmektedir. * Değerler WT bitkilere oranla anlamlı farklılık göstermektedir ($P < 0.05$)

Figure 2. Relative expression levels of *StNAC024*, *StNAC072*, *P5CSI* and *StCDPK4*. The data represents mean of three samples \pm SEM. *The values are significantly different compared to WT ($P < 0.05$).

NAC024 geninin ekspresyon seviyesi de transgenik bitkilerde transgenik olmayanlara oranla yüksek bulunmuştur. Singh ve ark. (2013) patatesteki *NAC* genlerinin genom düzeyindeki ifade profillerini inceledikleri çalışmalarında *NAC024* geninin tuz stresine bağlı olarak indüklendiğini ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri bu veri *NAC024* transkripsiyon faktörünün tuz strese tolerans mekanizması ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Yapılan bu çalışmada *NAC024* gen ifadesinin TR bitkilerde WT bitkilere oranla daha yüksek olması patatesteki heterolog olarak ifade edilen MYB4 transkripsiyon faktörünün tuz strese tolerans

mekanizması ile ilişkili diğer genleri aktive etmek suretiyle bitkileri tuz stresine karşı koruyabileceğini göstermektedir.

Hücre içi prolin akümüasyonu bitkilerin ozmotik strese karşı verdikleri yaygın bir metabolik tepkidir ve P5CS geni bu yolaktaki anahtar enzimdir (Pérez-Arellano ve ark., 2010). Yapılmış olan bu çalışmada S2 hattına ait bitkilerdeki P5CS geninin ekspresyon seviyesi transgenik olmayanlara oranla istatistik olarak anlamlı düzeyde olmamakla birlikte yüksek bulunmuştur. Ancak prolin miktarları incelendiğinde TR bitkiler ile WT bitkiler arasında bir fark görülmemiştir. Gen düzeyindeki farklılığın metabolit düzeyinde görülmemiş olması bitkilerin gen ifade düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmamasından kaynaklanıyor olabileceği gibi transkripsiyon sonrası gerçekleşen çeşitli regülasyon mekanizmalarından da kaynaklanıyor olabilir.

Kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK) bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyen, aynı zamanda biyotik ve abiyotik stres tepkilerini regüle eden enzimlerdir (Hettenhausen ve ark., 2013). Yapılmış olan çalışmada CDPK4 geninin ekspresyon seviyesi S2 bitkileri ile WT bitkilerde birbirine yakın seviyede tespit edilmiştir.

4. Sonuç

Yapılan çalışmalar, WT bitkilere oranla S2 transgenik hattında RWC değerinin daha yüksek olduğunu, her iki transgenik hatta MDA değerlerinin daha düşük olduğunu ve abiyotik stresle ilişkili NAC072, NAC024 ve P5CS genlerinin ifade seviyelerinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde, MYB4 transkripsiyon faktörünün patatesten heterolog ekspresyonunun stresle ilişkili çeşitli biyokimyasal prosesleri ve bazı genlerin ekspresyon seviyelerini etkilemek suretiyle abiyotik stres tolerans mekanizmasının düzenlenmesinde etkili bir transkripsiyon faktörü olabileceğine işaret etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından 16401046 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Aydın, G., Yucel, M., Chan, M.-T., Oktem, H.A., 2014. Evaluation of abiotic stress tolerance and physiological characteristics of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Kennebec) that heterologously expresses the rice *Osm4* gene. *Plant Biotechnology Reports*, 8(3): 295-304. doi:10.1007/s11816-014-0322-7

- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: s. 205–207. DOI:10.1007/BF00018060
- Bernt, E., Bergmeyer, H.U., 1974. Inorganic Peroxides, In: Bergmeyer, H.U. (Eds). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press. pp. 2246-2248.
- Bhattacharya, R. C., Maheswari, M., Dineshkumar, V., Kirti, P. B., Bhat, S. R., Chopra, V. L., 2004. Transformation of *Brassica oleracea* var. capitata with bacterial betA gene enhances tolerance to salt stress. *Scientia Horticulturae*, 100: 215–227. doi:10.1016/j.scienta.2003.08.009
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Wewrtilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists. pp. 1158-1249.
- Burssens, S., Himanen, K., Cotte, B.V., Beekman, T., Montagu, M.V., Inze, D. Verbruggen, N., 2000. Expression of Cell Cycle Regulatory Genes and Morphological Alterations in Response to Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211: 632-640. doi:10.1007/s004250000334
- Chen, R. M., Ni, Z. F., Nie, X. L., Qin, Y. X., Dong, G. Q., Sun, Q. X., 2005. Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 169(6): 1146-1154. doi:10.1016/j.plantsci.2005.07.018
- Çulha, Ş., Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11: 11-34.
- Dajic, Z., 2006. *Salt Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. 345p, Dordrecht, The Netherlands.
- de-Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A., Prisco, J.T., 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environ Exp Bot*, 49:107–120. doi:10.1016/s0098-8472(02)00064-3
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M., Huang, Y. B., Tang, Y. X., 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry-Moscow*, 74(1): 1-11. doi:10.1134/s0006297909010015
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 15: 573–581. doi:10.1016/j.tplants.2010.06.005
- Farquhar, G.D., S.C. Wong, J.R. Evans, K.T. Hubic, 1989. Photosynthesis and gas exchange. In: H.G. Jones, T.J. Flowers & M.B. Jones (Eds.), *Plant under Stress*. pp 47–69. Cambridge University Press, Cambridge.

- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling Networks. *Front. Plant Sci*, 5: 151. doi:10.3389/fpls.2014.00151
- Gomaa, A. M., Raldugina, G. N., Burmistrova, N. A., Radionov, N. V., & Kuznetsov, V. V., 2011. Response of transgenic rape plants bearing the *Osmyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(1): 105–114. doi:10.1134/s1021443711060070
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11): 1456–1466. doi:10.4161/psb.21949
- Hemm, M.R., Herrmann, K.M., Chapple, C., 2001. *AtMYB4*: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends in Plant Science*, 6(4): 135-136. doi:10.1016/s1360-1385(01)01915-x
- Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Diaz-Vivancos, P., Olmos, E., 2010. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *J Exp Bot*, 61: 521–535. doi: 10.1093/jxb/erp321
- Hettenhausen, C., Yang, D.-H., Baldwin, I. T., Wu, J., 2013. Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1): e22784. doi: 10.4161/psb.22784
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347: 1-32.
- Hu, Y., Schmidhalter, U., 2005. Drought and Salinity: A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants. *Journal of Plant Nutrient and Soil Science*, 168: 541-549. doi:10.1002/jpln.200420516
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., Martin, C., 2000. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 19(22): 6150-6161. doi:10.1093/emboj/19.22.6150
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3): 287-291. doi:10.1038/7036
- Laura, M., Consonni, R., Locatelli, F., Fumagalli, E., Allavena, A., Coraggio, I., Mattana, M., 2010. Metabolic response to cold and freezing of *Osteospermum ecklonis* overexpressing *Osmyb4*. *Plant Physiol Biochem*, 48(9): 764-771. doi:10.1016/j.plaphy.2010.06.003
- Li, C., Ng, C.K.-Y., Fan, L.-M., 2015. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ. Exp. Bot.*, 114: 80–91. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.014
- Lichtenthaler HK.: Chlorophyll and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembrances za Colowick S.P., Kaplan N.O. *Methods in Enzymology*. Vol. 148. Pp. 350–382. Academic Press, San Diego – New York – Berkley – Boston – London – Sydney – Tokyo – Toronto 1987.
- Lilley, J.M., Ludlow, M.M., 1996. Expression of osmotic adjustment and dehydration tolerance in diverse rice lines. *Field Crop Res*, 48: 185–197. doi:10.1016/s0378-4290(96)00045-7
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1998. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(8): 1391-1406. doi:10.1105/tpc.10.8.1391
- Lugojan, C., Ciulca, S., 2011. Evaluation of relative water content in winter wheat. *J. Hort. Fores. Biotechnol.*, 15: 173–177
- Lutts, S., Majerus, V., Kinet, J.-M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plant*, 105:450–458. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105309.x
- Madhava Rao, K.V., Srestry, T.V., 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea in response to zinc and nickel stress. *Plant Science*, 157: 113-128. doi:10.1016/s0168-9452(00)00273-9
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2): 139-158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018
- Mattana, M., Biazzi, E., Consonni, R., Locatelli, F., Vannini, C., Provera, S., Coraggio, I., 2005. Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 125(2): 212-223. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00551.x
- Mohammad, M., Shibli, R., Ajlouni, M. Nimri, L., 1998. Tomato Root and Shoot Responses to Salt Stress Under Different Levels of Phosphorus Nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8): 1667-1680.
- Munns, R. Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681. doi:10.1080/01904169809365512
- Munns, R., 2002. Salinity, Growth and Phytohormones, *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Kluwer Academic Publishers, 522p, Dordrecht, The Netherlands.
- Munns, R., James, R.A., 2003. Screening method for salinity tolerance: A case study with tetraploid wheat. *Plant Soil*, 253: 201-218. doi:10.1023/a:1024553303144
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in

- Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett, 461: 205–210. doi:10.1016/s0014-5793(99)01451-9
- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421): 2907-2914. doi:10.1093/jxb/eri285
- Pasquali, G., Biricolti, S., Locatelli, F., Baldoni, E., Mattana, M., 2008. *Osmyb4* expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Rep*, 27(10): 1677-1686. doi:10.1007/s00299-008-0587-9
- Pérez-Arellano, I., Carmona-Álvarez, F., Martínez, A. I., Rodríguez-Díaz, J., Cervera, J., 2010. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science*, 19: 372-382. doi:10.1002/pro.340
- Poljakoff- Mayber, A., Gale, J., 1975. *Plant in Salin Environments*. Springer-Verlag, 213p, Berlin.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 2–18. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Raldugina, G. N., Maree, M., Mattana, M., Shumkova, G., Mapelli, S., Kholodova, V. P., ... Kuznetsov, V. V., 2018. Expression of rice *OsMyb4* transcription factor improves tolerance to copper or zinc in canola plants. *Biologia Plantarum*, 62(3): 511–520. doi:10.1007/s10535-018-0800-9
- Reddy, M.P., Iyengar, E.R.R., 1999. *Crop Responses to Salt Stress: Seawater Application and Prospects*, Handbook of Plant Crop Stress, 1198p, New York.
- Sharma, S., Villamor, J.G., Verslues, P.E., 2011. Essential role of tissuespecific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*, 157: 292–304. doi:10.1104/pp.111.183210
- Singh, A.K., Sharma, V., Pal, A.K., Acharya, V., Ahuja, P.S., 2013. Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA Research*, 20: 403–423. doi:10.1093/dnares/dst019
- Smart, R.E., Bingham, G.E., 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol*, 53: 258–260. DOI: 10.1104/pp.53.2.258
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional aminoacid. *Trends Plant Sciences*, 15:89–97. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolf, D.W., Steffens, J.C., 2004. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.*, 167: 693-703. doi:10.1016/j.plantsci.2004.04.008
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481–2498. doi:10.1105/tpc.104.022699
- Vannini, C., Locatelli, F., Bracale, M., Magnani, E., Marsoni, M., Osnato, M., Mattana, M., Baldoni, E., Coraggio, I., 2004. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*, 37(1): 115-127. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01938.x
- Vannini, C., Iriti, M., Bracale, M., Locatelli, F., Faoro, F., Croce, P., Pirona, R., Di Maro, A., Coraggio, I., Genga, A., 2006. The ectopic expression of the rice *Osmyb4* gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1-3): 26-42. doi:10.1016/j.pmpp.2006.12.005
- Vannini, C., Campa, M., Iriti, M., Genga, A., Faoro, F., Carravieri, S., Rotino, G. L., Rossoni, M., Spinardi, A., Bracale, M., 2007. Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice *Osmyb4* gene. *Plant Science*, 173(2): 231-239. doi:10.1016/j.plantsci.2007.05.007
- Wang, W. X., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1): 1-14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M., Jeschke, W. D., 1991. The Role of the Stem in the Partitioning of Na⁺ and K⁺ in Salt-Treated Barley. *J. of Exp. Bot.*, 42: 278-282. doi.org/10.1093/jxb/42.6.697
- Yang, A., Dai, X., Zhang, W.-H., 2012. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 63(7): 2541–2556. doi:10.1093/jxb/err431
- Zhao, G.Q., Ma, B.L., Ren, C.Z., 2007. Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Sci.*, 47: 123-131. doi:10.2135/cropsci2006.06.0371