

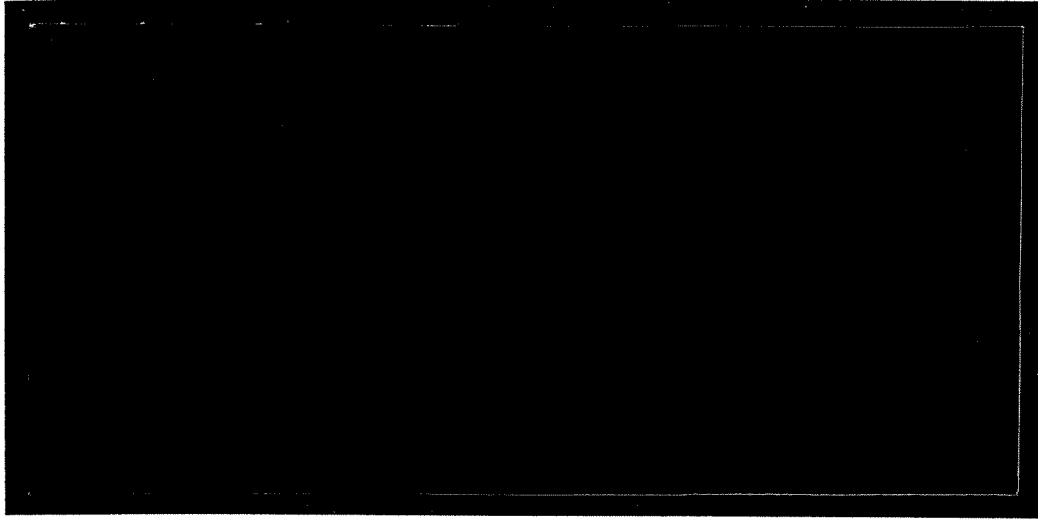
Dup

1997-520



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

**HERBİSİTLERE DİRENÇLİ TRANSJENİK TÜTÜN
BİTKİLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLER
İLE GELİŞTİRİLMESİ**

PROJE NO: TBAG-1262

**Doç.Dr.Hüseyin Avni ÖKTEM
Prof.Dr. Meral YÜCEL
Yalın SOYER
Nazlı Maki
Fusun İNCİ
Meltem MAVİTUNA
Metin BİLGİN**

**ARALIK 1996
ANKARA**

ÖNSÖZ

Sunulan rapor, “Herbisitlere Dirençli Transgenik Tütün Bitkilerinin Biyoteknolojik Yöntemler İle Geliştirilmesi” başlıklı ve TBAG-1262 Nolu, TÜBİTAK tarafından desteklenen Araştırma Projesi kapsamında yürütülen araştırmaları ve elde edilen sonuçları sunmaktadır. Proje esnasında gerçekleştirilen tüm çalışmalar O.D.T.Ü. Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Biyokimyası ve Moleküler Biyolojisi Araştırma Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Raporun ilk bölümünde Ağustos 1996 bazıyla konuya yönelik literatür bilgisi verilmektedir. Raporun ikinci bölüm olan “Materyal ve Metodlar” kısmında proje esnasında yürütülen deneysel çalışmaların yöntemleri sunulmakta ve üçüncü bölümde ise elde edilen sonuçlar sunulmaktadır. Raporun son bölümünde gözlenen sonuçlar tartışılmakta ve ileriye yönelik araştırma önerileri verilmektedir.

Deneylerde kullanılan pDHB321.1 ve pGKB5 ikili vektörlerini sağlayan, INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Fransa’dan Dr. David Bouchez’ e ve fotoğraf çekimlerini büyük bir sabır ve tizlikle gerçekleştiren, O.D.T.Ü. Fizik Bölümü Fotoğraf Laboratuvarından Sayın Doğan Yaşar ve Hasan Yılmaz’a içtenlikle teşekkür ederiz.

Her ne kadar proje ekibinde gözükmesede, projenin başarı ile sonuçlanmasında büyük emeği geçen Yüksek Lisans öğrencimiz Fahriye Setenci’ye göstermiş olduğu özverili ve titiz çalışmalarından dolayı teşekkür ederiz.

Doç. Dr. Hüseyin Avni Öktem

Proje Yöneticisi

Aralık 1996, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİLLERİN VE TABLOLARIN LİSTESİ	6
ÖZ	8
BÖLÜM 1: GİRİŞ	10
1.1 Yabancı Ot ve Herbisitler	10
1.2 Herbisit Dirençli Kültür Bitkileri.....	12
1.2.1. Hedef Molekülün Modifikasyonu.....	12
1.2.2. Hedef Molekülün Fazla Üretimi.....	13
1.2.3. Etken Maddenin Detoksifikasyonu.....	13
1.3. Glutamin Sentetaz İnhibitörleri.....	14
1.3.1. PPT Etki Mekanizması	15
1.3.2. PPT Dirençli Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi.....	16
1.3.2.1. PPT'yi Detoksifiye Edebilen Enzimler.....	17
1.3.2.2. Transformasyon Çalışmaları	18
1.4. Projenin Amacı ve Kapsamı.....	20
1.5 Önerilen ve Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması.....	21
1.5.1. Amaç Bazında	21
1.5.2. Kapsam ve Yöntem Bazında	21
BÖLÜM 2. MATERYAL VE METODLAR	23
2.1. Bitki Materyali	23
2.2. bar Genini Taşıyan Binary Vektörlerin ve Agrobacterium Suşlarının Eldesi.....	23
2.2.1. Bakteri Hücrelerinin Büyütülmesi.....	26
2.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu.....	26
2.2.3. Plazmid DNA izolasyonu.....	27
2.2.3.1. Küçük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Mini prep).....	27
2.2.3.2. Büyük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Maksiprep)	28
2.2.4. Restirksiyon Enzim (RE) Hidrolizi	29
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.2.6. Jellerin Görüntülenmesi	29
2.2.7. Triparental Mating Yöntemi	30
2.3. Transformasyon Çalışmaları	31

2.3.1. Kullanılan Ortamlar	31
2.3.2. Yaprakların Yüzeysel Sterilizasyonu	32
2.3.3. Yaprak Diski Transformasyonu.....	33
2.3.4. Selksiyon ve Rejenerasyon Çalışmaları.....	33
2.4. Transgenik Materyalin Analizi.....	34
2.4.1. Yaprak Diski Analizi	34
2.4.2. Yaprak Boyama Analizi.....	35
2.4.3. Herbisit Uygulaması	35
2.4.4. Southern Blot Analizleri	35
2.4.4.1 Genomik DNA İzolasyonu	36
2.4.4.2. Restriksiyon Enzim Hidrolizi.....	37
2.4.4.3. Prob Hazırlanması.....	37
2.4.4.3.1. Insert Eldesi	37
2.4.4.3.1.1. Elektro-elusyon Yöntemi	38
2.4.4.3.1.2. Dializ Yöntemi	38
2.4.4.3.2. Insert İşaretlenmesi	39
2.4.4.4. Genomik DNA'ların Naylon Membranlara Aktarılması	40
2.4.4.5. Hibridizasyon Deneyleri	41
2.4.4.6. Blotun Görüntülenmesi	41
2.4.5. PCR Çalışmaları	41
2.4.6. Elektforez Çalışmaları	42
2.4.6.1. Total Protein İzolasyonu	42
2.4.6.2. SDS-PAGE	43
2.4.6.2.1. Örneklerin Hazırlanması	43
2.4.6.2.2. Jellerin Boyanması	43
BÖLÜM 3. SONUÇLAR.....	44
3.1. Binary Vektörleri Taşıyan Agrobacterium Suşlarının Eldesi.....	44
3.2. Kontrol Bitkilerle Rejenerasyon Çalışmaları.....	47
3.2.1. Kontrol Bitkilerin Normal Koşullardaki Rejenerasyonu	47
3.2.1.1. Kallus ve Gövde Oluşumu.....	47
3.2.1.2. Kök Oluşumu.....	48
3.2.1.3. Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri	49
3.2.2. Kontrol Bitkilerin Seçici Ortamlarda Gösterdikleri Gelişme	50
3.2.2.1. Kallus ve Gövde Oluşumu.....	50
3.2.2.2. Kök Oluşumu.....	53
3.3. Transformasyon Çalışmaları	54
3.3.1. pDHB321.1 Binary Vektörü ile Yapılan Deneyler	54
3.3.1.1. Transformasyon Sonrası Kallus ve Gövde Oluşumu	55
3.3.1.2. Öncül Transgenik Gövdelerde Kök Oluşumu	55
3.3.1.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri.....	57
3.3.2. pGKB5 Binary Vektörü İle Yapılan Deneyler	57
3.3.2.1. Transformasyon Sonrası Kallus ve Gövde Oluşumu	57
3.3.2.2. Transgenik Gövdelerde Kök Oluşumu.....	62
3.3.2.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri.....	64
3.4. Transgenik Materyalin Analizi.....	65
3.4.1. Yaprak Diski Analizi	66
3.4.2. Yaprak Boyama Analizi.....	68
3.4.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Herbisit Uygulamasına Gösterdikleri Tepkiler.....	72
3.4.3.1. % 0.25 (V/V) BASTA Uygulaması	72

3.4.3.2. % 1 (V/V) BASTA Uygulamasını	76
3.4.3.3. Herbisit Uygulamasının Transgenik Bitkilerin Gelişimi Üzerine Etkileri	76
3.4.4. Southern Blot Analizleri	81
3.4.4.1. Insert İzolasyonu İşaretlenmesi ve Derişim Tayini	81
3.4.4.2. Hibridizasyon Deneyleri	83
3.4.5. PCR Çalışmaları	84
3.4.6. Elektroforez Çalışmaları	84
BÖLÜM 4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	87
4.1. Transformasyon Seleksiyon ve Rejenerasyon Çalışmaları	87
4.2. Transgenik Materyalin Analizi	88
4.2.1. Bitkilerin Herbisit Muamelesine Gösterdikleri Tepkiler	89
4.2.1.1. Bitkiler Toprağa Alınmadan Önceki Analizler	89
4.2.1.2. Bitkiler Toprağa Alındıktan Sonraki Analizler	90
4.2.2. Bitkilerin Moleküler Seviyedeki Analizleri	91
4.2.2.1. Southern Blot ve PCR Analizleri	91
4.2.2.2. Elektroforez Çalışmaları	92
4.3. İleriye Dönük Araştırma Önerileri	92
4.4. Sonuç	93
KAYNAKLAR	94
EKLER	103
EK.1: pDHB321.1 ve pGKB5 plazmidleri için alınan kullanım izini	103
EK 2: Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri	104
EK 3: SDS-PAGE Deneylerinde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri	104
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	106

ŞEKİLLERİN ve TABLOLARIN LİSTESİ

<i>Tablo 1.1. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar.....</i>	<i>10</i>
<i>Tablo 1.2. Yaygın olarak kullanılan herbisitler.</i>	<i>11</i>
<i>Şekil 1.3.1 PPT'nin kimyasal yapısı.</i>	<i>15</i>
<i>Şekil 2.2.1. pDHB321.1 binary vektörü.....</i>	<i>24</i>
<i>Şekil 2.2.2. pGKB5 binary vektörü.....</i>	<i>25</i>
<i>Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan ortamların kompozisyon ve kullanım amaçları.....</i>	<i>32</i>
<i>Şekil 3.1.1. pDHB321.1 plazmidinin PstI RE'le hidroliz sonucu oluşan DNA parçacıklarının agaroz jel profilleri.....</i>	<i>45</i>
<i>Şekil 3.1.2. Triparental mating ve maksiprep deneyleri sonucu elde edilen plasmidlerin RE hidrolizi sonrası agaroz jel elektroforez sonuçları.....</i>	<i>46</i>
<i>Şekil 3.2.1. Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin MSA ortamındaki 2 aylık gelişimi.</i>	<i>48</i>
<i>Şekil 3.2.2. Kontrol bitkilerde MSC ortamındaki kök oluşumu.</i>	<i>49</i>
<i>Şekil 3.2.3. MSC ortamında köklendirilen kontrol bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.</i>	<i>51</i>
<i>Şekil 3.2.4 Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin değişik derişimlerde Glufosinat amonyum içeren MSB ortamlarındaki 10 günlük gelişimleri.</i>	<i>52</i>
<i>Şekil 3.2.5. Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin değişik derişimlerde PPT içeren MSB ortamlarındaki 20 günlük gelişimleri.</i>	<i>52</i>
<i>Şekil 3.2.6. Kontrol bitkilerden elde edilen gövdelerin PPT içeren MSC ortamındaki gelişimleri.</i>	<i>53</i>
<i>Şekil 3.3.1. LBA:pDHB suşu ile yapılan transformasyon deneyinden elde edilen örnek sonuç.</i>	<i>56</i>
<i>Şekil 3.3.2. Kontrol ve LBA:pDHB ile transform edilmiş disklerden elde edilen gövdelerin MSC ortamlarındaki kök oluşumları.....</i>	<i>58</i>
<i>Şekil 3.3.3. LBA:pDHB ile muamele edilip PPT içeren MSB ortamlarında gelişen gövdelerin seçici MSC ortamlarındaki kök oluşumları.....</i>	<i>59</i>
<i>Şekil 3.3.4. LBA:pDHB ile yapılan transformasyon deneyleri sonucu elde edilen bir öncül transgenik bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.</i>	<i>59</i>
<i>Şekil 3.3.5. LB5-1:pGK5 suşu ile yapılan transformasyon deneyinden elde edilen örnek sonuç.</i>	<i>60</i>
<i>Şekil 3.3.6. Altkültüre alınan transgenik kallustan gövde oluşumu.....</i>	<i>61</i>
<i>Şekil 3.3.7. Kontrol ve LB5-1:pGK5 ile transform edilmiş disklerden elde edilen gövdelerin MSC ortamlarındaki kök oluşumları.....</i>	<i>62</i>
<i>Tablo 3.1. MSC seçici ortamına alınan gövdelerde kök oluşturma frekansı.....</i>	<i>63</i>
<i>Şekil 3.3.8. Altkültürde gelişen 21 günlük gövdelerin seçici MSC ortamındaki kök gelişmeleri.....</i>	<i>63</i>
<i>Şekil 3.3.9. LB5-1:pGK5 ile yapılan transformasyon deneyleri sonucu elde edilen öncül bir transgenik bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.</i>	<i>64</i>
<i>Şekil 3.4.1. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSA ve MSB seçici ortamlarında gösterdikleri gelişme.</i>	<i>66</i>
<i>Şekil 3.4.2. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSB ortamlarında gösterdikleri gelişme.</i>	<i>67</i>
<i>Şekil 3.4.3. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 0.25 (V/V) ®BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.</i>	<i>69</i>
<i>Şekil 3.4.4. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 1 (V/V) ®BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.</i>	<i>70</i>
<i>Şekil 3.4.5. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 3 (V/V) ®BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.</i>	<i>71</i>
<i>Şekil 3.4.6. Su ve % 0.25 (V/V) ®BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme.....</i>	<i>73</i>
<i>Şekil 3.4.7. Öncül transgenik bütün bitkilerinin %0.25 (V/V) ®BASTA muamelesine gösterdikleri tepki.</i>	<i>74</i>
<i>Şekil 3.4.8. Su ve % 0.25 (V/V) ®BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme.....</i>	<i>75</i>
<i>Şekil 3.4.9. Su ve % 1 (V/V) ®BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme.....</i>	<i>77</i>
<i>Şekil 3.4.10. Öncül transgenik bütün bitkilerinin % 1 (V/V) ®BASTA muamelesine gösterdikleri tepki.</i>	<i>78</i>

Şekil 3.4.11. Öncül transgenik tütün bitkilerinin % 1 (V/V) [®] BASTA ve su muamelesine gösterdikleri tepki.	79
Şekil 3.4.12. Toprakta gelişimlerini sürdürmekte olan transgenik hatlar.	80
Şekil 3.4.12. İşaretlenen insertün değişik derişimlerde NBT-X-Fosfat yöntemi ile görüntülenmesi.	82
Şekil 3.4.13. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örneklerinin bar probu ile hibridizasyonu.	83
Şekil 3.4.14. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örneklerinin bar primeri ile amplifikasyonu.	85
Şekil 3.4.15. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan protein örneklerinin SDS-PAGE profilleri.	86

ÖZ

Bu projede aktif maddesi glufosinat amonyum veya phosphinotricin (PPT) olan herbisitlere direnç gösteren transgenik tütün (*Nicotiana tabacum*, Samsun) bitkilerinin geliştirilmesi yönünde araştırmalar yürütülmüştür. Bu amaçla, glufosinat amonyumu asetilasyon yoluyla detoksifiye edebilen bir enzim olan fosfonitrosin N-asetil transferaz'ın (PAT) sentezinden sorumlu olan *bar* geni tütün bitkilerine aktarılmıştır. Araştırmalarda T-DNA bölgelerinde CaMV35S promotör ve ocs terminatör bölgelerinin kontrolü altındaki *bar* genini taşıyan pDHB321.1 ve pGKB5 ikili vektörleri kullanılmıştır. Saf durumda elde edilen bu vektörler önce DMSO yöntemi ile hazırlanan kompetan *E.Coli* HB101 suşlarına, daha sonra da "triparental mating" yöntemi ile *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına aktarılmıştır. Gen transferi "yaprak diski transformasyonu" yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki vektör ile yapılan transformasyon deneylerinin sonucunda, kontrol bitkiler için öldürücü olan 10 mg/l PPT derişiminde kallus, gövde ve kök oluşmaları gözlenmiştir. Kök oluşturan öncül transgenik bitkiler kültür koşullarında 0.5, 2 ve 6 gr/l glufosinat amonyum içeren %0.25, %1 ve %3 (V/V) ®BASTA herbisit uygulamalarına direnç göstermiştir. Elde edilen öncül transgenik bitkiler toprağa alındıktan sonra uygulanan %0.25 ve %1 (V/V) ®BASTA herbisiti uygulamalarından da etkilenmemektedir. Aynı şartlarda geliştirilen ve % 0.25 ve %1 (V/V) ®BASTA ile mamele edilen kontrol bitkilerin, muameleden 15 ila 20 gün sonra öldükleri gözlenmiştir. Toprakta gelişmekte olan transgenik bitkiler üzerinde yapılan Southern Blot analizleri *bar* geninin bitki genomuna integre olduğunu doğrulamaktadır. Protein seviyesinde yapılan çalışmalarda da transgenik bitkilerin kontrol bitkilerde gözlenmeyen 22 kD ağırlığındaki PAT enzimini sentezledikleri gözlenmiştir.

ABSTRACT

This study was performed to develop transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, Samsun) that resist to the herbicides containing glufosinat ammonium or phosphinotricin (PPT) as the active ingredient. For this purpose the *bar* gene that is responsible for the synthesis of Phosphinotricin N-acetyl-transferase (PAT) enzyme, which detoxifies glufocinate ammonium through acetylation is transferred to tobacco plant. In the experiments, the binary vectors pDHB321.1 and pGKB5 were used. These carry the *bar* gene under control of CaMV35S promoter and ocs terminator in the T-DNA region. The purified vectors were firstly mobilized to the competent *E.coli* HB101 strains, prepared with the DMSO method and than to the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strains via triparental mating method. Gene transfer was performed by using the leaf disc transformation system. At the end of the transformation experiments using both of the vectors, at 10 mg/L PPT, which is the lethal dose for control plants, callus stem and root formation were observed. The root forming primary transgenic plants were resistant to 0.25 %, 1 % and 3 % (v/v) [®]BASTA herbicide containing 0.5, 2.0 and 6.0 g/L glufosinate ammonium, respectively. The primary transgenic plants after being transferred to soil were also not effected from 0.25 % and 1 % (v/v) [®]BASTA herbicide application. The control plants grown under the same conditions and treated with 0.25 % and 1 % (v/v) [®]BASTA were died after 15-20 days of application. The Southern Blot and PCR analysis confirmed that, the *bar* gene is integrated into the genome of the transgenic plants. Studies at protein level was also confirmed the synthesis of 22 kD PAT enzyme, which was absent in control plants.

BÖLÜM 1:

GİRİŞ

1.1 Yabancı Ot ve Herbisitler

Yabancı otlar kültür arazisinde bulunan ve yarardan çok zarar veren bütün bitkiler olarak tanımlanabilir. Kültür bitkilerinde çeşitli etmenlerin (hastalık, hayvansal zararlılar gibi) meydana getirdiği ürün kayıpları ele alındığında, özellikle kurak geçen yıllarda yabancı otların etkisinin en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Dünyadaki üretim bazında hububat, meyva, sebze ve bağlarda yabancı otlara bağlı olarak gözlenen ürün kayıpları Tablo 1' de özetlenmektedir. Görüleceği gibi bu kayıplar toplam üretimle mukayase edildiğinde oldukça önemli boyutlara ulaşmaktadır.

Tablo 1.1. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar. (Özer, 1993)

ÜRÜN ÇEŞİDİ	MİLYON TON		
	Elde Edilen Ürün	Yabancı Ot Kayıpları	Hastalık Kayıpları
HUBUBAT	433.903	54.349	50.589
SEBZE	201.691	23.718	31.137
MEYVE	66.567	2.462	12.825
BAĞ	50.697	7.909	16.937

Yabancı otlarla mekanik, fiziksel, biyolojik ve kimyasal olarak değişik şekillerde mücadele edilebilmektedir. Bu yöntemlerden kimyasal mücadele başka bir deyişle herbisit kullanımı oldukça yaygın olarak kullanılan bir mücadele şeklidir. Halen değişik aktif madde içeren ve etki mekanizmaları olan herbisitler bulunmaktadır (Holt 1993). Bunlar Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo 1.2. Yaygın olarak kullanılan herbisitler.

ETKİLİ MADDE	ETKİLEDİĞİ SİSTEM	HEDEF PROTEİN	SPEKTRUM
sulfonylurea, imidazolinone, triazolopyrimidine	Amino asit sentezi	Asetolactate synthase (ALS)	seçici
Glyphosate	Amino asit sentezi	5-Enoylpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)	total
Phosphinothricin (PPT), glufosinate	Amino asit sentezi	Glutamine synthase (GS)	total
Triazin, urea, uracil, bromoxylin, ioxynil	Fotosistem-II	Q _B	total
Aryloxypropionate (AOPP), 1,3-cyclohexanedione (CHD)	Lipid sentezi	Acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase)	seçici
Fenoksi asetik asitler (2-4D)	?	?, oksin reseptörleri	seçici
Dinitroanilinler	Hücre bölünmesi	tübülin	seçici
Bipyridilumlar, Praquat, diquat	Fotosistem-I	elektron transfer sistemi	total

1.2 Herbisit Dirençli Kültür Bitkileri

Yabancı otlarla kimyasal mücadelede kullanılan herbisitlerin seçiciliği ve toksisitesi önemli parametrelerdir. Başka bir deyişle, kullanılan herbisitler, yabancı otlara maksimum zararı verirken kültür bitkisini ise minimum seviyede etkilemesi istenmektedir. Ayrıca herbisitlerin ekosisteme en az seviyede toksik etki vermesi ve toprakta mikro organizmalarca yıkılabilmesinde istenen özellikler arasındadır.

Son yıllarda kültür bitkilerinin genetik manipülasyonlar yoluyla herbisitlere dirençli hale getirilmesi yönünde çalışmalar gözlenmektedir (Botterman ve Leemans 1988, Mazur ve Falco 1989, Holt 1993, Hoyle 1993). Bu yönde yapılan çalışmalarda başlıca üç değişik strateji izlenmektedir ve bunlar aşağıda bölümler halinde özetlenmektedir.

1.2.1. Hedef Molekülün Modifikasyonu

Bunlardan ilki, herbisitlerin aktif maddesinin etkilediği hedef proteinin modifikasyonudur. Bu amaçla hedef proteinin sentezinden sorumlu gen ya modifiye edilmekte ya da bu gen söz konusu herbisite dirençli organizmalardan izole edilerek bitkilere aktarılmaktadır. Sonuçta bitkilere normal hücre işlevini görebilen fakat herbisitlerin aktif maddesine duyarlı yeni bir molekül sentezlettilmektedir. Söz konusu strateji izlenerek ve mutant *ALS* genleri kullanılarak sulfonilurea tipi herbisitlere dirençli transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Bedbrook ve arkadaşları 1988, Haughn ve arkadaşları 1988, Fromm ve arkadaşları 1990, Brandle ve arkadaşları 1994) ve tarla denemelerinde yapılmıştır (Mazur ve arkadaşları 1987, Brandle ve Miki 1993).

Benzeri strateji fotosistem-II Q_B proteinini etikleyen triazin tipi herbisitler içinde uygulanmıştır. Triazine dirençli yabancı otlardan ve cyanobakteriden izole edilen *psbA* geni tütüne aktarılıp atrazin'e dirençli transgenik bitkiler elde edilmiştir (Cheung ve arkadaşları

1988). Mutant psbA geni taşıyan patates hücre kültürlerinin de atrazine direç gösterdikleri saptanmıştır (Smeada ve arkadaşları 1993).

Yine benzeri bir yaklaşımla, *Salmonella typhimurium* dan izole edilen mutant bir *aroA* geni tütün ve domatase aktararak glyphosate dirençli bitkiler elde edilmiştir (Comai ve arkadaşları 1985, Della-Cioppa ve arkadaşları 1987). Karaçam üstüde yürütülen transformasyon çalışmalarında da *aroA* geni aktararak herbisit dirençli transgenik bitki elde edilmiştir (Shin ve arkadaşları 1994).

1.2.2. Hedef Molekülün Fazla Üretimi

İkinci stratejide bitkilerdeki hedef molekül bazı genetik manipülasyonlar sonucu daha fazla üretilmekte, böylece herbisit aktif maddesinin varlığında bile hedef molekülün sorumlu olduğu hücrel fonksiyonlar yerine getirilebilmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalarda petunyada EPSPS aktivitesi 20 kez arttırılarak glyphosate toleransı sağlanmıştır (Shah 1986). Başka bir çalışmada, darıdan izole edilen EPSPS buğdaya aktarılmış ve elde edilen kallus dokusunun glyphosate direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Vasil ve arkadaşları 1991). *Brassica napusta* glutamin sentetaz enziminin fazla sentezlettilmesi sonunda PPT'ye dirençli bitkiler elde edilmiştir (Downs ve arkadaşları 1994). Aynı strateji tütünde de uygulanmış ve başarılı sonuçlar rapor edilmiştir (Eckes ve arkadaşları 1989).

1.2.3. Etken Maddenin Detoksifikasyonu

Üçüncü ve son stratejide ise, bitkiye herbisit aktif maddesini detoksifiye eden yeni bir enzim sentezlettilmektedir. Bu amaçla detoksifikasyon yapan enzimin sentezinden sorumlu gen bitkilere aktarılmakta, bu sayede de herbisit aktif maddesi hedef molekül etkileyemeyen bir bileşiğe çevrilmekte, dolayısıyla hedef molekül de herbisit varlığında dahi normal hücrel işlevini yürütebilmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda da bitkilere 2-4,D detoksifikasyonunu olası kılan bakteri orijinli monooksijenaz enzimi sentezlettilererek bu herbisite dirençli tütün (Streber ve Willmitzer 1989, Lyon ve arkadaşları 1989) ve pamuk (Lyon ve arkadaşları 1993) bitkileri geliştirilmiştir. Yine, PPT'nin detoksifikasyonunu sağlamak amacıyla bakteri orijinli *bar* (Murakami ve arkadaşları 1986, Thompson ve arkadaşları 1987) ve *pat* (Wohllenberg ve arkadaşları 1988) genleri bitkilere aktarılarak bialaphos ve/veya glufosinat amonyuma dirençli transgenik bitkiler geliştirilmiştir (De Block ve arkadaşları 1987, Vasil ve arkadaşları 1992) ve tarla denemelerinde de bu bitkilerin yüksek dozda herbisite direnç gösterebildikleri saptanmıştır (De Greff ve arkadaşları 1989, D'Halluin ve arkadaşları 1990).

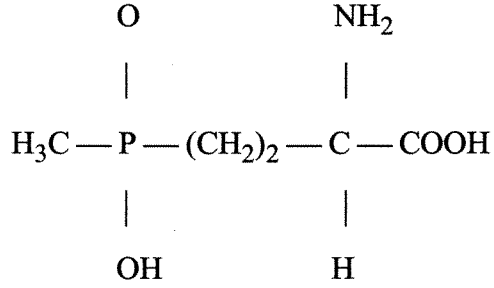
Son yıllarda ise bitkilere herbisitlerin aktif maddelerine özgün antikorlar ürettirilerek, herbisit dirençli transgenik bitkilerin eldesine yönelik çalışmalara da rastlanmaktadır (Longstaff ve arkadaşları 1996).

1.3. Glutamin Sentetaz İnhibitörleri

Gram pozitif toprak bakterileri olan *Streptomyces Hygroscopicus* ve *S. Viridochromogenes* suşları fosfonotrisil-alanil-alanin yapısında bir tripeptid üretmektedirler. Bakterilerce üretilen bu bileşik Bialaphos olarak adlandırılan bir antibiyotiktir. Bialaphos'un hücre içerisinde peptidaz aktivitesi ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan Phosphinotricin (PPT) (Şekil 1.3.1) glutamin amino asidinin bir analogu olup, amino asit biyosentzinde rol alan glutamin sentetaz (GS) enziminin yarışımlı inhibitörüdür. PPT bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinde GS enzimlerini inhibe edebilmektedir ve bu özelliğinden dolayı herbisit olarak da kullanılmaktadır.

PPT herbisit olarak iki değişik ticari şekilde pazara sunulmaktadır. Alman Hoechst firması PPT'nin amonyum tuzu olan glufosinat amonyumu (ammonium-DL-homoanalın-4-yl(methyl)phosphinate) kimyasal olarak sentezlemekte ve BASTA[®] ticari adı altında pazara sürmektedir. Herbisitinin diğer ticari şekli ise Japon Meiji Seika firması tarafından Herbiace[®]

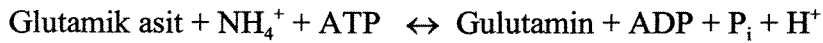
ticari ismi altında piyasaya sürülmektedir ve bu preperatta bialaphos *S.hygroscopicus* suşlarından fermantasyon yoluyla elde edilmektedir.



Şekil 1.3.1 PPT'nin kimyasal yapısı.

1.3.1. PPT Etki Mekanizması

Bir önceki bölümde de kısaca açıklandığı gibi PPT amino asit biyosentezinde önemli rolü olan glutamin sentetaz enzimini inhibe etmektedir. Glutamin sentetaz enzimi (E.C. 6.3.1.1.) glutamik asitdin amonyumla tepkimeye girerek glutaminin oluştuğu ve aşağıda gösterilen metabolik tepkimeyi katalizleyen enzimdir. Bitkilerde GS'in değişik izozimleri bulunmaktadır (Li ve arkadaşları 1993, Tingey ve arkadaşları 1987, Pearson ve Ji 1994, Downs ve arkadaşları 1994, Cabello ve arkadaşları 1994). Bu izozimler sitosolik (GS₁) ve kloroplastik (GS₂) olarak sınıflandırılmışlardır (McNally ve arkadaşları 1983).



Bitkilerde GS enzimi, nitratın indirgenmesi, amino asit degradasyonu ve fotorespirasyon sonucu ortaya çıkan NH_4^+ 'ün asimilasyonunu sağlayan tek enzimdir. GS aktivitesi durduğunda hücrelerde NH_4^+ birikimi gözlenmekte ve bu da hücre dolayısıyla bitkiler üzerinde kısa sürede ölümcül etki yaratmaktadır (Tachibana ve arkadaşları 1986). Örneğin,

tütünde PPT uygulamasından 24 saat sonra herbisit uygulanmamış bitkilere kıyasla NH_4^+ derişiminde 60 misli bir artış gözlenmektedir (De Block ve arkadaşları 1987).

PPT daha önce de açıklandığı gibi GS enziminin yarışımlı inhibitörüdür ve bu özelliği sayesinde kontak etkili total herbisit olarak kullanılabilir. PPT bitkilerde olduğu kadar bakteri ve hayvan hücrelerinde de GS aktivitesini inhibe edebilmektedir. Ancak hayvanlarda kan-beyin engelini (blood-brain barrier) aşamaması ve böbrekler yoluyla kısa sürede temizlenmesi bu organizmalar üstünde toksik etki yaratmamasını sağlamaktadır. Ayrıca PPT toprak bakterileri tarafından metabolize edilebildiğinden çevrede yaratabileceği toksik etkiler minimal seviyede kalmaktadır. Ayrıca henüz PPT'ye doğal olarak direnç sağlayan bir bitki türüne rastlanmamıştır.

1.3.2. PPT Dirençli Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Bir önceki bölümde açıklandığı gibi PPT'nin hayvanlar üzerindeki düşük toksisitesi ve topraktaki ömrünün düşük olması yabancı ot mücadelesinde yaygın olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmektedir. Ancak PPT'nin kontak etkili total herbisit olması, başka bir deyişle seçiciliğinin olmaması yaygın olarak kullanımını engelleyen en büyük faktördür. Bu nedenden dolayı da PPT'ye direnç gösteren kültür bitkilerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır.

Bu yönde yapılan çalışmalarda başlıca iki strateji kullanılmıştır. Bunlardan ilki bölüm 1.2.2'de detaylı olarak açıklanan GS enziminin miktarının artırılması yönündeki çalışmalardır. İkinci ve daha yaygın olarak gözlenen yaklaşım ise PPT'nin hücre içerisindeki detoksifikasyonunun sağlanmasıdır. Bu yaklaşımlar da özet halinde Bölüm 1.2.3'de izah edilmiştir. İleriki bölümlerde PPT dirençli bitkilerin eldesi yönünde yapılan araştırmalar detaylı olarak açıklanmaktadır.

1.3.2.1. PPT'yi Detoksifiye Edebilen Enzimler

Bialaphos *Streptomyces Hygroscopicus* ve *Streptomyces Viridochromogenes* suşları tarafından üretilmektedir. Bu suşlarda PPT'nin biyokimyasal sentez yolları detaylı olarak incelenmiştir (Murakami ve arkadaşları 1986, Hara ve arkadaşları 1991, Alijah ve arkadaşları 1991). Biosentezin 10. kademesindeki enzim, hem biosentezin devamını sağlamakta hem de PPT'yi asetilasyon yoluyla etkisiz hale getirmektedir. Başka bir deyişle, bu suşlar kendilerini ürettikleri antibiyotiğin öldürücü etkisinden korumak amacıyla PPT detoksifiyasyonunu olası kılan phosphinotricin-N-Asetiltransferaz (PAT) enzimini sentezlemektedirler.

PAT enziminin sentezinden sorumlu olan *bar* ve *pat* genleri sırası ile *S. Hygroscopicus* (Thompson ve arkadaşları 1987) ve *S. Viridochromogenes* (Strauch ve arkadaşları 1988) suşlarından izole ve karakterize edilmişlerdir. Her iki gen amino asit dizileri açısından %85 nükleotit dizileri seviyesinde ise %87 homoloji göstermekte, 183 amino asitlik proteinler sentezlemekte ve PPT'yi asetile edebilmektedirler (Wohlleben ve arkadaşları 1988). Her iki proteinin amino asit dizilerinden tayin edilen moleküler ağırlıkları 20.6 kDalton seviyesindedir.

Her iki genin ürünü olan enzimler saflaştırılarak karakterize edilmişlerdir. *bar* genininden sentezlenen PAT enzimi SDS-PAGE analizi ile 22-23 kilo dalton ağırlığında bir enzimdir (Botterman ve arkadaşları 1991). Benzeri olarak *pat* geninin ürünü olan PAT enzimi SDS-PAGE analizinde benzeri bir moleküler ağırlık göstermekte fakat daha fazla ısı dayanıklılığı göstermektedir (Vinnemeier ve arkadaşları 1995). Konuyla ilgili olarak çıkan son yayında ise her iki genin ürünü olan PAT enzimi karşılaştırılmalı olarak çalışılmış, ve doğal formununun 41 kD ağırlığında homodimer yapıda oldukları ayrıca bitkilerde eşit seviyede herbisite direnci sağlayabildikleri gösterilmiştir.(Wehrmann ve arkadaşları 1996). Buna ek olarak her iki proteinin sindirim sistemi enzimleri tarafından parçalanabildiği ve deneklerde herhangi bir alerjik etki yaratmadıkları da rapor edilmiştir (Wehrmann ve arkadaşları 1996).

1.3.2.2. Transformasyon Çalışmaları

Literatür incelendiğinde, PPT'ye dirençli transgenik bitkilerin eldesinde *pat* geni ile mukayese edildiğinde *bar* geni ile yapılan çalışmaların yaygınlığı dikkat çekmektedir. Bu konudaki ilk literatür bilgisine 1987 senesinde rastlanmaktadır (De Block ve arkadaşları 1987). Bunu takip eden yıllarda aşağıda da görülebileceği gibi birçok laboratuvar, *bar* genini kullanarak değişik bitki türlerinde PPT dirençli bitkiler geliştirmeyi başarmışlardır. Bunun yanısıra, *bar* geni özellikle monokot bitkilerde yapılan transformasyon çalışmalarında seçici gen olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır (Wilmink ve Dons 1993).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda PPT'ye dirençli tütün, (De Block ve arkadaşları 1987, Hoeven ve arkadaşları 1994), domates (De Block ve arkadaşları 1987), patates (De Block ve arkadaşları 1987, Filho ve arkadaşları 1994), şeker pancarı (Botterman ve Leemans 1988, Hall ve arkadaşları 1996), *Brassica oleracea* (De Block ve arkadaşları 1989, Mukhopadhyay ve arkadaşları 1991), *Brassica napus* (De Block ve arkadaşları 1989), *Arabidopsis thaliana* (Bechtold ve arkadaşları 1993), buğday (Vasil ve arkadaşları 1992 ve 1993), çeltik (Datta ve arkadaşları 1990, Cao ve arkadaşları 1992, Toki ve arkadaşları 1992, Cornejo ve arkadaşları 1993, Rathore ve arkadaşları 1993, Chamberline ve arkadaşları 1994), mısır (Fromm ve arkadaşları 1990, Gordon-Kamm ve arkadaşları 1990, Spencer ve arkadaşları 1990 ve 1992), arpa (Wan ve Lemaux 1994), yulaf (Sommers ve arkadaşları 1992), bezelye (Grant ve arkadaşları 1995), karanfil (Zuker ve arkadaşları 1995), *Scoparia duclis* L. (Yamazaki ve arkadaşları 1996), *Pleurotus ostreatus* (Yanai ve arkadaşları 1996) ve *Agrotis palustris* Huds (Lee ve arkadaşları 1996) bitkileri elde edilmiştir. Elde edilen transgenik bitkilerin bazıları üstünde tarla denemeleri de yapılmıştır (De Greef ve arkadaşları 1989, Beck ve Ulrich 1993, OECD 1993).

Yapılan bu çalışmalarda bitki türüne bağlı olarak farklı transformasyon yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalarda *bar* geninin bitki genomunda ifadesi farklı promotör ve terminatör bölgeleri ile sağlanmıştır. Genelde kullanılan promotör karnıbahar mozaik virüsü 35S RNA sentezini kontrol eden promotördür (CaMV 35S) (Guilley ve arkadaşları 1982,

Odell ve arkadaşları 1985). Yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde bu promotör kullanılarak elde edilen tüm transgenik bitkilerin PPT direnci gösterdiği gözlenmektedir. Bunun yanısıra *bar* geninin kontrolü, Par (van der Hoven ve arkadaşları 1994), Emu (Last ve arkadaşları 1991) ve UBI (Chiristensen ve arkadaşları 1992) gibi farklı promotör bölgelerinin kontrolü altında da denenmiştir (van der Hoven ve arkadaşları 1994, Cornejo ve arkadaşları 1993, Chamberline ve arkadaşları 1994).

1.4. Projenin Amacı ve Kapsamı

1994 senesinde sunduğumuz proje önerisinde, proje amacı ve kapsamı aşağıda verilen şekilde tanımlanmıştır:

“Projemizin amacı PAT enziminin sentezinden sorumlu BAR genini, CaMV35S promotör bölgesinin kontrolü altında, *Agrobacterium* yolu ile tütün bitkilerine aktarmak ve bahsi geçen herbisitlere dirençli transgenik bitkileri geliştirmektir.”

Yine aynı öneride proje kapsamı ise şu şekilde sunulmuştur:

2. PROJENİN KAPSAMI :

Projemiz dört aşamadan oluşmaktadır. Aşamalar ve kapsamı aşağıda verilmektedir.

1. Aşama : BAR genini taşıyan uygun ikili vektörlerin eldesi.
Çalışmalarımızda kullanmayı planladığımız BAR geninide taşıyan binary vektörler Macar Bilimler Akademisi, Biyolojik Araştırma Merkezi, Bitki Biyolojisi Enstitüsü'nde Prof. Denes Dudits'in laboratuvarlarında hazırlanacaktır. Elde edilecek vektörler "triparental mating" yöntemiyle *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına aktarılacaktır. Bu yöntem daha önce de laboratuvarlarımızda uygulanmıştır.
2. Aşama : BAR geninin tütün bitkilerine aktarılması.
İlk aşamada elde edilecek LBA4404 suşları bitkilerin transformasyonunda kullanılacaktır. Bitkiler "yaprak diski transformasyonu" metoduyla transform edileceklerdir.
3. Aşama : Transjenik bitkilerin seçimi ve rejenerasyonu.
Bu aşamada BAR geninin aktarıldığı yaprak diskleri muhtelif seçici ortamlarda seleksiyona tabi tutulacak ve rejenerasyon edileceklerdir. Rejenerasyonu takiben transgenik bitkiler iklim dolaplarında geliştirilecektir.
4. Aşama : Transjenik bitkilerin analizleri.
Projenin son aşaması olan bu bölümde, geliştirilen transgenik bitkiler aktarılan yeni özellikler bakımından analiz edilecektir. Bu çerçevede laboratuvar koşullarında bitkilerin glufosinate herbisitine dirençleri saptanacaktır. Bunun yanı sıra aktarılan BAR geninin bitki genomundaki varlığında "southern blot" analizleri ile saptanacaktır.

1.5 Önerilen ve Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması

1.5.1. Amaç Bazında

Proje kapsamında yürütülen çalışmalar sonucu, proje önerimizde belirtilen nihai amaç olan herbisitlere dirençli transgenik tütün bitkileri elde edilmiştir.

1.5.2. Kapsam ve Yöntem Bazında

Bir önceki bölümde de açıklandığı gibi projemiz dört aşama olarak önerilmişti. Projenin gerçekleştirilmesi esnasında bu kapsamda belirtilen tüm çalışmalar başarı ile yürütülmüştür.

Bu çalışmalara ek olarak, önerilen proje kapsamında bulunmayan, fakat sonuçların daha sağlıklı olarak irdenebilmesini sağlayacağını düşündüğümüz bazı ek çalışmalar da, elimizdeki mevcut olanaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak transformasyon çalışmalarında *bar* genini taşıyan iki farklı binary vektör kullanılmıştır. Bu vektörlerden biri (pDHB321.1) T-DNA bölgesinde sadece *bar* genini taşırken, diğer vektör (pGKB-5) *bar* geninin yanısıra aynı bölgede kanamisin direnci sağlayan *npt-II* geninide taşımaktadır. Yani pDHB321.1 vektörü ile yapılan transformasyon çalışmalarında bitkilere sadece bir yabancı gen aktarılmış, diğer vektör kullanıldığında ise iki yabancı genin aynı anda transferi sağlanmıştır. Bu da deneyler sonunda elde edilen transgenik bitkilerin gösterdikleri herbisit direnci seviyesininde gözlenen farklılıkların irdelenmesinde ve/veya seleksiyon esnasında kaçakların önlenmesinde fayda sağlamıştır.

Önerilen proje kapsamına ek olarak yapılan diğer çalışmalar, kapsamın dördüncü aşaması olan “Transgenik Bitkilerin Analizi” bölümünde yürütülmüştür. Bu aşamada elde edilen transgenik bitkilerin moleküler seviyede yapılan analizlerinde “Southern Blot” tekniğine ek olarak PCR ve elektroforez çalışmaları da yürütülmüştür.

PCR alışmaları, *bar* geninin, elde edilen transgenik bitkilerin genomlarındaki varlığının analizinde “Southern Blot” çalışmalarını doğrulamaları açısından önem taşımaktadır.

Yapılan elektroforez çalışmaları ise aktarılan genlerin bitkilerde fonksiyonel olarak ifade edilip edilmediklerinin saptanmasının, yani genlerin ürünü olan proteinlerin transgenik bitkilerde sağlıklı ve doğru olarak sentezlenebildiklerinin analizini olası kılmıştır.

Özet olarak proje sonucunda, öneride tanımlanan kapsamdaki tüm çalışmalar gerçekleştirilmiş ve projede önerilen nihai amaç olan herbisit dirençli transgenik tütün bitkileri elde edilmiştir.

Raporun bundan sonraki bölümlerinde proje esnasında kullanılan deneysel yöntemler ve elde edilen sonuçlar verilmektedir.

BÖLÜM 2.

MATERYAL VE METODLAR

Bu bölümde araştırmalar esnasında yapılan deneysel çalışmaların yöntemleri sunulmaktadır. Kolay takip edilebilmesi amacıyla, deneysel yöntemler bir önceki bölümde verilen proje kapsamında belirtilen sıra ile verilmektedir. Yapılan tüm deneysel çalışmalar kendi araştırma laboratuvarlarımızda yürütülmüştür.

2.1. Bitki Materyali

Proje kapsamında yürütölen deneylerde tütün (*Nicotiana tabacum* c.v Samsun) bitkileri kullanılmıştır. Bitkiler toprakta ve/veya tohumlar %20'lik hipoklorit ile steril edildikten sonra Murashige Skoog (MS) (1962) ortamlarında 24±3 °C de, 16 saat ışık koşullarında büyütmüşlerdir. Deneylerde 2 ila 3 aylık bitkilerden elde edilen yapraklar kullanılmıştır.

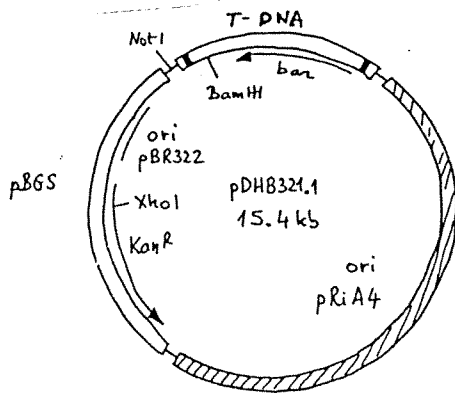
2.2. bar Genini Taşıyan Binary Vektörlerin ve Agrobacterium

Suşlarının Eldesi

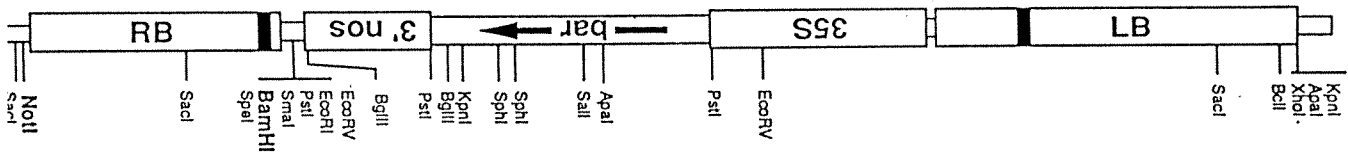
Araştırmalarda pDHB321.1 (şekil 2.2.1) ve pGKB5 (şekil 2.2.2) binary vektörleri kullanılmıştır. Bu vektörler Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA-Centre de Versailles'den Dr. David Bouche'den edinilmiştir ve ilgili kullanım izinleri alınmıştır (Ek 1).

Her iki vektör de T-DNA bölgelerindeki *bar* genini CaMV35S promotör bölgelesinin kontrolü altındadır. pGKB5 vektörü, T-DNA bölgesinde *bar*'ın yanısıra, kanamisin antibiyotiğine direnç sağlayan *npt-II* geni ile bitiki genomunda promotör avlamak amacıyla promotörsüz *uidA* (GUS) geni taşımaktadır.

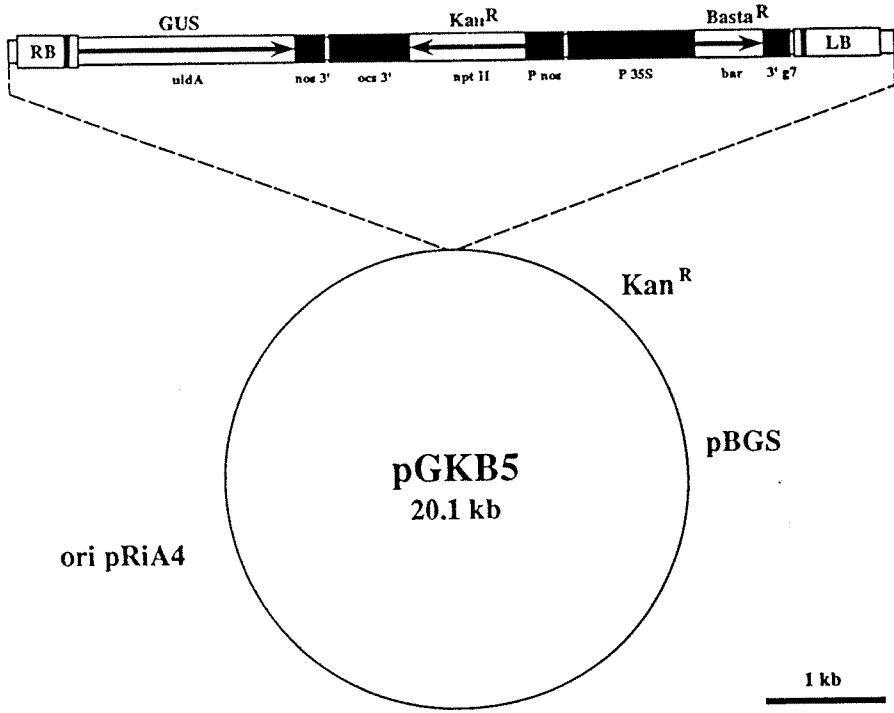
pDHB321.1



(T-DNA)



Şekil 2.2.1. pDHB321.1 binary vektörü.



Şekil 2.2.2. pGKB5 binary vektörü.

Saf durumda elde edilen bu vektörler öncelikle DMSO yöntemi (Inoue ve arkadaşları 1990) ile hazırlanan kompetant *E.Coli* HB101 suşlarına aktarılmıştır. Deneylelerinin başarılı olup olmadığının analizi için transformasyon sonucunda elde edilen pozitif kolonilerden küçük ve büyük ölçekte plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve restriksiyon enzim (RE) hidrolizi sonrası agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Plazmidin *E.Coli* hücrelerine aktarıldığı doğrulandıktan sonra bu koloniler kullanılarak “triparental mating” (van Haute ve arkadaşları 1983) yöntemi vasıtasıyla vektörler *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına aktarılmışlardır.

İleriki bölümde yukarıda açıklanan deneyler ile ilgili yöntemler sunulmaktadır. Yöntemler verilirken bir önceki paragrafta verilen sıra izlenmektedir. Protokollerde kısaltmalar ile belirtilen çözeltilerin içerikleri Ek 2’de detaylı olarak verilmektedir.

2.2.1. Bakteri Hücrelerinin Büyütülmesi

Çalışmalarda kullanılan *E.coli* ve *Agrobacterium* hücreleri Luria Broth (sıvı LB) ortamlarında büyütülmüşlerdir. Gerktiğinde ortamlar %1.5’luk agar ile katılaştırılmışlardır (LB-Agar). Ortamlarda kullanılan antibiyotikler 0.2 mikronluk filtrelerden geçirilerek sterilize edildikten sonra otoklavlanmış ortamlara eklenmişlerdir. *E.coli* hücreleri 37°C *Agrobacterium* hücreleri ise 28-30C°’de büyütülmüşlerdir.

2.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu

- i. Gliserol stoktan alınan hücreler LB-agar petrilere çizilir ve 37 °C de bir gece büyütülür.
- ii. 10-12 tane 2-3 mm büyüklükteki koloni 250 ml SOB ortamına transfer edilir.
- iii. Kültür $A_{600}=0.6$ olana kadar 18 °C de büyütülür.
- iv. 10 dak buzda bekletilir.
- v. 2500g’de 10 dakika, 4 °C de sentrifüj edilir.
- vi. Pelet 80 ml soğuk TB tamponunda çözülür.

- vii. Hücreler aynı şartlarda sentrifüj edilir.
- viii. Pelet nazik bir şekilde 20 ml TB de çözülür ve %7 dimetil sülfoksit (DMSO) derişimine getirilir.
- ix. Tüpler 10 dakika buzda bekletildikten sonra 1-2 ml lik bölümler halinde ependorf tüplere bölünür ve sıvı azotta dondurulur.

Bu şekilde hazırlanan kompetan hücreler daha sonra aşağıdaki şekilde transform edilmişlerdir.

- i. Donmuş kompetan hücreler oda sıcaklığında çözülür.
- ii. 200µl hücre süspansiyonu polipropilen tüplere alınır.
- iii. 1-5 µl plazmid DNA' sı (10-100 pg) tüplere eklenir.
- iv. Tüpler 30 dak buzda bekletilir.
- v. Sallamadan 30 saniye 42 °C de bekletilirler ve tekrar buz banyosuna alınırlar.
- vi. Tüplere 0.8 ml SOC solüsyonu eklenir ve 37 °C da hızlı bir biçimde çalkalanır.(180-200 rpm)
- vii. Hücreler 5 ml lik polipropilen veya cam tüplere alınırlar.
- viii. 3 dakika 47 °C da bekletilmiş yumuşak agar eklenir ve seçici antibiyotik (50 µg/ml) içeren LB-agar petrilere dökülür. 37 °C de inkübe edilir.

2.2.3. Plazmid DNA izolasyonu

Deneylerde küçük ve büyük ölçekli plazmid izolasyonları yapılmıştır.

2.2.3.1. Küçük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Mini prep)

- i. 2-3 ml bakteri seçici LB ortamında büyütülür. (25 µg/ml kanamisin)
- ii. Hücreler 5 dak 3000 rpm'de çevrilerek toplanır.
- iii. 0.2 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA solusyonunda çözülür.
- iv. 0.2 ml taze olarak hazırlanmış 0.2 N NaOH, %1 SDS solusyonu eklenir.
- v. Çözelti beraklaşınca kadar tüpler nazikce karıştırılır
- vi. 0.2 ml 2.5 M pH:4.8 potasyum asetat çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 3 dakika -70 °C bekletilir.

- vii. 0.6 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:25:1) çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 13,000 rpm'de 2 dakika çevrilir.
- viii. Temiz tüplere alınan supernatantlara 0.9 ml izopropanol eklenir ve -70 °C 15 dakika bekletilir.
- ix. 0.2 ml 0.1 M MgCl₂, 100 µg/ml RNase solusyonu eklenir, 37 °C de 15 dakika bekletilir ve 12,000 rpm'de 5 dakika çevrilir.
- x. 0.1 ml 10 M amonyum asetat ve 1.2 ml soğuk etanol eklenir ve buzda 15 dakika bekletilir.
- xi. Tüpler 15 dak 14,000 rpm'de çevrilir
- xii. Oluşan pelet %70 soğuk etanol ile yıkanır ve vakum altında kurutulur.
- xiii. Pelet 20 µl distile suda çözülür.

2.2.3.2. Büyük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Maksiprep)

Seçici LB-agar petrilerinde büyüyen kolonilerden alınan numuneler 200 ml seçici ortamda 37 °C de sallanarak sabaha kadar büyütülür ve plazmid DNA izole edilir. Plazmid izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

- i. Kültür 250 ml'lik sentrifüj tüpünde 4000 rpm 4 °C'de 10 dakika çevrilir.
- ii. Pelet 20 ml STE tamponunda çözülür.
- iii. Elde edilen çözelti Sorval SS34 rotorunda 7100 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.
- iv. Pelet 4 ml Sol1'de (50 mM glukoz, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) çözülür.
- v. Çözeltinin üstüne 4 ml taze olarak hazırlanmış Sol2 (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek iyice karıştırılır. Tüpler 5 dakika buzda tutulur.
- vi. 12 ml soğuk Sol3 (4 hacim 5M potasyum asetat, 1 hacim 10M asetik asit) eklenir ve tüpler başaşağı çevrilerek karıştırılır.
- vii. 15 dakika buzda tutulur ve 10,000 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.
- viii. Süpernatant dört kat sargı bezinden süzülerek temiz sentrifüz tüplerine alınır.
- ix. 0.7 hacim isopropanol yavaşça eklenir ve 15 dakika buzda bekletilir.
- x. Tüpler 10,000 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.

- xi. Süpernatant mümkün olduğunca uzaklaştırılır, pelet %70 etanol ile yıkanır ve vakum altında kurutulur.
- xii. Kuru pelet 1 ml TE tamponunda çözülür. 20 µg/ml RNase eklenir ve 37 °C 'de 30 dakika bekletilir.
- xiii. Stok plasmidler -20 °C'de saklanır.

2.2.4. Restirksiyon Enzim (RE) Hidrolizi

İzole edilen plazmidlerden 20 µl, 25 ünite PstI enzimi, 3 µl enzim tamponu ve 4 µl distile su ile karıştırılarak 37 °C 16 saat bekletilir. Hidroliz işlemi reaksiyon ortamı 60 °C 10 dakika tutularak sonuçlandırılır.

2.2.5. Agaroz Jel Elektrofrez

Hidroliz edilmiş DNA parçacıkları 1/10 hacim 50% gliserol, 75 mM EDTA 0.2% SDS, 2.07% bromfenol mavisi ve %0.07 zaylon sayanol eklenir. Elektrofrez için aksi belirtilmediği takdirde % 0.9 (w/v) Agarose Type I (Sigma) kullanılır, jel kalınlığı 4-5 mm olup 100-120 V sabit voltajda 1-2 saat elektrofrez edilir. Elektrofrezde tampon sistem olarak TAE kullanılır. Tampon içine 10 mg/ml derişimli etidiyum bromid çözeltisinden 5 µl eklenir.

2.2.6. Jellerin Görüntülenmesi

Jeller UV ışık altında agrandizör sistemi kullanılarak karanlık odada direkt olarak negatif filimlerin üstüne görüntülenir. Elde edilen negatifler tab ettirilerek jellerin fotoğrafları alınır. Daha sonra bu fotoğraflar taranarak bilgisayar ortamında görüntülenir.

2.2.7. Triparental Mating Yöntemi

Bu deneylerde *E.coli* transformasyon çalışmalarından elde edilen ve içlerinde pDHB321.1 binary vektörlerini taşıdığı belirlenen HB101 suşları kullanılmıştır. Yardımcı suş olarak pRK2013 plazmidi taşıyan HB101 hücreleri kullanılmıştır. Alıcı *Agrobacterium tumefaciens* hücreleri ise LBA4404 suşlarıdır. Deneysel metod aşağıda verilmektedir.

- i. Binary vektör ve yardımcı plazmidi taşıyan *E.coli* suşları 37 °C, *Agrobacterium tumefaciens* suşları ise 28 °C de sıvı LB ortamlarında büyütülürler.
- ii. Her bakteri suşundan 1 ml steril bir tüpte karıştırılır. (Kontrol olarak 1 ml *Agro* ve 1 ml *E.coli* (pRK2013) ayrı bir tüpte karıştırılır)
- iii. Tüpler 3000 rpm'de sentrifüj edilir.
- iv. Pelet 100 µl steril 10 mM MgSO₄ de çözülür ve LB-agar petrilere yayılır. Bir gece 28 °C de bekletilir.
- v. Büyüyen hücreler öze yardımı ile petrilere alınır ve 1 ml 10 mM MgSO₄ de çözülür.
- vi. Bu çözeltilerden 100-250 µl içinde 50 µg/ml rifampisin ve kanamisin bulunan LB-agar petrilere yayılır ve 3-4 gün 28 °C de bekletilir.
- vii. Aşama "v." tekrarlanır.
- viii. 100-250 µl içerisinde sırası ile 25 ve 50 µg/ml streptomisin ve kanamisin bulunan LB-agar petrilere yayılır. Petriler 28 °C de bekletilir.
- ix. Büyüyen bakteriler streptomisin ve kanamisin içeren sıvı LB ortamlarında büyütülürler ve gliserol stoklar hazırlanır.

2.3. Transformasyon Çalışmaları

Bu bölümde proje esnasında yapılan gen transferi, seleksiyon ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılan yöntemler verilmiştir. Deneyler pDHB321.1 ve pGKB5 binary vektörlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşları ile yürütülmüştür. Bu suşlar raporun bundan sonraki bölümlerinde sırası ile LBA:pDHB ve LB5-1:pGK5 olarak verileceklerdir.

Deneylerde bitki materyali olarak 2-3 aylık tütün bitkileri kullanılmıştır. Gen aktarımı “yaprak diski transformasyonu” yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası transgenik materyalin seleksiyonu uygun seçici ajan (kanamisin ve/veya PPT) içeren ortamlarda yapılmıştır. Aşağıda açıklanan protokoller bu paragraftaki sıralamaya göre verilmektedir.

2.3.1. Kullanılan Ortamlar

Proje esnasında kullanılan tüm ortamlar Murashige Skoog tarafından tanımlanmış MS ortamlarıdır (Murashige ve Skoog 1962). Bu ortamlar hazır halde elde edilmişlerdir (Sigma Katalog No: M9274, M0404, M5519) ve otoklavlanarak steril edilmişlerdir. Ortamlarda kullanılan PPT ve antibiyotikler 0.2 mikronluk filtreleden geçirilerek steril edildikten sonra ortamlara eklenmişlerdir.

Deneylerde aksi belirtilmediği takdirde Tablo 2.1’de kompozisyonu ve kullanım amaçları verilen MS ortamları kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan ortamların kompozisyon ve kullanım amaçları.

ORTAM	İÇERİK	KULLANIM AMACI
<i>MSA</i>	MS tuzları (Murashige ve Skoog 1962), B5 vitaminleri (Gambor ve arkadaşları 1968), %3 sukroz, %0.7 agar, pH:5.7, 1mg/l Benzyl adenin (BA), 0.1 mg/l naftalin asetik asit (NAA).	<i>Agrobacterium</i> ile muamele edilmiş yaprak disklerinin ko-kültürasyonu ve kontrol bitkiler için callus ve gövde oluşumunun sağlanması
<i>MSB</i>	Değişik derişimlerde PPT, kanamisin, 100 µg/ml cefotaxime ve 400 µg/ml carbenisilin eklenmiş MSA ortamı.	Transform olmuş yaprak disklerinin seçimi ve rejenerasyonu
<i>MSC</i>	Hormon içermeyen MSA ortamı	Gövde rejenerasyonunu tamamlamış kontrol ve transgenik materyalin kök oluşumunun indüklenmesi. Transgenik gövdeler için MSC ortamına belirli derişimde PPT'de eklenmektedir

2.3.2. Yaprakların Yüzeysel Sterilizasyonu

Toprakta büyütülen tütün bitkilerinde alınan 1-3 aylık yapraklar %1'lik sodyum hipoklorit solusyonunda 10 dakika bekletilirler. Bekleme esnasında daha etkin bir sterilizasyon sağlanması amacıyla kavanozlar 100 rpm olacak şekilde çalkalanabilir ve/veya hipoklorit çözeltisinin içerisine Tween80 detarjanı eklenebilir. Yine aynı amaçla sterilizasyona geçilmeden önce yapraklar hipoklorit çözeltisine alındıktan sonra kısa süreli (10-20 saniye) vakuma tabi tutulabilir.

Sterilizasyon sonrası yapraklar üç kez steril distile su ile çalkalanır ve en çok iki saat içerisinde ilgili deneyde kullanılır.

2.3.3. Yaprak Diski Transformasyonu

Transformasyon deneylerinde Horsch ve arkadaşları (1985) tarafından geliştirilen metod kullanılmıştır. Metod uygulanırken bazı küçük modifikasyonlar yapılmıştır (Öktem ve arkadaşları 1994). İzlenen deneysel prosedür aşağıda verilmektedir.

- i. *Agrobacterium* hücreleri 10 ml LB ortamında 28-30 °C de büyütülürler.
- ii. 24 saat sonunda büyüyen bakteriler $A_{600} = 0.4-0.6$ olacak şekilde sıvı MS ortamında seyreltilir ve bu bakteriler yaprak disklerinin transformasyonunda kullanılırlar.
- iii. Steril yapraklar neşter yardımı ile 1-2 cm² olacak şekilde parçalara ayrılır. (Bu parçalar raporun bundan sonraki bölümlerinde yaprak diski olarak adlandırılacaklardır)
- iv. Yaprak diskleri “ii” aşamasında elde edilen *Agrobacterium* hücreleri ile 10 dakika muamele edilir.
- v. Yaprak diskleri üzerinde kalan fazla sıvı filtre kağıdı yardımı ile uzaklaştırılır ve diskler MSA ortamına alınırlar.
- vi. 2-3 gün 25 °C de 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullarda bekletilirler.
- vii. Diskler MSB seçici ortamına alınırlar
- viii. MSB ortamı her üç haftada bir yenilenir.

2.3.4. Selksiyon ve Rejenerasyon Çalışmaları

Agrobacterium ile muamele edilip ko-kültüve edilen yaprak diskleri de kallus ve gövde oluşumları için MSB ortamları kullanılmıştır. LBA:pDHB suşları ile yapılan deneylerde seleksiyon 10 µg/ml PPT derişiminde yapılmıştır. LB5-1:pGK5 ile yapılan deneylerde ise MSB ortamlarına 5-10 µg/ml PPT ve 50 µg/ml kanamisin eklenmiştir. *Agrobacterium* hücrelerinin eliminasyonu için ortamlara 400 µg/ml karbenisilin ve 100 µg/ml sefotaksim antibiyotikleri eklenmiştir. Benzeri çalışmalarda bu antibiyotiklerin diğerlerine oranla en etkin *Agrobacterium* eliminasyonu yaptıkları ve bitkilerin rejenerasyonunu en az etkilediği

gösterilmiştir (Shackelford ve Chlan 1996). Tüm deneylerde, aynı şartlara maruz bırakılan, fakat *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş yaprak diskleri kullanılmıştır.

Kallus ve gövde oluşumunu takiben, oluşan gövdeler kallusa bağlandıkları bölgeden kesilerek kök oluşumunun sağlanması için secici MSC ortamlarına aktarılmışlardır. Bu ortamlar 100 ml hacimli kavanozlara hazırlanmıştır. Her kavanoza yaklaşık 25 ml ortam ve 1-5 adet gövde aktarılmıştır. Muhtemel kaçakların engellenmesi amacıyla kök oluşumu esnasında da seleksiyon sürdürülmüştür. Bu amaçla MSC ortamlarına LBA:pDHB için 10 µg/ml PPT, LB5-1:pGK5 için ise 4-6 µg/ml PPT ve 50 µg/ml kanamisin eklenmiştir. Bu deneylerde kontrol olarak, *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş ve MSA ortamında (PPT ve kanamisin içermeyen) kallus ve gövde oluşturan bitkilerden alınan gövdeler kullanılmıştır.

Bitkiler kök oluşumlarını takiben kavanozlardan çıkartılmış ve kök etrfindaki ortam mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bitkiler daha sonra toprağa alınmışlardır. Dehidrasyonun engellenebilmesi amacıyla saksıların üzerleri şeffaf film ile kaplanmıştır. 10 gün süresince film üstünde delikler açılarak bitkiler büyüdükleri ortama adapte edilmişlerdir.

2.4. Transgenik Materyalin Analizi

Çalışmalar esnasında MSC ortamında kök oluşturan ve toprağa alınan öncül transgenik ve kontrol bitkilerin herbisit uygulamasına karşı tepkileri araştırılmıştır. Bu amaçla değişik testler uygulanmıştır ve bu yöntemlerin detayları aşağıda verilmektedir.

2.4.1. Yaprak Diski Analizi

Bu testin amacı rejenere eden ve etmekte olan bitki materyalinin seçici ortamdaki kallus ve gövde oluşturma potansiyellerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla MSC ortamlarında rejenere eden kontrol ve öncül transgenik bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri PPT ve/veya kanamisin

içeren MSB ortamlarına alınmışlar ve gelişimleri takip edilmiştir. Kontrol olarak diskler MSA ortamlarına alınmışlardır.

2.4.2. Yaprak Boyama Analizi

Bu testin amacı MSC ortamlarında kök oluşturan öncül transgenik ve kontrol bitkilerin herbisit uygulamasına gösterdiği tepkilerin analiz edilmesidir. 0.5, 2 ve 6 gram/lite'ye tekabül eden derişimlerde (%0.25, %1 ve %3 V/V) steril olarak hazırlanan ®BASTA çözeltileri, steril bir fırça yardımıyla kavanozlarda kök oluşturmuş bitkilerin yapraklarına tatbik edilmiştir. Uygulama sonrası bitkiler inkübatöre alınarak herbisit muamelesine göterdikleri tepkiler izlenmiştir.

2.4.3. Herbisit Uygulaması

Bu deneylerde toprakta gelişmekte olan öncül transgenik ve kontrol bitkilerinin herbisit uygulamasına göterdikleri tepkiler incelenmiştir. Bitkiler toprağa alındıktan yaklaşık 15 gün sonra üzerlerine laboratuvar koşullarında %0.25 ve %1 (V/V) BASTA® herbisiti püskürtülmüştür. Uygulama üretici tarafından önerilen 30 litre dekara (yaklaşık 30 ml 1m² alana) olacak şekilde yapılmıştır. Deneylerde kontrol olarak daha önce açıklandığı şekilde rejenere ettirilen kontrol bitkiler kullanılmıştır. Ayrıca benzer koşullarda kontrol ve öncül transgenik bitkilere su püskürtülmüştür. Tüm bu uygulamalar sonunda, bütün bitkiler aynı şartlar altında büyümeye bırakılmış ve uygulamalara göterdikleri tepkiler izlenmiştir.

2.4.4. Southern Blot Analizleri

Bu deneylerde *bar* geninin öncül transgenik bitkilerin genomundaki varlığının teyid edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla kontrol ve öncül transgenik bitkilerden hazırlanan genomik DNA örnekleri üzerinde "Southern Blot" analizleri yapılmıştır. Deneylerde kullanılan yöntemler aşağıda verilmektedir.

2.4.4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Bitki dokularından genomik DNA örnekleri Doyle ve Doyle'nin (1990) metoduna göre izole edilmiştir ve deneysel prosedür aşağıda verilmektedir.

- i. CTAB izolasyon tamponu (%2 (W/V) CTAB, 1.4 M NaCl, %0.2 (V/V) β -merkaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH: 8) 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda ısıtılır.
- ii. Bitkiden alınan yaprak dokusu (0.5-1.0 g) sıvı nitrogen içinde tamamen toz haline gelene kadar öğütülür.
- iii. Öğütülen dokunun üzerine önceden ısıtılan CTAB izolasyon tamponundan 5 ml eklenir ve bir süre öğütüldükten sonra pastör pipet yardımıyla 15 ml'lik cam tüplerde toplanır.
- iv. Tüpler 60 °C deki su banyosunda 30 dakika bekletilir. Bu süre içinde tüpler belli aralıklarla yavaşça karıştırılır.
- v. Daha sonra tüplere 1:1 oranında (5 ml) kloroform:isoamilalkol karışımı (24:1) eklenir ve tüpler aşağı yukarı çevirilerek yavaşça karıştırılır.
- vi. Organik ve su fazını ayırmak için tüpler klinik sentrifuj kullanarak 1600xg de 10 dakika sentrifuj edilir.
- vii. Sentrifuj sonunda, DNA'nın bulunduğu su (üst) fazı dikkatlice geniş ağızlı pipet kullanarak temiz bir tüp içine alınır.
- viii. Nükleik asitleri (DNA ve RNA) çöktürmek için tüplere 2/3 hacim oranında soğuk isopropanol eklenir. Bu basamakta beklenen genomik DNA molekülü birkaç dakikada ipliksi biçimde tüp içinde belirecektir. Bu durumda DNA molekülü çengel şeklinde bir cam çubukla toplanabilir. Eğer bahsedildiği gibi ipliksi bir yapı görülmemişse tüpler oda sıcaklığında birkaç saat veya bir gece boyunca bekletilir. Bu süre sonunda DNA 500xg de 1-2 dakika sentrifuj edilerek toplanır.
- ix. DNA molekülü ayrıldıktan sonra 10-20 ml yıkama tamponu (%76 etanol, 10 mM amonium asetat) içinde 20 dakika boyunca yıkanır. Daha sonra 1600xg de 10 dakika santrifuj edilerek toplanır.

- x. Yıkama tamponu dikkatlice dökülür ve pelet vakum altında kurutulur. Kurutma işlemi sonunda pelet 1 ml TE tamponu içinde çözülür.
- xi. RNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için, son derişim 10 µg/ml olacak şekilde RNaze eklenir ve 37 °C de 30 dakika inkübe edilir.
- xii. Daha sonra hacim su veya TE tamponu ile iki katına çıkarılır. Saf DNA molekülü son konsantrasyonu 2.5 M olacak şekilde 7.5 M amonyum asetat ve hacmin 2.5 katı soğuk etanol eklenerek bir gece boyunca - 20 °C de çöktürülür.
- xiii. Son olarak genomik DNA 10,000xg de 10 dakika (4 °C de) santrifuj edilir ve pelet vakum altında kurutulduktan sonra çözülebildiği en ufak hacimde çözülerek -20 °C de saklanır.

2.4.4.2. Restriksiyon Enzim Hidrolizi

Deneylerde PstI restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Tam bir hidroliz işlemi için 6 unit enzim/µg DNA olacak şekilde 6-8 saat 37 °C veya 3 unit enzim/µg DNA 24 saat 37 °C bekletilmesi gerekmektedir. İşlemler için genomik DNA 10-200 µg miktarda kullanılabilir. Deneylerimizde 20 ve 30 µg genomik DNA kullanılmış ve RE'le 24 saat inkübe edilmiştir.

2.4.4.3. Prob Hazırlanması

Southern Blot çalışmalarında kullanılmak amacı ile pDHB321.1 plazmidinde bulunan bar geni izole edilmiş ve DIG-UTP ile işaretlenmiştir. Raporda *bar* genine tekabül eden 560 bp uzunluğundaki DNA parçası "insert", bu parçanın işaretlenmiş şekli ise "prob" olarak ifade edilmektedir. Aşağıda bu konuda izlenen yöntemler verilmektedir.

2.4.4.3.1. Insert Eldesi

pDHB321.1 vektörü PstI ile hidroliz edildikten sonra, agaroz jellerde ayrıştırılmış ve *bar* genine tekabül eden (560 bp) parçacıklar prob hazırlanması amacıyla jellerden izole

edilmişlerdir. Bu işlem esnasında iki farklı yöntem kullanılmıştır ve prosedürleri aşağıda verilmektedir.

2.4.4.3.1.1. Elektro-elusyon Yöntemi

Bu deneylerde Karuppiyah ve Kaufman'ın (1991) metoduna göre kendi imkanlarımızla oluşturduğumuz bir aparat kullanılmıştır. Deneysel prosedür aşağıda verilmektedir.

- i. Örnek DNA 1 % LM-Agaroz jel elektroforez ile ayrılır.
- ii. İzole edilmek istenen DNA'nın olduğu agarose parçası UV altında neşter ile kesilip alınır.
- iii. 200µl TBE tampon solusyonu içeren bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpün içerisine dibi delinmiş 0.5 ml'lik bir eppendorf yerleştirilir. 0.5 ml'lik tüpün delik olan alt kısmı cam elyafı ile kapatılır ve kesilen agarose parçası buraya yerleştirilir. Üzerine 100 µl TBE konur.
- iv. Güç kaynağının pozitif ucuna bağlanmış platin elektrot 1.5 ml'lik eppendorf içerisindeki solusyona ve negatif ucuna bağlanmış bir başka platin elektrot ta 0.5 ml'lik eppendorf'un içerisindeki solusyona daldırılır.
- v. On-onbeş dakika süreyle 50 V'luk bir potasyel uygulanır.
- vi. Agorose parçası içerisinde DNA kalıp kalmadığı UV altında kontrol edilir.
- vii. 200 µl DNA 1.5 ml eppendorf içerisine alınır ve 20µl 3 M)pH 5.3) sodyum asetat, ve 500µl saf etil alkol eklenir.
- viii. Bir saat -20 C° de bekletilir ve 13,000 rpm'de 15 dakika sentrifüj edilir. Pelet vakum altında kururulduktan sonra uygun miktarda TE içerisinde çözülür.

2.4.4.3.1.2. Dializ Yöntemi

Denelerimizde insert izolasyonu için bir diğer partik yöntem olan dializ yöntemide kullanılmıştır. Bu yöntemle ilgil deneysel prosedür aşağıda verilmektedir.

- i. Plazmid PST-I RE ile hidroliz edildikten sonra %1.5'luk agaroz jellerde , 0.5X TAE tamponu kullanılarak ayrıştırılır.

- ii. Yürütme işlemi sonunda, jel mümkün olduğunca kısa bir süre UV-ışık altında incelenir ve beklenen büyüklükte ortaya çıkan bant yine UV-ışık altında jelden kesilerek çıkarılır.
- iii. Kesilen parça içinde 500 µl TE tamponu (pH:8) olan küçük bir dializ torbasına konur ve her iki ucu sıkıca kapatılır.
- iv. Bir sonraki basamak küçük bir elektroforez işlemidir. Burada dializ torbası içinde 0.5X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilir ve yine jeldeki DNA molekülü torba içindeki tampona geçene kadar 50 Volt'lık potansiyel uygulanır (10-15 dakika). İşlemin tamamlandığını kontrol etmek amacıyla dializ torbası UV-ışığına çok kısa süreli olmak şartıyla kontrol edilir.
- v. Yürütme işlemi tamamlandığında, torba tanktan çıkarılır ve içindeki tampon temiz bir ependorf tüp içine alınır. Sonra DNA molekülü 0.1 hacim sodium asetat ve 2 hacim %96 etanol eklenerek - 20 °C de bir gece bekletilir.
- vi. Bir sonraki basamakta çökelti maksimum hızda santrifuj edilerek toplanır, üst faz atılır ve pelet %70 etanol ile bir kez yıkanarak vakum altında kurutulur.
- vii. Elde edilen miktara göre çöken DNA daha önce steril edilmiş suda (10-30 µl) çözülerek - 20 °C de saklanır.

2.4.4.3.2. İnsert İşaretlenmesi

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

- i. 10ng-3 µg DNA 100 °C de 10 dakika tutularak denature edilir.
- ii. Reaksiyon tüpüne 0.5-150 µg/ml DNA, 2 µl 10X hexonukleotid karışımı, 2 µl 10X dNTP işaretleme karışımı, 100 unit/ml olacak şekilde klenow enzimi ve karışımı 20 µl ye getirecek dH₂O eklenir.
- iii. Eppendorf tüp 37 °C de 60 dakika bekletilir.
- iv. 2 µl 200 mM pH 8.0 EDTA eklenerek reaksiyon durdurulur.

- v. DNA 0.1 hacim 4M LiCl ve 2.5-3.0 hacim soğuk etanol ile çökeltilir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra -70°C de 30 dakika bekletilir.
- vi. 13,000 rpm'de 15 dakika sentrifüj edilir (4 °C)
- vii. Supernatant uzaklaştırılır ve DNA iki sefer %70'lik etanol ile yıkanır.
- viii. Pelet kurutulduktan sonra 50 µl TE tamponunda çözülür. İşaretli problemler -20 °C de saklanır ve hibridizasyonda kullanılır.

2.4.4.4. Genomik DNA'ların Naylon Membranlara Aktarılması

Çalışmalarda Amersham HighBond[®] naylon membranlar kullanılmıştır. Deneysel prosedür aşağıda verilmektedir.

- i. Jel, elektroforez işleminden sonra, 30 dakika 0.2N NaOH, 0.6M NaCl içerisinde denature edilir.
- ii. 30 dakika 0.5 M Tris pH7.5, 1.5 M NaCl içerisinde nötralize edilir.
- iii. Jeller 25 mM NaPO₄ (pH 6.5) tamponu ile ıslatılmış sünger veya elektroforez aparatının üzerinde 2 tabaka Whatman 3MM kağıdı üstüne yüz kısmı üstte olacak şekilde yerleştirilir. Elektroforez aparatı kullanıldığında jel ile transfer tamponu arasına filtre kağıdından köprü oluşturulur. Hava kabarcıkları uzaklaştırılır. Jelin üzerine dH₂O ile ıslatılmış ve transfer tamponuna sokulmuş naylon membran yerleştirilir., üzerine 2 parça ıslatılmış Whatman 3MM kağıdı yerleştirilir.
- iv. Jelin üstüne yaklaşık 10 cm kalınlığında kağıt havlu veya kaba filtre kağıdı yerleştirilir ve üzerine ağırlık konur. 6-18 saat kadar transfer işlemi için bırakılır.
- v. Membran alınır ve 2x SSC içinde 15 dakika süre ile çalkalayarak yıkanır.
- vi. 15-30 dakika havada kurutulur.
- vii. Membrana aktarılan DNA'lar, 280nm UV ışık altında 3 dakika tutularak fikse edilir .
- viii. 30-60 dakika daha 65 °C'de 0.1 X SSC, 0.1 % SDS içerisinde sallanarak yıkanır.
- ix. Havada kurutulur 4 °C'de muhafaza edilir

2.4.4.5. Hibridizasyon Deneyleri

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış olan blotlar 10ml/100 cm² olacak şekilde blot solusyonunda 65 °C'de iki ila altı saat arası pre-hibridize edilir. Fazla solusyon uzaklaştırılır en az 2.5 ml/100 cm² olacak şekilde hibridizasyon solusyonu ve daha önce saptanmış olan derişime gelecek şekilde prob eklenir. 60 °C'de sabaha kadar hibridize edilir. Sonuçta, blot oda sıcaklığında sallanarak, aşağıda içerikleri verilen solusyonlarda belirtilen defalar yıkanır.

3x5' 2xSSC , 0.5 % SDS

1x5' 1xSSC , 0.1 % SDS,

2x30' 0.1xSSC, 0.1 %SDS

Blot bu muamelelerden sonra görüntüleme işlemlerine tabi tutulur.

2.4.4.6. Blotun Görüntülenmesi

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

2.4.5. PCR Çalışmaları

PCR deneylerinde, daha önceki bölümde açıklanan "Southern Blot" çalışmalarına ek olarak aktarılan *bar* geninin bitki genomundaki varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla izole edilen ve Pst-I RE ile hidroliz edilen genomik DNA'lar üzerinde *bar* genine yönelik olarak hazırlanmış proplar kullanılarak amplifikasyon çalışmaları yürütülmüştür. Kullanılan primerler, Macar Bilimler Akademisi, Biyolojik Araştırma Merkezinden elde edilmişlerdir. Çalışmalarda bazı modifikasyonlar yapılarak Hamill ve arkadaşlarının (1991) metodu uygulanmıştır. Deneylerimizde uygulanan prosedür aşağıda verilmektedir.

PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde yapılmıştır. Reaksiyon ortamının içeriği ise: 5µl 10X A tamponu, 200 µM dNTP karışımı, 1'er µl bar primerleri (100 ng), 2 unite Taq polimeraz, 200 ng genomik DNA örnekleri ve %4 DMSO'dan oluşmaktadır. Reaksiyon 1 dakika denaturasyon (92 °C), 1 dakika annealing (56 °C) ve 1.5 dakika uzatma (72 °C) olmak üzere 30 döngü tekrarlanmıştır. Daha sonra elde edilen örnekler agaroz jellerde ayrıştırılarak görüntülenmiştir.

2.4.6. Elektforez Çalışmaları

Bu deneylerdeki amaç *bar* geninin ürünü olan PAT enziminin öncül transgenik bitkilerdeki varlığının araştırılmasıdır. Bu amaçla öncül transgenik bitkilerden izole edilen total proteinler sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılıp, comassie brilliant mavisi ile boyama sonrası protein profilleri analiz edilmiştir. Deneysel yöntemler aşağıda verilmektedir.

2.4.6.1. Total Protein İzolasyonu

Deneylerde toprakta gelişmekte olan bitkilerden alınan yapraklar kullanılmıştır. Protein izolasyonu Damerval'ın (1986) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

- i. Sıvı nitrojen içerisindeki yapraklar bir havan yardımı ile toz haline gelinceye kadar iyice öğütülür.
- ii. Öğütülen yaprakların üzerine 5 ml %10'luk TCA solüsyonu eklenir. (TCA: Trikloroasetik asit, aseton, %0.07 β-Merkaptoetanol.)
- iii. Protein presipitasyonu için santrifüj tüpleri içerisine alınan örneklerin -20 °C'de 1 saat süresince inkübasyonu sağlanır.
- iv. Ekstre, 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
- v. Supernatant dökülür, pellet üzerine 0.5 ml aseton-β-Merkaptoetanol çözeltisi eklenir ve karıştırılır..

vi. Aynı solüsyonun kalan 4.5 ml'si de eklenir ve santrafütj tüpleri -20 °C'de 1 saat süresince inkübasyona bırakılır.

vii. Bu süre sonunda aynı şekilde santrafütj tekrar edilir.

viii. Pelletler vakum altında kurutulur ve ileriki kullanımlar için -20 °C'de muhafaza edilir.

2.4.6.2. SDS-PAGE

Elektroforez işlemleri Laemmli (1975) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Jellerin hazırlanması ile ilgili detaylar ve çözeltiler Ek-III'de verilmektedir.

2.4.6.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden izole edilen total protein örnekleri jellere tatbik edilmeden önce aşağıda verilen şekilde hazırlanmışlardır. Örnekler her elektroforez işleminden önce aynı gün içerisinde taze olarak hazırlanmışlardır. Hazırlanan örneklerin 1 gün dahi bekletilmesi jeldeki çözünmeyi büyük ölçüde etkilemektedir.

- i. 2 mg örnek tartılır ve 80 µl örnek tamponu eklenir.
- ii. Eppendorf tüpleri içerisindeki protein örnekleri denature olmaları için kaynayan suda 1 dakika süresince bekletilir.
- iii. Tüpler 14.000 rpm'de 30 saniye süresince santrafütj edilir.
- iv. Elde edilen süpernatanttan 30 µl jel üzerindeki kuyularına tatbik edilir.
- v. 100 volt'ta elektroforez işlemleri gerçekleştirilir.

2.4.6.2.2. Jellerin Boyanması

Elektroforez işlemleri sonrası jeller commasie brilliant mavisi ile boyanmıştır. Boyama ve fazla boyanın uzaklaştırılması esnasında kullanılan çözeltiler Ek-III'de verilmektedir. Jeller 30 dakika boyama solüsyonunda bırakılmış ve 12 saatlik bir süreçte de fazla boya jellerden uzaklaştırılmıştır.

BÖLÜM 3. SONUÇLAR

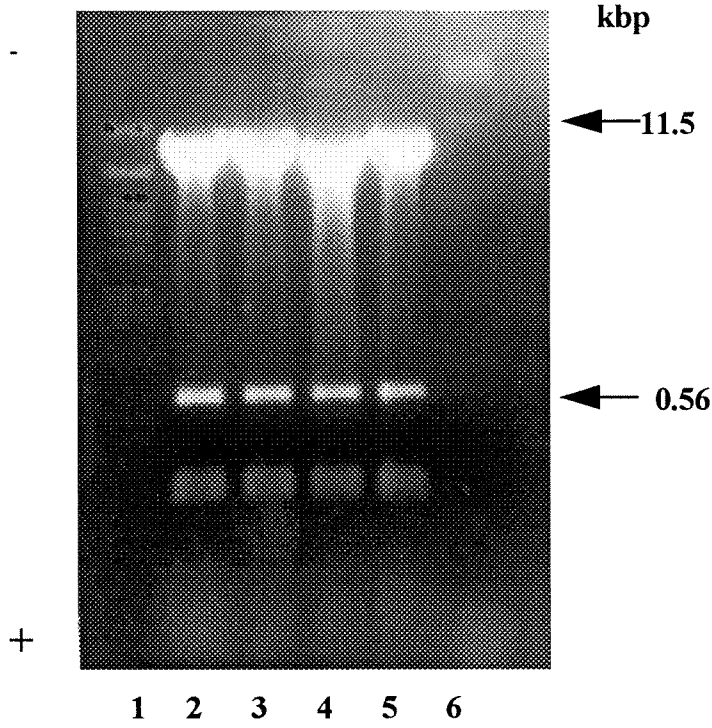
3.1. Binary Vektörleri Taşıyan *Agrobacterium* Suşlarının Eldesi

Bölüm 2.2’de de açıklandığı gibi Dr. Bouchez’den elde edilen plasmidler öncelikle *E.coli* hücrelerine aktarılmaya çalışılmıştır. DMSO yöntemi ile yapılan transformasyon deneyleri sonucunda bir seri pozitif koloni elde edilmiştir. İzole edilen bu kolonilerin dört tanesi bağımsız olarak incelenmiştir. Koloniler seçici LB ortamlarında (25 µg/ml kanamisin-Sigma) büyütülmüşler, plasmidler izole edildikten sonra PstI RE’i ile hidroliz edilmişlerdir. Hidroliz edilen plasmidler daha sonra agaroz jellerde ayrıştırılarak görüntülenmişlerdir (Şekil 3.1.1). Şekilden de görülebileceği gibi elde edilen plasmid PstI hidrolizi sonucunda beklenen parçacıkları vermektedir.

Bahsi geçen *E.coli* suşlarının kanamisin direnci (kan^r) sağlayan pDHB321.1 plasmidini taşıdığı belirlendikten sonra, bu suşlar “triparental mating” deneylerinde kullanılmışlardır. Bu deneylerde streptomisin dirençli (strep^r) *A.tumefaciens* LBA4404 suşları kullanılmış ve deney sonuçlarında strep-kan^r koloniler başka bir deyişle pDHB321.1 plasmidini taşıyan LBA4404 suşları elde edilmiştir. Elde edilen bu *A.tumefaciens* suşlarından da plasmid izolasyonu ve RE hidrolizi yapılmıştır ve oluşan DNA parçacıkları agaroz jellerde ayrıştırılıp görüntülenmiştir. Deney sonuçları Şekil 3.1.2’de verilmektedir. Yapılan analizler sonucu denenen *Agrobacterium* suşlarının aktarılan binary vektörü taşıdığı gözlenmektedir. Bu nokta daha sonra yapılan transformasyon deneyleri ile de doğrulanmıştır. Bu suş raporda LBA:pDHB olarak belirtilmektedir.

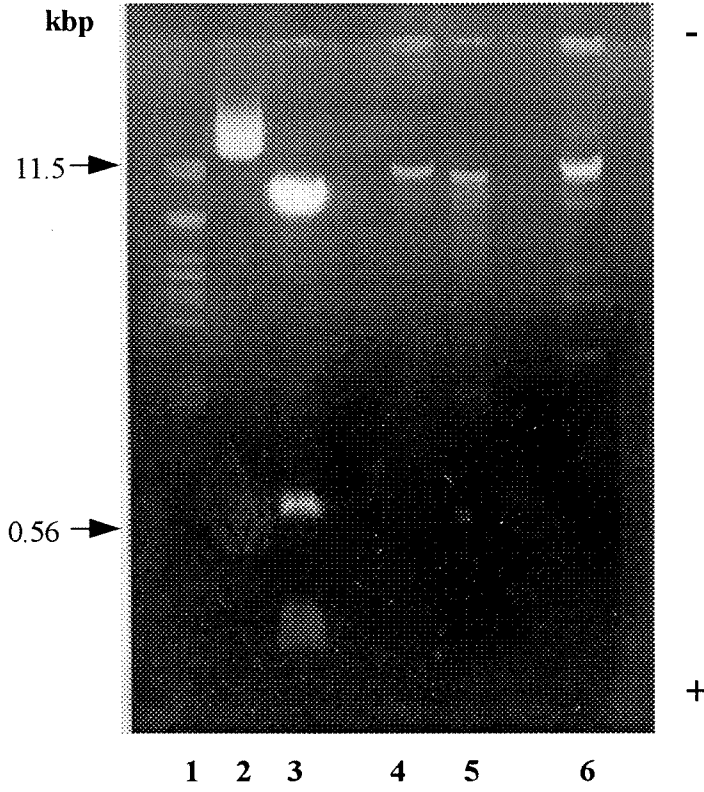
pGKB5 plasmidi ile yapılan *E.coli* transformasyon deneyleri başarısızlık ile sonuçlanmıştır. Deneylerin tekrarlanması için yeterli süre olmadığından Dr. Bouchez ile kurulan temas sonucu pGKB5 plasmidi *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarının içinde elde edilmiş ve deneylerde kullanılmıştır. Bu suş raporda LB5-1:pGK5 olarak geçmektedir.

Sonuç olarak deneylerimiz *bar* geni içeren iki farklı binary vektör taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşları ile paralel olarak yürütülmüştür ve elde edilen sonuçlar ileriki bölümlerde sunulmaktadır.



Şekil 3.1.1. pDHB321.1 plasmidinin *Pst*I RE'le hidroliz sonucu oluşan DNA parçacıklarının agaroz jel profilleri.

Kolon Sıralaması: 1. *Pst*I hidrolizli λ DNA markörü., 2-5. pDHB321.1 plasmidi ile transform edilmiş *E.coli* suşlarından elde edilen plasmidlerin *Pst*I hidrolizi sonuçları, 6. hidroliz edilmemiş plasmid.



Şekil 3.1.2. Triparental mating ve maksiprep deneyleri sonucu elde edilen plasmidlerin RE hidrolizi sonrası agaroz jel elektroforez sonuçları.

Kolon sıralaması: 1. PstI hidrolizli λ DNA markörü, 2. Maksiprepten elde edilen pDHB321.1, 3. PstI ile hidroliz edilmiş pDHB321.1, 4. LBA:pDHB321.1 suşundan izole edilen plasmid, 5. Bu plasmidin PstI hidrolizi, 6. LBA4404:pGIF1 suşundan elde edilen plasmidler.

3.2. Kontrol Bitkilerle Rejenerasyon Çalışmaları

Çalışmalarımızda uygulanan deneysel koşullar altında kontrol bitkilerden hazırlanıp kültüre alınan bir yaprak diskinden yaklaşık 6 ila 8 ay sonra tüm bir bitki elde edilebilmektedir. Gözlenen bu oluşumun tümü raporda “rejenerasyon” olarak tanımlanmaktadır.

3.2.1. Kontrol Bitkilerin Normal Koşullardaki Rejenerasyonu

Transformasyon deneyleri öncesi ve esnasında, tütün bitkilerinin rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda, toprakta büyütülen bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinden bitki eldesi için gerekli kültür şartları optimize edilmiştir.

3.2.1.1. Kallus ve Gövde Oluşumu

Çalışmalarda 1-3 aylık tütün bitkilerinden alınan yapraklar kullanılmıştır. Yapraklardan yüzeysel serilizasyon sonrası hazırlanan diskler, MSA ortamlarına alınmış ve kallus ve gövde oluşumları takip edilmiştir.

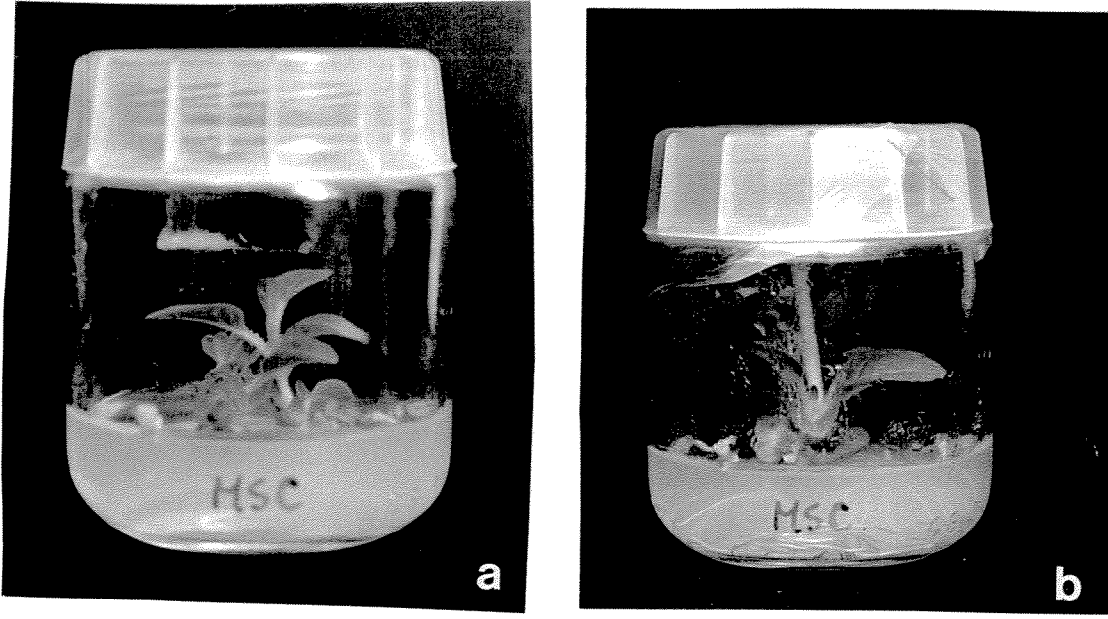
Yapılan çeşitli denemeler sonrası yaprak yaşının kullanılan deneysel koşullar altında kallus ve gövde oluşumunda önemli bir rolü olmadığı gözlenmiştir. Genelde, kültüre alınan tüm diskler bir aylık bir süre sonucunda gövde gelişimi göstermektedirler. Tek bir yaprak diskinden birçok gövdecik elde edilebilmektedir. Örnek bir sonuç Şekil 3.2.1 de verilmektedir.



Şekil 3.2.1. Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin MSA ortamındaki 2 aylık gelişimi.

3.2.1.2. Kök Oluşumu

Çalışmalarımızda, kök oluşumu için genelde MSA ortamında 30 ila 45 gün sonucu oluşan gövdeler kullanılmıştır. Oluşan bu gövdeler kallusa bağlandıkları noktadan neşter yardımı ile ayrılarak kök oluşumları için MSC ortamlarına alınmışlardır. Deneylerimizde MSC'ye alınan gövdelerde %90 oranında kök oluşumu gözlenmiştir. Kök oluşumu genellikle MSC'ye alındıktan 7 ila 10 gün sonrası başlamaktadır ve 15 gün sonunda kökler iyice belirginleşmekte ve bitkiler toprağa transfer edilebilecek duruma gelmektedirler. Örnek bir sonuç Şekil 3.2.2'de verilmektedir



Şekil 3.2.2. Kontrol bitkilerde MSC ortamındaki kök oluşumu.

Fotoğraflar gövdenin MSC ortamına alındıkta sonra 7 (A) ve 14 (B) günlük gelişimlerini göstermektedir.

3.2.1.3. Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri

MSC ortamlarında 15 ila 30 gün kültürde tutulan bitkiler daha sonra toprağa alınmışlardır. Toprağa transfer edilmeden önce köklerin etrafında kalan agar mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır. Bitkiler toprağa alındıktan sonra kademeli olarak büyümeye alındıkları ortama adapte edilmişlerdir. Bu amaçla saksıların üstü şeffaf strech filmlerle kaplanmış ve bir hafta süre ile film üstünde delikler açılmıştır. Genelde transfer sonrası bir hafta canlılığını sürdürebilen bitkiler daha sonra gelişimlerini devam ettirebilmektedirler. Şekil 3.2.2’de gösterilen kontrol bitkinin toprağa alındıktan sonraki gelişim süreci Şekil 3.2.3’de verilmektedir.

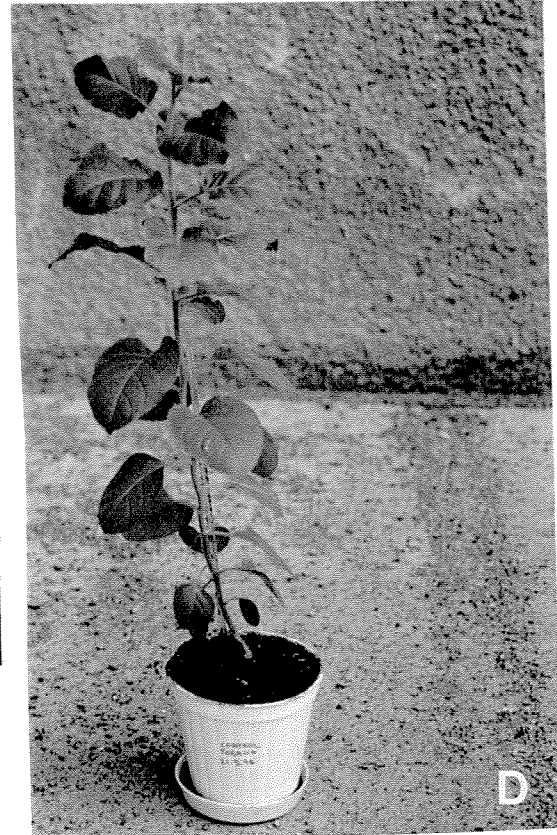
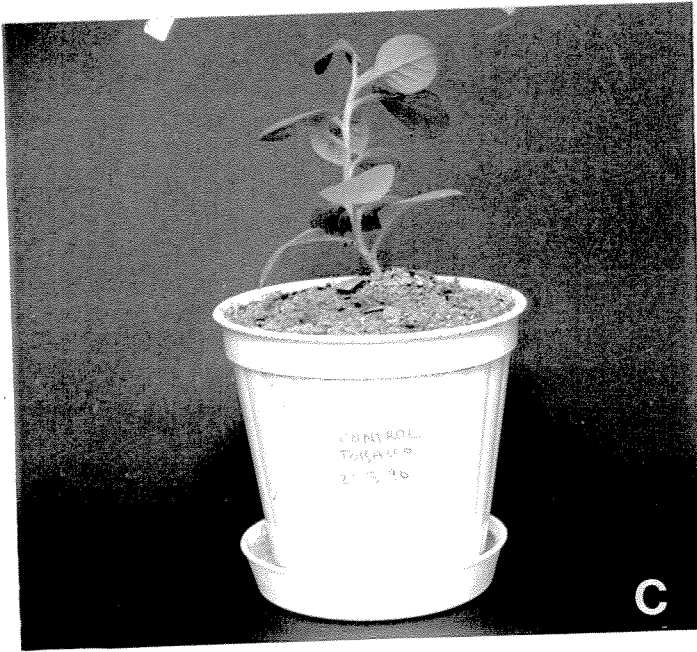
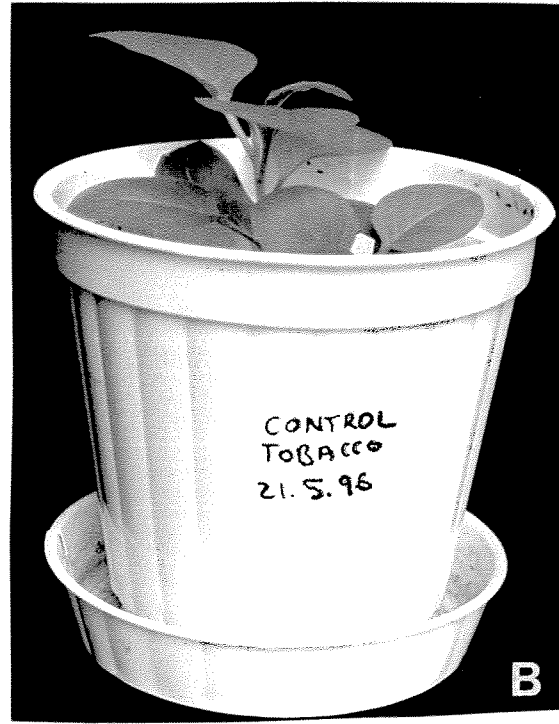
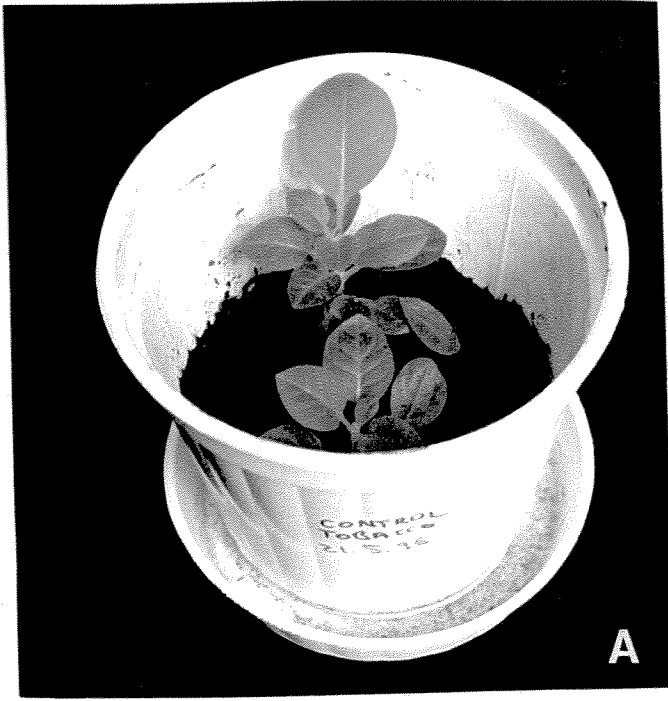
3.2.2. Kontrol Bitkilerin Seçici Ortamlarda Gösterdikleri Gelişme

Kontrol bitkilerin herbisit aktif maddesine gösterdikleri tepkilerin incelenmesi amacı ile önceki bölümlerde açıklanan benzeri deneyler PPT içeren ortamlar kullanılarak da yürütülmüştür. Bu deneyler yapılan transformasyon çalışmalarında kullanılacak seçici ortamlardaki (MSB) PPT derişiminin tayini açısından da önem taşımaktadır.

3.2.2.1. Kallus ve Gövde Oluşumu

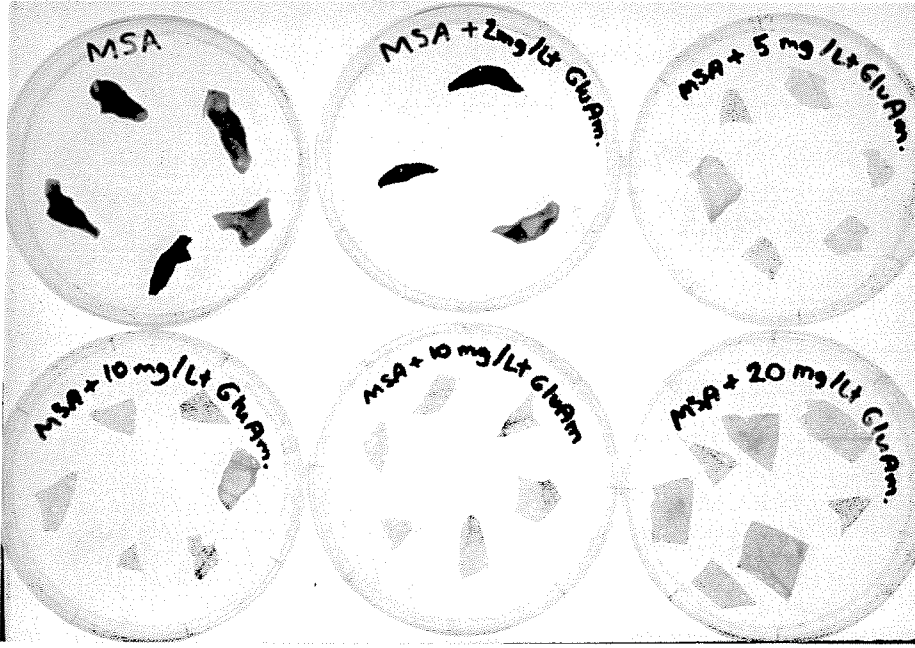
Deneylerde, kontrol bitkilerden hazırlanan diskler değişik derişimlerde herbisit aktif maddesi (Glufosinat amonyum veya PPT) içeren MSB ortamlarına alınmış ve rejenerasyonları takip edilmiştir (Şekil 3.2.4 ve Şekil 3.2.5). Kullanılan en düşük PPT dozunun (1 mg/litre) dahi 20 gün sonucunda kontrol bitkiler üzerinde lethal etki yarattığı gözlenmiştir.

Bazı denemelerde özellikle genç bitkilerden (1 aylık) hazırlanan yaprak disklerinin PPT varlığında kallus ve gövde oluşumu başlatabildikleri gözlenmiştir (Şekil 3.3.1, “-CONTROL” petrileri). Ancak oluşan bu kallus ve gövdeler 20 gün sonunda gelişimlerini durdurmakta ve 40 gün sonunda tamamen ölmektedirler.

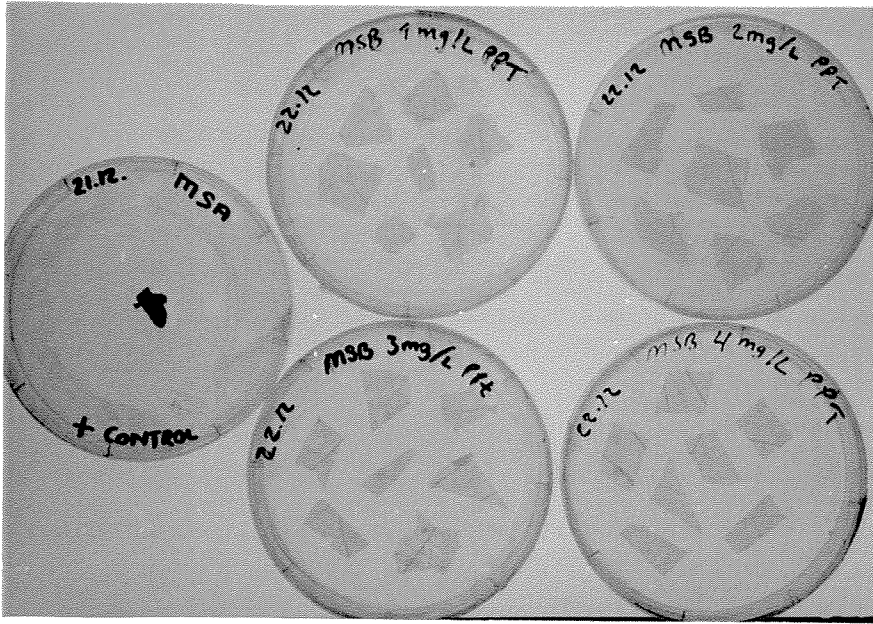


Şekil 3.2.3. MSC ortamında köklendirilen kontrol bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.

Şekil 3.2.2 (B)'de gösterilen bitki toprağa alınmış ve gelişimi gözlenmiştir. Fotoğraflar bitkinin toprağa alındıktan sonraki 15 (A), 40 (B), 75 (C) ve 125(D) günlük gelişimlerini göstermektedir.



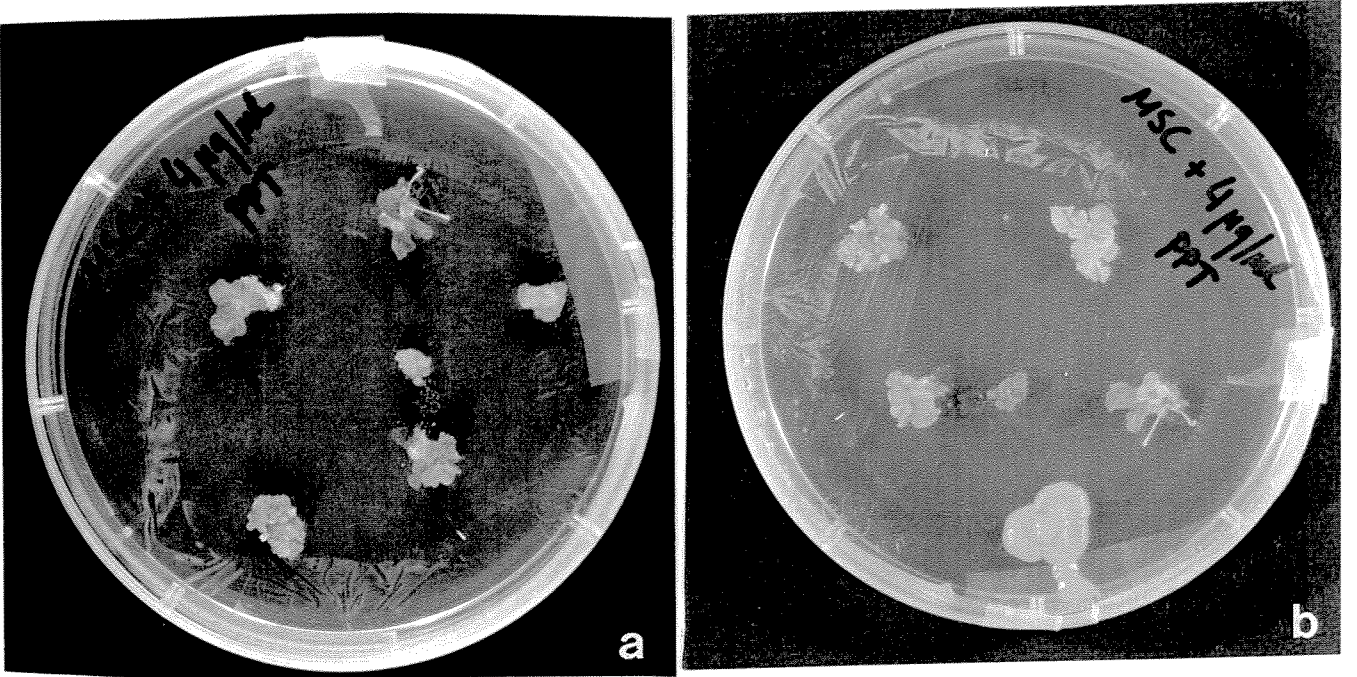
Şekil 3.2.4 Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin değişik derişimlerde Glufosinat amonyum içeren MSB ortamlarındaki 10 günlük gelişimleri.



Şekil 3.2.5. Kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin değişik derişimlerde PPT içeren MSB ortamlarındaki 20 günlük gelişimleri.

3.2.2.2. Kök Oluşumu

PPT nin kök oluşumu üzerinde göstereceği etkinin incelenmesi amacıyla kontrol bitkiler MSA ortamında gövde oluşturduktan sonra, oluşan bu gövdeler PPT içeren MSC ortamlarında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.2.6.). Yapılan denemeler sonucu 4 mg/litre PPT derişiminde MSC ortamlarına aktarılan gövdelerin kök oluşturamadıkları gözlenmiştir. Bu PPT derişimi kök oluşumunu engellemenin yanısıra gövde gelişiminide engellemektedir.



Şekil 3.2.6. Kontrol bitkilerden elde edilen gövdelerin PPT içeren MSC ortamındaki gelişimleri.

Fotoğraflar gövdelerin 6 (A) ve 25 (B) günlük gelişimlerini göstermektedir.

3.3. Transformasyon Çalışmaları

Daha önceki bölümlerde de açıklandığı gibi proje kapsamında yapılan çalışmalarda iki farklı binary vektör kullanılmıştır. Bu vektörlerden pDHB321.1, T-DNA bölgesinde sadece *bar* genini taşımaktadır. Buna karşın pGKB5 vektörünün T-DNA bölgesinde *bar* geninin yanısıra kanamisin direnci sağlayan *npt-II* genide bulunmaktadır. Bu nedenle, pDHB plazmidi ile yapılan transformasyon çalışmalarında seçici ortamlara aksi belirtilmediği takdirde sadece 10 mg/litre derişimde PPT; pGKB5 ile yapılan deneylerde ise 6 mg/litre PPT ve 50 mg/litre kanamisin antibiyotiği eklenmiştir.

Raporun bundan sonraki kısımlarında ve şekillerde “+ CONTROL” olarak belirtilen diskler hiçbir muameleye tabi tutulmadan MSA ortamına alınan kontrol diskleri ifade etmektedir. “- CONTROL” olarak ifade edilen diskler ise, transformasyon deneylerinde kullanılan disklerle *Agrobacterium* uygulaması dışında aynı şartlara maruz bırakılan ve MSB seçici ortamlarına alınan disklerdir. *Agrobacterium*’la muamele edilen diskler ise “LBA:pDHB” ve/veya “LB5-1:pGK5” olarak ifade edilmektedir. Deneylerde her set için yaklaşık 20 adet yaprak diski kullanılmıştır ve diskler her üç haftada bir yeni ortamlara aktarılmıştır.

Her iki vektör ile yapılan deneylerin sonuçları aşağıda ayrı bölümler halinde verilmektedir.

3.3.1. pDHB321.1 Binary Vektörü ile Yapılan Deneyler

Daha önceki bölümlerde de açıklandığı gibi bu vektör *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına “triparental mating” yöntemi ile mobilize edilmiştir. Vektörü taşıdığı belirlenen bu *Agrobacterium* suşu raporda ve şekillerde LBA:pDHB olarak ifade edilmektedir.

Materyal ve Metod kısmında da detaylı olarak açıklandığı gibi deneylerde kullanılan suşlar 25 mg/litre streptomisin ve 50 mg/litre kanamisin içeren sıvı LB ortamlarında 28-30 °C de

büyütülmüşler ve sıvı MS ortamı ile $A_{600}=0.4-0.6$ olacak şekilde seyreltikten sonra yaprak disklerin transformasyonunda kullanılmışlardır.

3.3.1.1. Transformasyon Sonrası Kallus ve Gövde Oluşumu

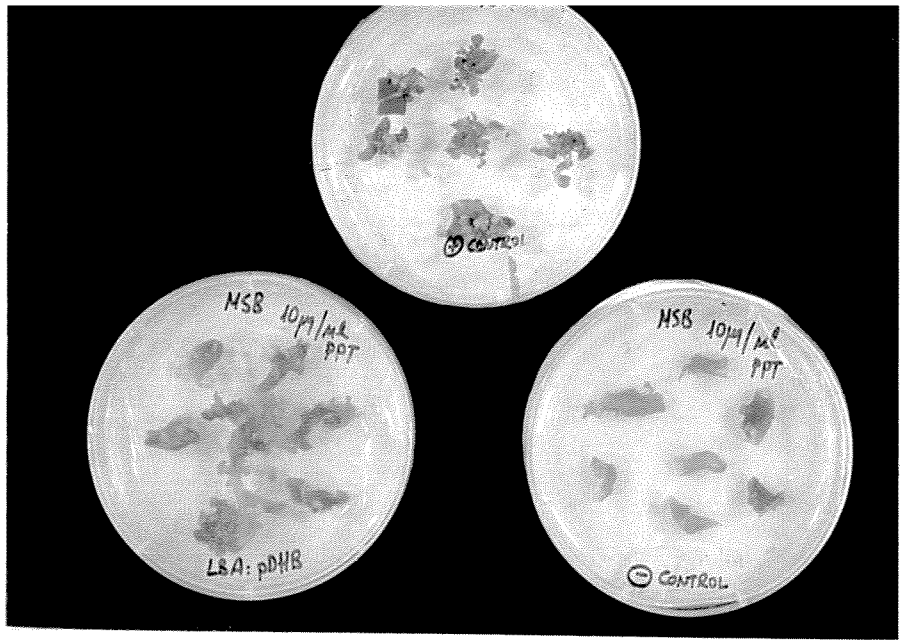
LBA:pDHB suşları ile yapılan transformasyon deneylerinde % 90 seviyelerinde transformasyon frekansı sağlanmıştır. Yapılan denemelerde kullanılan tüm disklerin 10 mg/litre PPT varlığında kallus ve gövde oluşturabildikleri gözlenmiştir.. Kallus oluşumu seçici ortama alındıktan 7 ile 10 gün sonra başlamakta 20-25 gün sonunda ise gözle seçilebilen gövde oluşumları gözlenebilmektedir. Kullanılan tüm disklerde birden fazla gövde oluşumu gözlenmiştir MSB ortamlarında yaklaşık 40 gün sonunda oluşan gövdelerin %50 si kök oluşumları için MSC ortamlarına alınabilecek duruma gelmektedirler. Deneylerde elde edilen örnek bir sonuç Şekil 3.3.1 de verilmektedir.

3.3.1.2. Öncül Transgenik Gövdelerde Kök Oluşumu

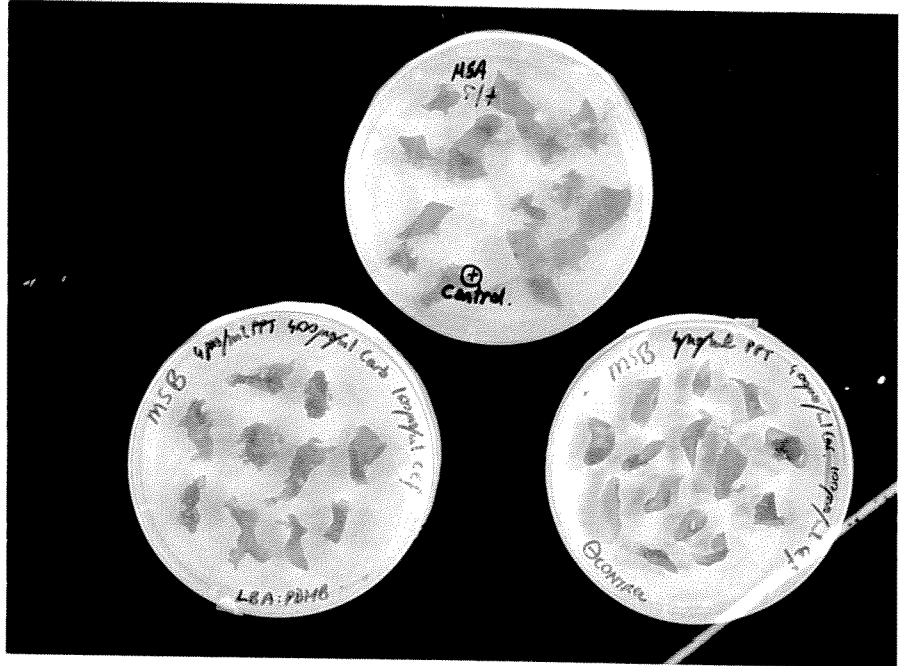
Deneyler süresince muhtemel kaçakların önlenmesi amacıyla bir önceki aşamada elde edilen gövdeler yüksek derişimde (10 mg/litre) PPT varlığında köklendirilmişlerdir. Genelde 20 ila 30 günlük gövdelerde % 20-30 oranında kök oluşum frekansı gözlenmiştir (Şekil 3.3.2). MSB ortamlarında 50 günün üstünde gelişim göstermiş gövdelerde kök oluşturma frekansı %60-70 mertebelerine çıkmaktadır (Şekil 3.3.3). Gövdeler PPT içeren MSC ortamlarına alındıktan sonra ilk kök oluşumları 10 gün sonunda gözlenmiştir. Kök oluşturan gövdelerin % 50'den fazlası 30 gün sonunda toprağa alınabilecek duruma gelmektedirler. 60 gün sonunda ise kök oluşturan tüm gövdeler toprağa aktarılmışlardır.

MSB ORTAMINA ALINDIKTAN SONRA
GEÇEN SÜRE

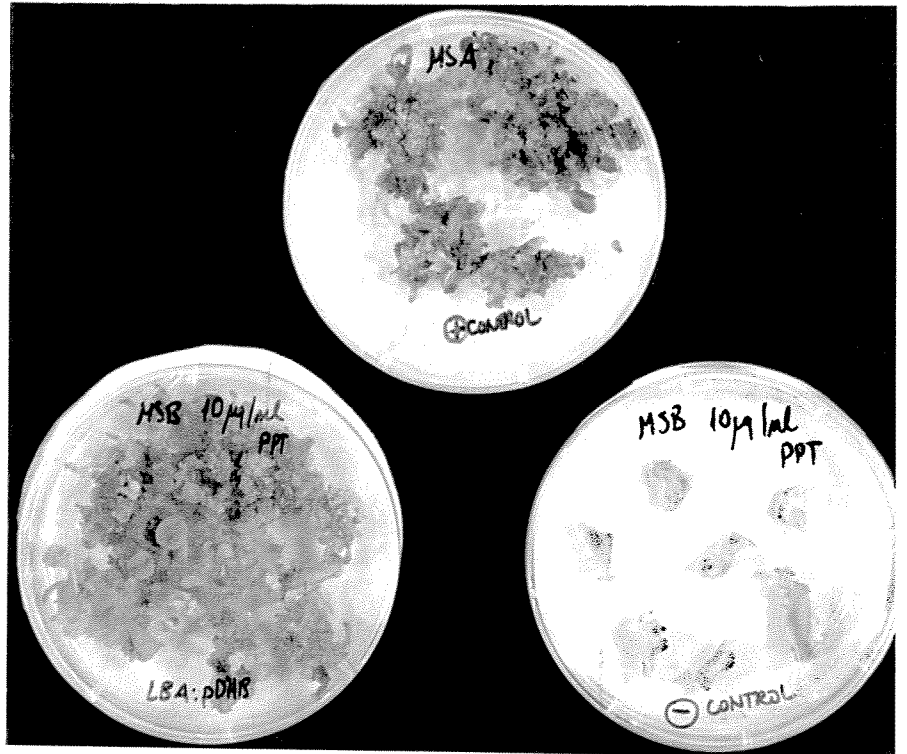
25 GÜN



40 GÜN



70 GÜN



Şekil 3.3.1. LBA:pDHB suşu ile yapılan transformasyon deneyinden elde edilen örnek sonuç.

3.3.1.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri

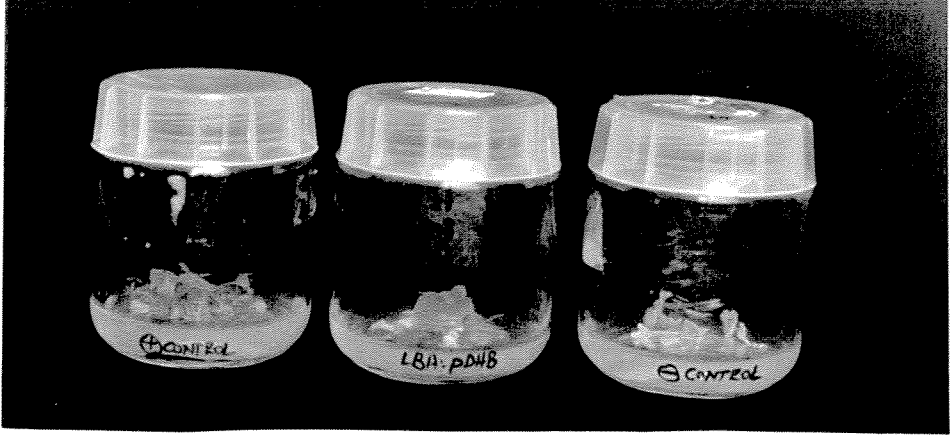
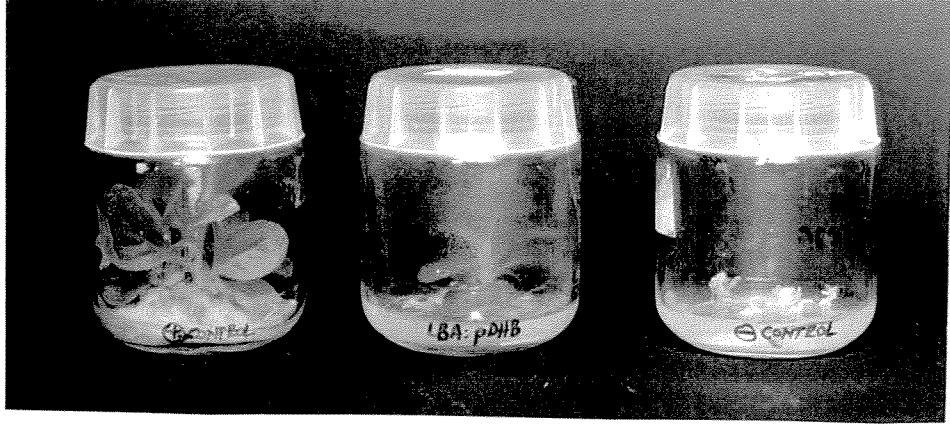
PPT içeren ortamlarda kök oluşturabilen bitkiler daha sonra toprağa alınmışlardır. Deneylerimizde en çok problemin gözleendiği aşama bu olmuştur. Genellikle bitki toprağa alındıktan sonraki ilk 7 gün içerisinde ölmediği takdirde gelişimini devam ettirebilmiştir. Bazı denemelerde oldukça sağlıklı gelişim gösteren bitkilerin dahi 20-30 sonra öldükleri saptanmıştır. Bu aşamada toprağa alınan bitkilerin %60 ' a yakını gelişmelerini devam ettirebilmişlerdir. LBA:pDHB ile taransformasyon sonucu elde edilen örnek bir bitkinin toprağa alındıktan sonraki gelişimi Şekil 3.3.4 de gösterilmektedir.

3.3.2. pGKB5 Binary Vektörü İle Yapılan Deneyler

Daha önceki bölümlerde de açıklandığı gibi bu vektör *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına mobilize edilmiş şekliyle Dr. Bouches'den elde edilmiştir. Bu suş ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir.

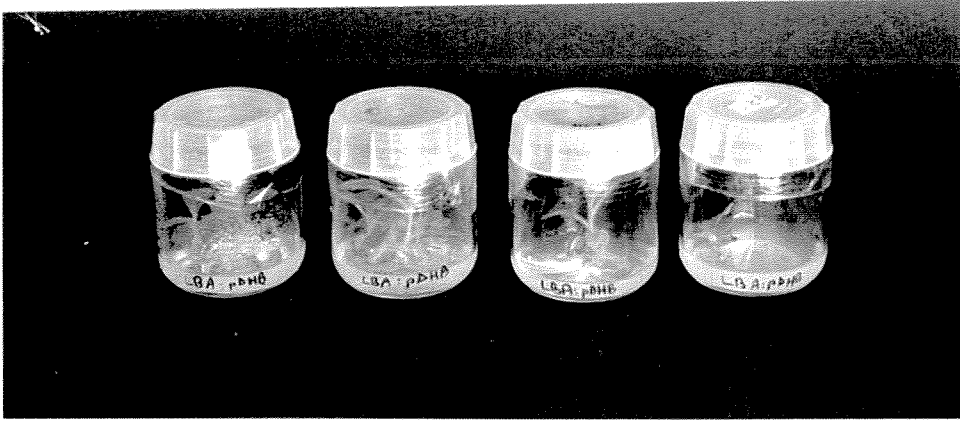
3.2.2.1. Transformasyon Sonrası Kallus ve Gövde Oluşumu

pGKB5 vektörü ile yapılan transformasyon deneylerinde pDHB321.1 vektörüne nazaran daha düşük transformasyon frekansları gözlenmiştir. Ayrıca bu vektörle transform edilen yaprak diskleri seçici ortamda daha yavaş bir gelişme gösterişlerdir. LB5-1:pGK5 ile muamele edilen yaprak disklerinin yaklaşık %75'i PPT ve kanamisin varlığında kallus ve gövde oluşturabilmişlerdir. Transformasyon sonrası belirgin gövde oluşumları 25 ila 35 gün sonunda gözlenmiştir. Yine her diskte birden fazla gövde oluşumu olup ve oluşan gövdeler genelde 45 ila 50 gün sonunda kök oluşumları için MSC ortamlarına alınabilecek duruma gelmektedirler (Şekil 3.3.5). Tüm deneylerde kaçakların minimize edilmesi amacıyla seçici ortamlar 4-6 mg/litre PPT ve 50 mg/litre kanamisin bulundurmaktadır. Bazı denemelerde selksiyonun daha etkin hale getirilmesi amacıyla PPT ve/veya kanamisin derişimleri arttırılmıştır.

KÜLTÜRDEKİ GÜN SÜRESİ	DENEY SETLERİ ve ORTAMLAR	
	MSA	MSB + 10 mg/litre PPT
17		
40		

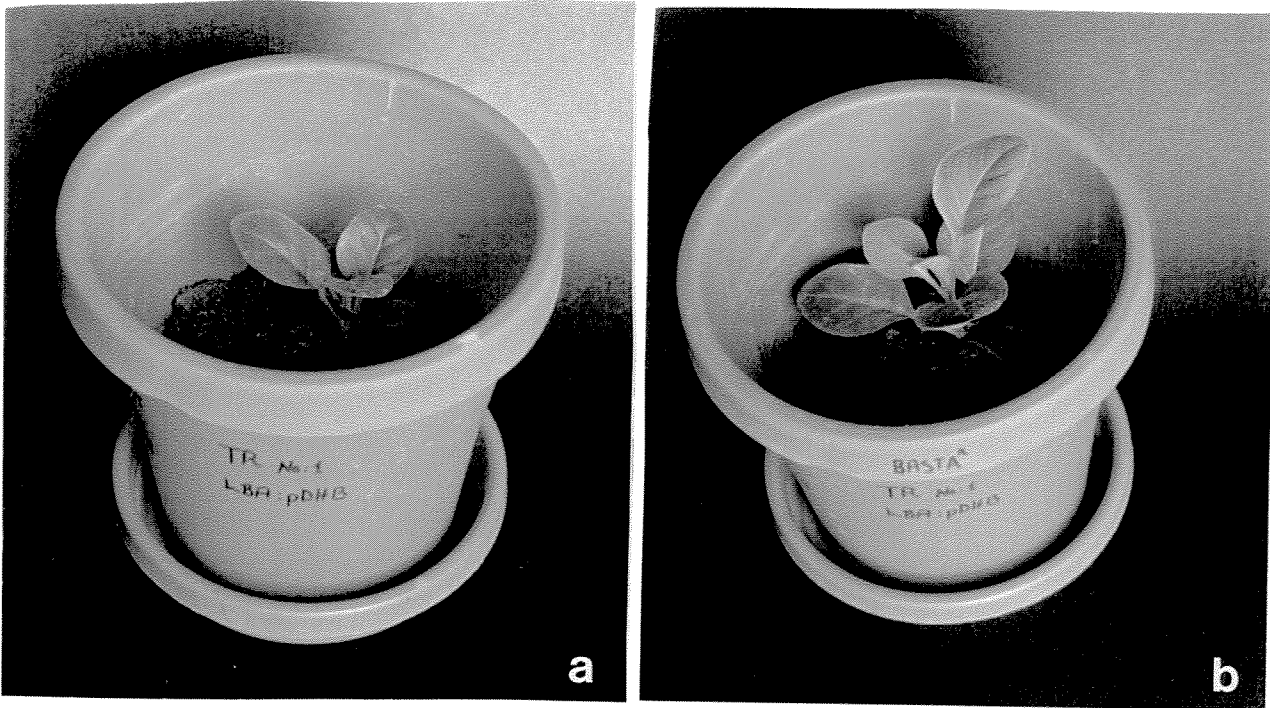
Şekil 3.3.2. Kontrol ve LBA:pDHB ile transforme edilmiş disklerden elde edilen gövdelerin MSC ortamlarındaki kök oluşumları

MSA ortamında 20 gün sonunda oluşan gövdelerle, LBA:pDHB ile muamele edilip PPT içeren MSB ortamlarında 20 gün gelişen gövdeler kök oluşumları için 10 mg/litre PPT içeren (-CONTROL ve LBA:pDHB) ve PPT içermeyen (+ CONTROL) MSC ortamlara alınmış ve gelişimleri gözlenmiştir.



Şekil 3.3.3. LBA:pDHB ile muamele edilip PPT içeren MSB ortamlarında gelişen gövdelerin seçici MSC ortamlarındaki kök oluşumları

40 gün lük gövdeler 10 mg/litre PPT içeren MSC ortamlarına alınmış ve 21 gün sonra görüntülenmişlerdir.

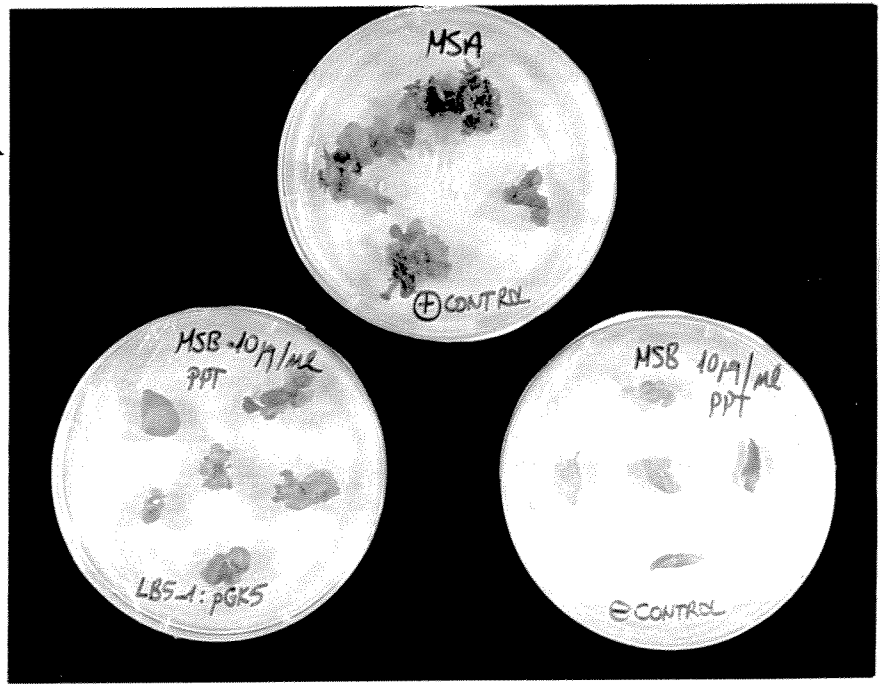


Şekil 3.3.4. LBA:pDHB ile yapılan transformasyon deneyleri sonucu elde edilen bir öncül transgenik bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.

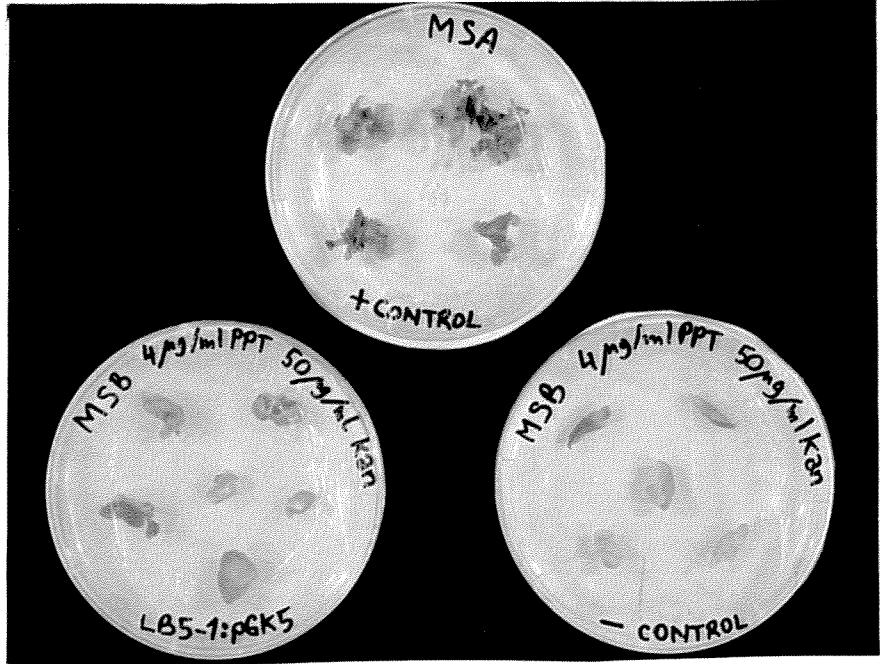
Şekil 3.3.3'de sağdan ikinci kavonozdaki bitki kültüre alındıktan 21 gün sonra toprağa aktarılmıştır. Fotoğraflar bitkinin toprağa alındıktan 10 (A) ve 25 (B) günlük gelişimini göstermektedir.

MSB ORTAMINA ALINDIKTAN SONRA
GEÇEN SÜRE

25 GÜN



32 GÜN



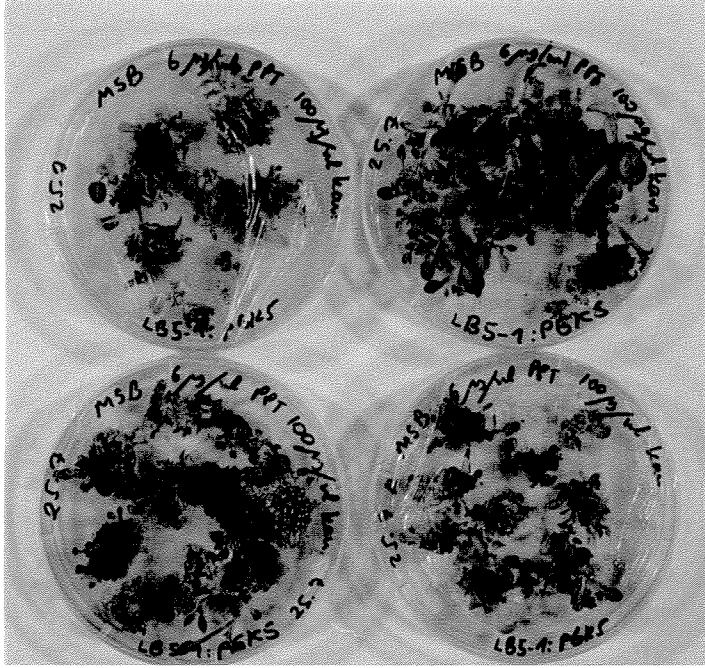
54 GÜN



Şekil 3.3.5. LB5-1:pGK5 suşu ile yapılan transformasyon deneyinden elde edilen örnek sonuç.

Bu vektör ile yapılan denemelerde oluşan ilk gövdeler kök oluşumları için MSC ortamlarına alındıktan sonra, kalan kallus ve gövdeler alt kültüre alınarak transgenik materyalin amplifikasyonuna gidilmiştir. Alt kültüre alınan materyalden kısa süre içerisinde birçok yeni gövde elde edilebildiği gözlenmiştir (Şekil 3.3.6).

LB5-1:pGK5 suşu ile yapılan deneyler sonucunda 90 günlük bir süreçte yaklaşık 75 adet gövde elde edilmiş ve kök oluşumları için seçici MSC ortamlarına alınmışlardır.

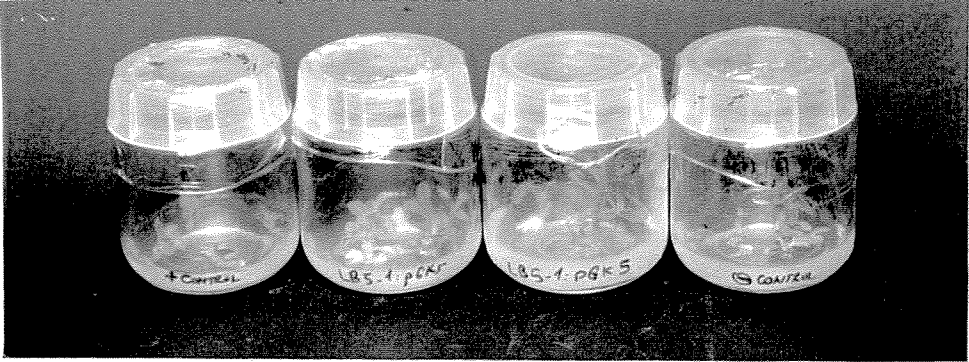
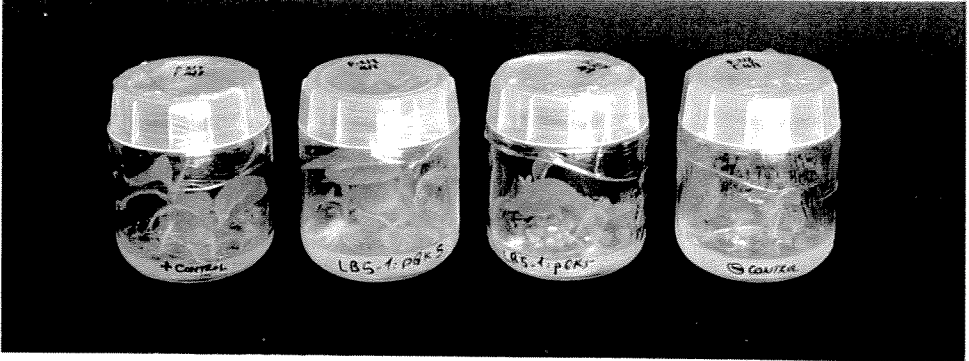


Şekil 3.3.6. Altkültüre alınan transgenik kallustan gövde oluşumu

Şekil 3.3.5’de gösterilen 54 günlük transgenik materyalden alınan kallus ve küçük gövdeler seçici MSB ortamlarında lat kültüre alınmış ve 24 gün sonra görüntülenmişlerdir.

3.2.2.2. Transgenik Gövdelerde Kök Oluşumu

Transformasyon deneyleri sonucu elde seçiçi MSB ortamlarında elde edilen tüm gövdeler kök oluşumları için 6 mg/litre PPT ve 50 mg/litre kanamisin içeren MSC ortamlarına alınmışlardır. Şekil 3.3.7’de MSC ortamına alınan gövdelerin 21 günlük gelişimini gösteren örnek bir sonuç sunulmaktadır.

KÜLTÜRDEKİ GÜN SÜRESİ	DENEY SETLERİ ve ORTAMLAR	
	MSA	MSB + 10 mg/litre PPT+ 50 mg/litre kanamisin
9		
21		

Şekil 3.3.7. Kontrol ve LB5-1:pGK5 ile transforme edilmiş disklerden elde edilen gövdelerin MSC ortamlarındaki kök oluşumları.

MSA ortamında 50 gün sonunda oluşan gövdelerle, LBA:pDHB ile muamele edilip PPT içeren MSB ortamlarında 54 gün gelişen gövdeler kök oluşumları için 6 mg/litre PPT ve 50 mg/litre kanamisin içeren (-CONTOR ve LB5-1:pGK5) ve PPT içermeyen (+CONTROL) MSC ortamlara alınmış ve gelişimleri gözlenmiştir.

MSC'ye alınan gövdelerin %16'sı 7-10 gün , %50'si 10-15 gün diğerleri ise 15-30 gün sonunda kök oluşumu göstermektedirler. 30 günlük kültür sonrası seçici MSC ortamlarına alınan gövdelerde %75 seviyesinde kök oluşturma frekansı elde edilmiştir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.3.8). Deneylerde MSC'ye alınan gövde yaşının köklenme üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Kök oluşturabilen bitkiler 30-40 gün sonra toprağa alınmışlardır.

Tablo 3.1. MSC seçici ortamına alınan gövdelerde kök oluşturma frekansı.

LB5-1:pGK5 suşu ile transform edilip MSB seçici ortamlarında gelişen 21 günlük gövdeler seçici MSC ortamlarına alınıp kök oluşumları gözlenmiştir. Deneyde Şekil 3.3.6'da gösterilen kültürlerden alınan 50 adet gövde kullanılmıştır.

Kültür Süresi (gün)	Toplam Köklenen Gövde Sayısı (adet)	Kök Oluşturma Frekansı (%)
7-10	8	16
10-15	25	50
15-30	38	76

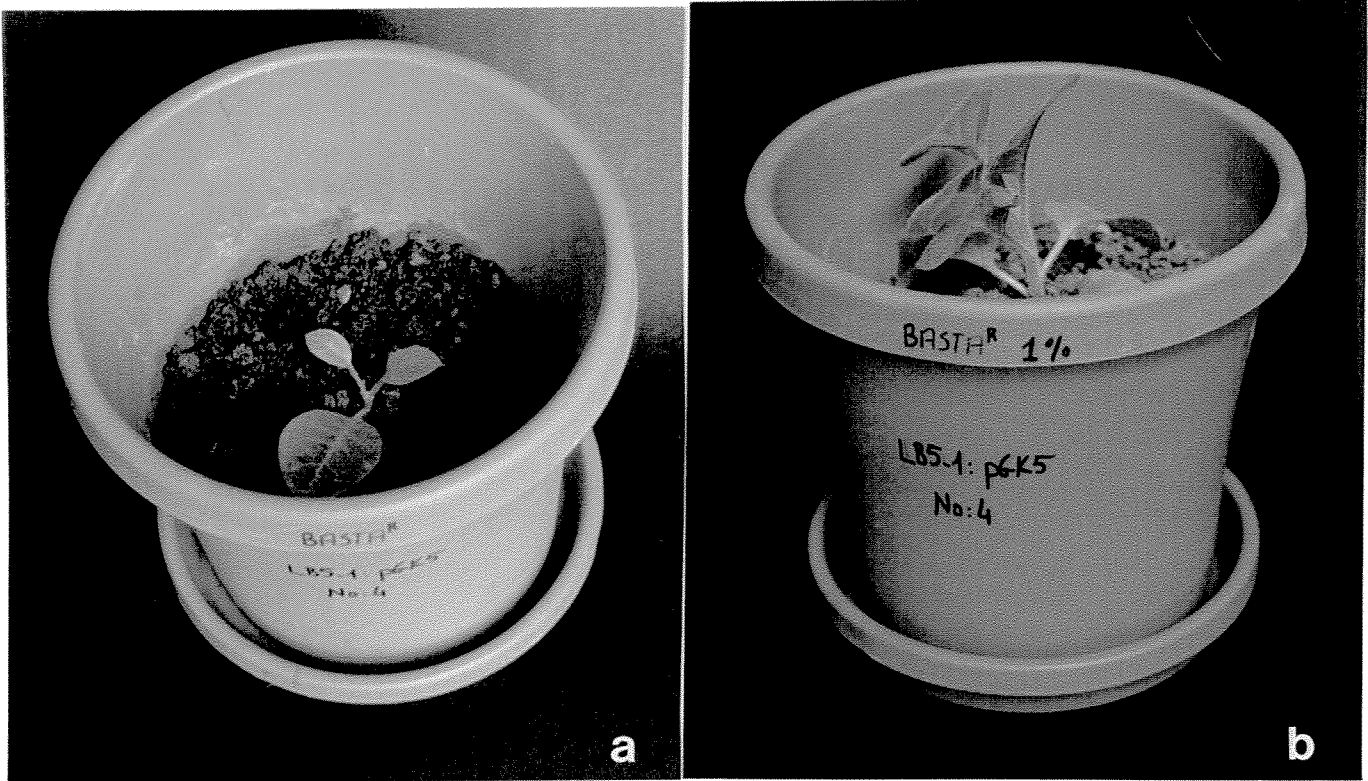


Şekil 3.3.8. Altkültürde gelişen 21 günlük gövdelerin seçici MSC ortamındaki kök gelişmeleri

Şekil 3.3.6 da gösterilen kültürden alınan gövdeler kök gelişimleri için 6 mg/litre PPT ve 50 mg/litre kanamisin içeren seçici MSC ortamlarına alınmış ve 30 günlük kültür sonrası fotoğrafları çekilmiştir.

3.3.2.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Topraktaki Gelişimleri

LB5-1:pGK5 ile transforme edilip köklendirilen bitkiler, LBA:pDHB transformasyonu sonrası elde edilen bitkiler ile mukayese edildiklerinde, topraktaki gelişmelerinin daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Genelde bitkiler toprağa alındıktan sonraki ilk 10-15 gün fazla bir gelişme göstermemişlerdir. Bu süre içerisinde ölmeyen bitkiler daha sonra gelişimlerini devam ettirebilmişlerdir. Toprağa alınan bitkilerin yaklaşık %40'ından sağlıklı gelişim gösterebilen bitkiler elde edilebilmiştir. Toprağa alınan bir bitkinin 25 günlük gelişimi Şekil 3.3.9'da verilmektedir.



Şekil 3.3.9. LB5-1:pGK5 ile yapılan transformasyon deneyleri sonucu elde edilen öncül bir transgenik bitkinin toprağa alındıktan sonra gösterdiği gelişme.

Fotoğraflar bitkinin toprağa alındıktan sonra 25(A) ve 90 (B) günlük gelişimini göstermektedir.

3.4. *Transgenik Materyalin Analizi*

Deneyler esnasında kök oluşum aşamasından itibaren elde edilen öncül transgenik bitkiler herbisit dirençleri açısından analiz edilmeye başlanmıştır. Bu amaçla değişik analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Yapılan analizler ilk aşmada kök oluşumlarını devam ettiren ve/veya tamamlayan bitkiler üzerinde toprağa transfer edilmeden önce yürütülmüştür. Bu deneylerin ilkinde seçici MSC ortamında gelişmekte olan bitkilerden alınan yaprak diskleri seçici MSB ortamlarına alınarak kallus ve gövde oluşumları takip edilmiştir ve deneyler raporda “Yaprak Diski Analizi” olarak adlandırılmaktadır.

Raporda “Yaprak Boyama Analizi” olarak adlandırılan deneylerde ise kök oluşumlarını tamamlamış kontrol ve öncül transgenik bitkilerin yaprakları steril bir fırça yardımı ile değişik derişimlerde herbisit ile muamele edilmişlerdir.

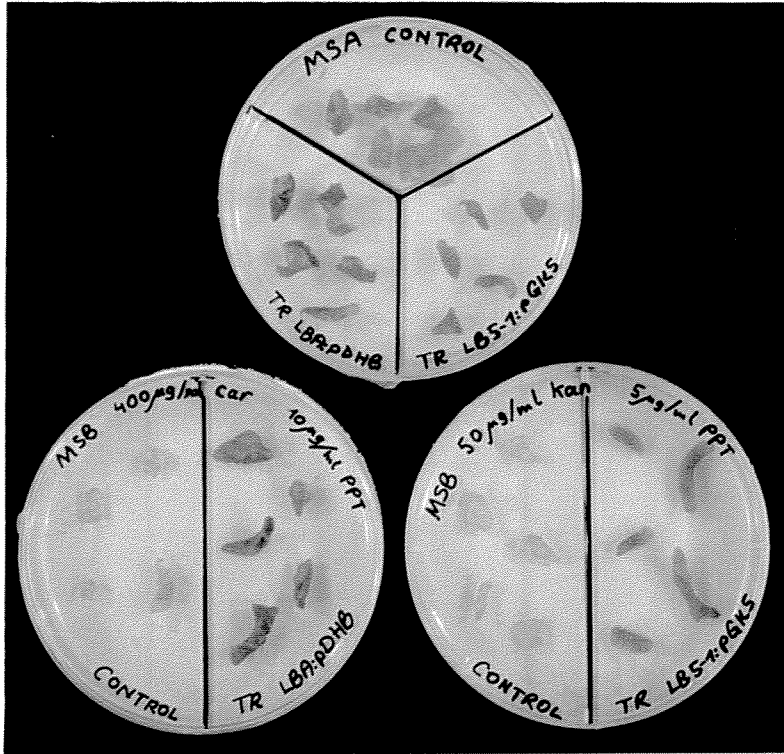
Yapılan analizlerin ikinci bölümü öncül transgenik bitkiler toprağa alındıktan sonra yürütülmüştür. Bu deneylerde toprakta gelişmekte olan kontrol ve transgenik bitkilerin üstüne değişik derişimlerde BASTA herbisiti püskürtülmüş ve bitkilerde oluşan morfolojik derişimler görüntülenmiştir. Bu deneyler raporda “Herbisit Uygulaması” başlığı altında verilmektedir.

Son aşamada yapılan analizler ise aktarılan *bar* geninin bitki genomundaki varlığını kanıtlamak üzere yürütülen “Southern Blot” analizleri ve genin protein seviyesinde ifade edilerek PAT enzimini sentezlediğinin gösterilmesi amacıyla yapılan elektroforez çalışmalarıdır.

Bu deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda bölümler halinde verilmektedir. Mukayese edilebilmesi için her iki binary vektörle yapılan çalışmalar şekillerde beraber olarak verilmektedir.

3.4.1. Yaprak Diski Analizi

Deneylerde daha önceki şekillerde gösterilen ve MSC ortamlarında kök gelişimlerini devam ettirmekte olan bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri kullanılmıştır. Kullanılacak bitkinin bulunduğu kavanozun seçimi rastgele yapılmış, ancak kullanılan tüm bitkilerin aynı yaşta olmasına özen gösterilmiştir. Deneyler belirtilen bu şekli ile değişik zamanlarda elde edilen bitkiler üzerinde iki kez tekrarlanmıştır. (Şekil 3.4.1 ve Şekil 3.4.2). Şekillerden de görülebileceği gibi öncül transgenik bitkilerden hazırlanıp analize alınan tüm diskler seçici ajanların (PPT ve kanamisin) varlığında kallus ve gövde oluşumlarını gerçekleştirebilmektedir. Aynı ortamlara konulan kontrol diskler de ise herhangi bir gelişme gözlenmemektedir.



Şekil 3.4.1. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSA ve MSB seçici ortamlarında gösterdikleri gelişme.

MSC ortamlarında köklenmekte olan 20 günlük kontrol ve öncül transgenik bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri MSA ve PPT ve/veya kanamisin içeren seçici MSB ortamlarına alınmışlardır. Fotoğraf disklerin bu ortamlardaki 9 günlük gelişimlerini göstermektedir.

GÜN	DENEY SETLERİ ve ORTAMLAR
15	
25	

Şekil 3.4.2. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin MSB ortamlarında gösterdikleri gelişme.

MSC ortamlarında köklenmekte olan ve Şekil 3.3.2 ve 3.3.8 de gösterilen kavanozlardan alınan yaklaşık 25 günlük kontrol ve öncül transgenik bitkilerden hazırlanan yaprak diskleri

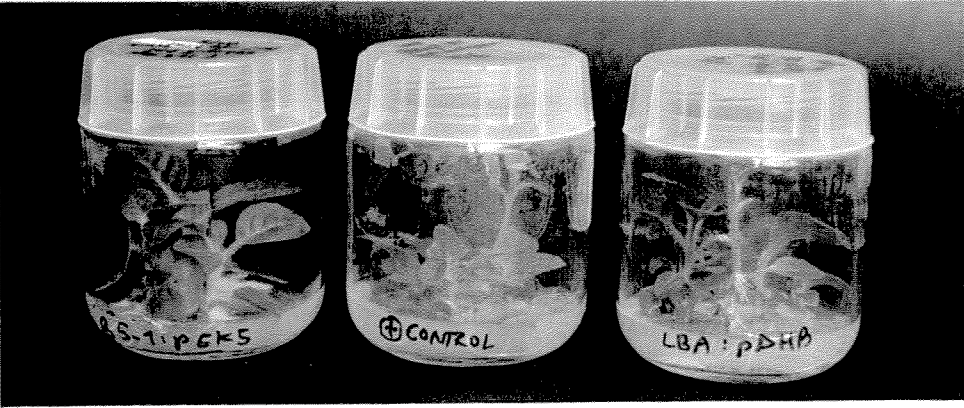
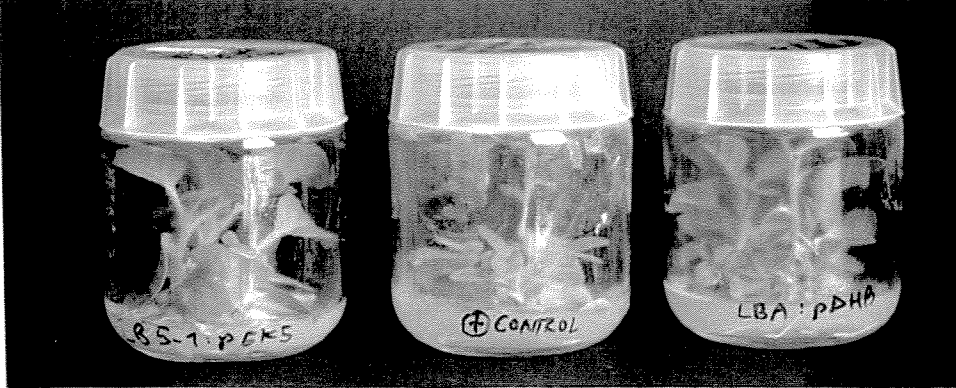
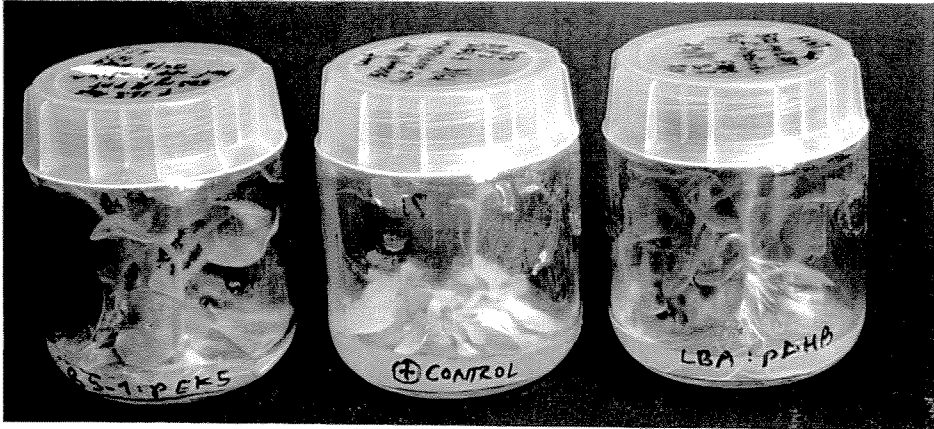
PPT ve/veya kanamisin içeren seçici MSB veya seçici ajan içermeyen MSB ortamlarına alınmışlardır. Ortamlarda bulunan PPT ve kanamisin derişimleri petrilerin üzerinde belirtilmektedir.

3.4.2. Yaprak Boyama Analizi

Bu deneylerde seçici MSC ortamlarında elde edilen öncül transgenik bitkilerin toprağa alınmadan önce gösterdikleri herbisit direncinin saptanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla kök gelişimini tamamlamış (genelde 20-30 günlük) bitkiler %0.25, %1 ve %3 (V/V) BASTA herbisit prepatatı ile muamele edilmişlerdir. Herbisit uygulaması steril bir fırça yardımı ile denemeye alınan kavonuzun içinde bulunan tüm bitkilerin yapraklarına eşit olacak miktarda yapılmıştır (örneğin her yaprağın fırça ile iki kez boyanmasına çalışılmıştır). Herbisit uygulaması sonrası tüm kavanozlar inkübatöre alınarak normal büyüme şartlarında gelişimleri takip edilmiştir. %0.25, %1 ve %3 [®]BASTA ile muamele edilen bitkilerin muamele sonrası gösterdikleri gelişim sırası ile Şekil 3.4.3, 3.4.4 ve 3.4.5 de verilmektedir.



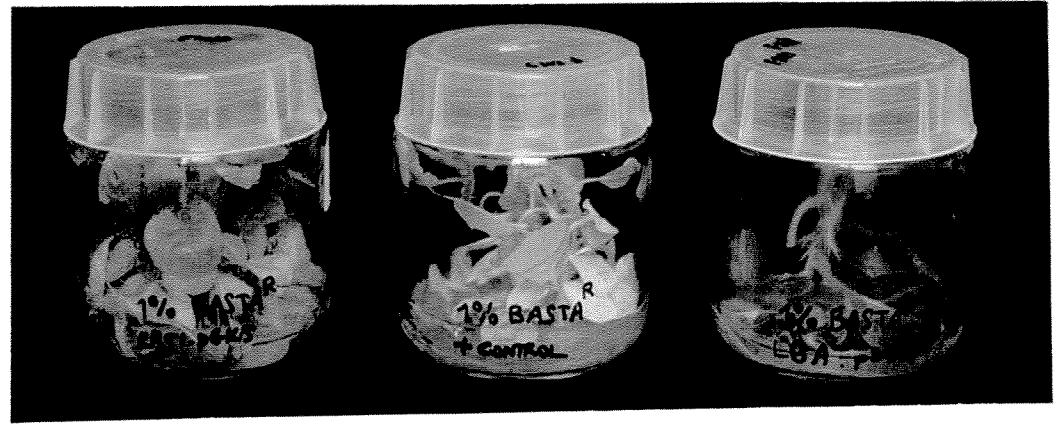
Deneylerde kullanılan en düşük herbisit dozu olan %25 (V/V) [®]BASTA prepatatı 15 gün sonunda kontrol bitkileri tamamen öldürmektedir. Herbisit uygulaması sonrası kontrollerde ilk nekroz belirtileri uygulamadan 5 ila 7 gün sonra gözlenmektedir. Sararma öncelikle bitkinin daha yaşlı olan yapraklarında görülmektedir. Kontrol bitkiler %1'lik herbisit uygulamasından 10 ila 13 gün sonra tamamen ölmektedirler.

LBA:pDHB ile yapılan transformasyon deneylerinden elde edilen öncül transgenik bitkiler herbisit denenen tüm derişimlerinden etkilenmemiş ve gelişimlerini devam ettirebilmişlerdir. LB5-1:pGK5 ile yapılan deneylerden elde edilen bitkiler ise LBA:pDHB den elde edilen bitkiler ile mukayese edildiğinde herbisite daha düşük seviyede direnç gösterdikleri gözlenmektedir. Bu bitkiler %1'lik herbisit uygulamasından etkilenmezken, %3 herbisit derişimi denenen öncül transgenik bitkilerin yaşlı yaprakları üzerinde ölümcül etki yapmaktadır.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ
2	
7	
15	


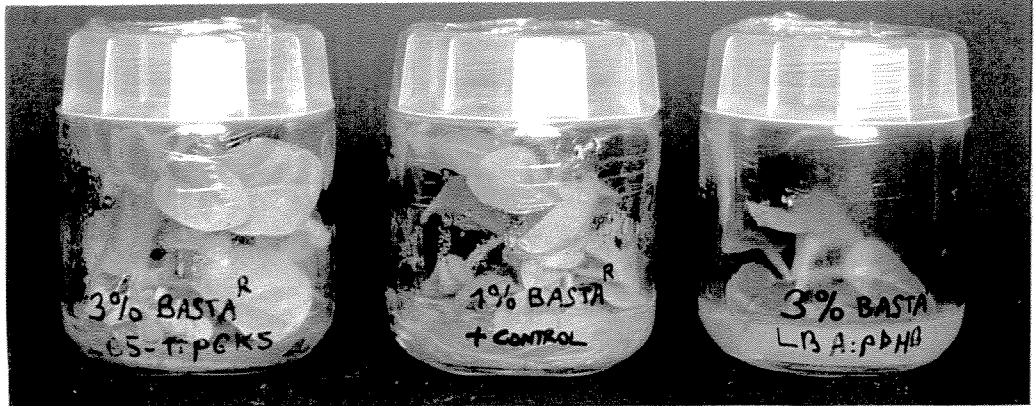

Şekil 3.4.3. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 0.25 (V/V) [®]BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.

MSC ortamlarında kök gelişimlerinin 15'inci günündeki kontrol ve öncül transgenik bitkilerin yaprakları % 0.25 (V/V) [®]BASTA preparatı ile muamele edilip gelişimleri gözlenmiştir.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ
4	
9	
16	

Şekil 3.4.4. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 1 (V/V) [®]BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.

MSC ortamlarında kök gelişimlerinin 25'inci günündeki kontrol ve öncül transgenik bitkilerin yaprakları % 1 (V/V) [®]BASTA preparatı ile muamele edilip gelişimleri gözlenmiştir.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ
4	
9	
16	

Şekil 3.4.5. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerin % 3 (V/V) [®]BASTA herbisit uygulaması sonrası gösterdikleri gelişim.

MSC ortamlarında kök gelişimlerinin 25'inci günündeki kontrol ve öncül transgenik bitkilerin yaprakları % 3 (V/V) [®]BASTA preparatı ile muamele edilip gelişimleri gözlenmiştir.

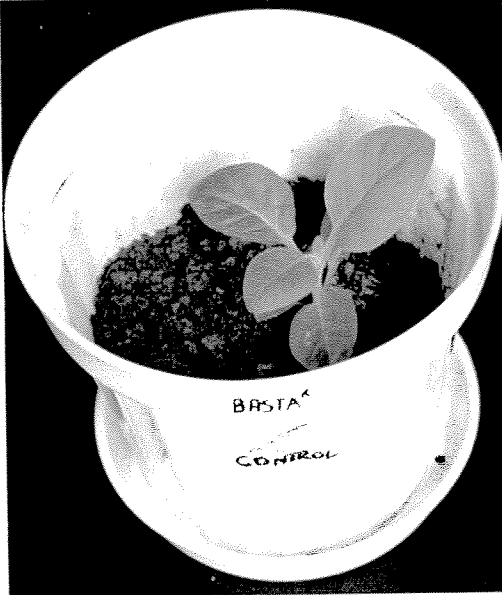
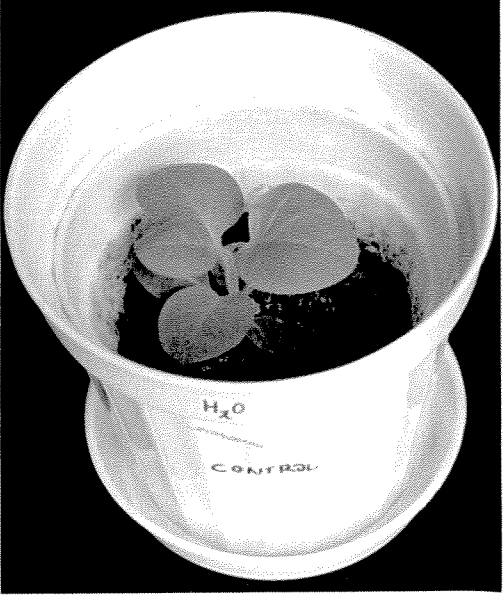
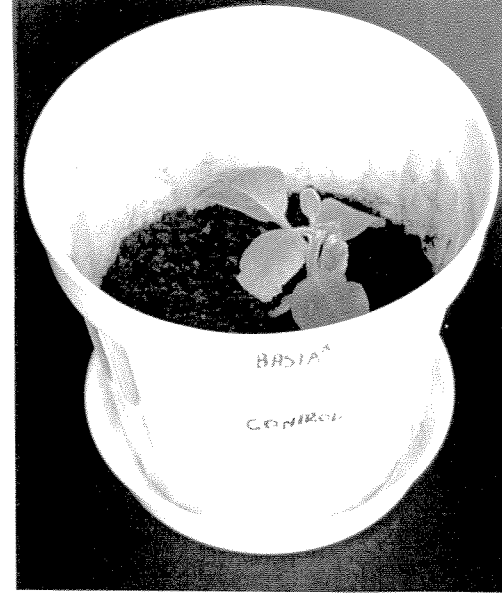
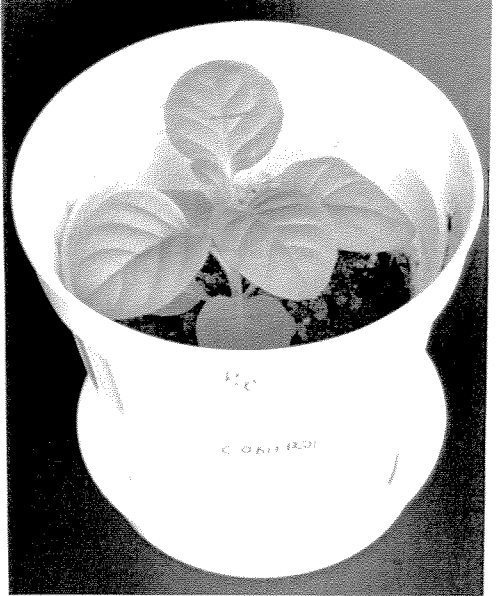
3.4.3. Öncül Transgenik Bitkilerin Herbisit Uygulamasına Gösterdikleri Tepkiler

Bu deneylerde yaprak disklerinden rejener eden ve toprakta gelişimini sürdürmekte olan kontrol ve öncül transgenik bitkiler kullanılmıştır. Bitkiler % 0.25 ve %1 (V/V) olmak üzere iki değişik dozda BASTA preperatları ile muamele edilmişlerdir. Kontrol olarak su püskürtülen bitkiler kullanılmıştır. Herbisit muamelesi esnasında tüm bitkilere eşit miktarda herbisit püskürtülmesine azami dikkat edilmiştir.

3.4.3.1. % 0.25 (V/V) BASTA Uygulaması

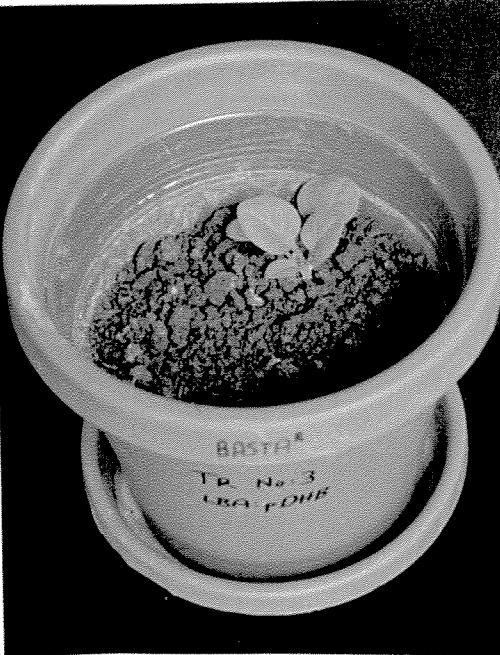
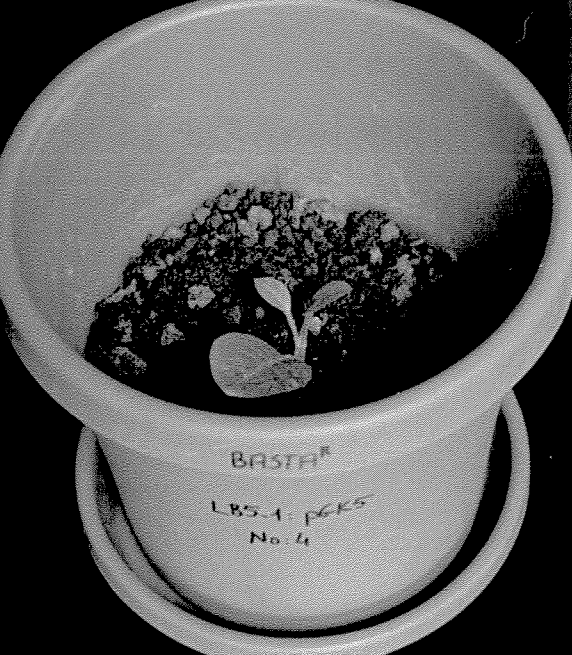
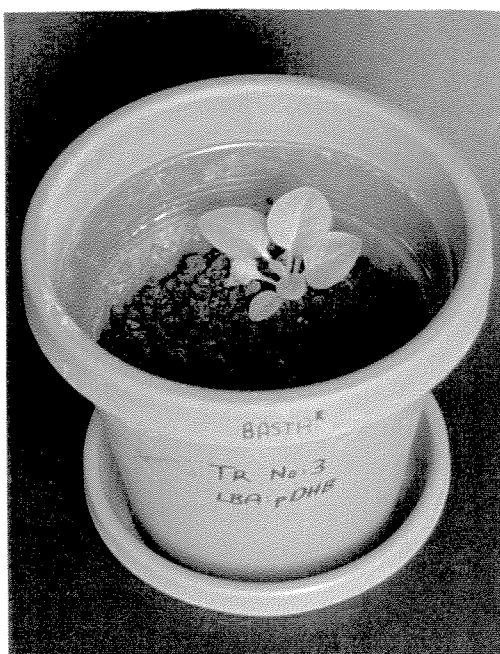

Kontrol bitkiler % 0.25 (V/V) BASTA uygulamasında 30 gün sonra tamamen ölmektedirler. Yapraklarda ilk sararmalar 10 gün sonunda belirgin hale gelmekte ve herbisit etkisi 20 gün civarında belirginleşmektedir. Su ile muamele edilen kontrol bitkiler ise gelişimlerini normal olarak devam ettirmektedirler. Örnek deney sonuçları Şekil 3.4.6. ve 3.4.8 de verilmektedir.

Öncül transgenik bitkilerin aynı dozdaki herbisit uygulanmasından etkilenmedikleri ve gelişimlerini devam ettirebildikleri gözlenmiştir (Şekil 3.4.7). Su ile muamele edilen kontrol bitkilerle mukayese edildiğinde transgenik bitkilerinin daha yavaş geliştiği görülmektedir.


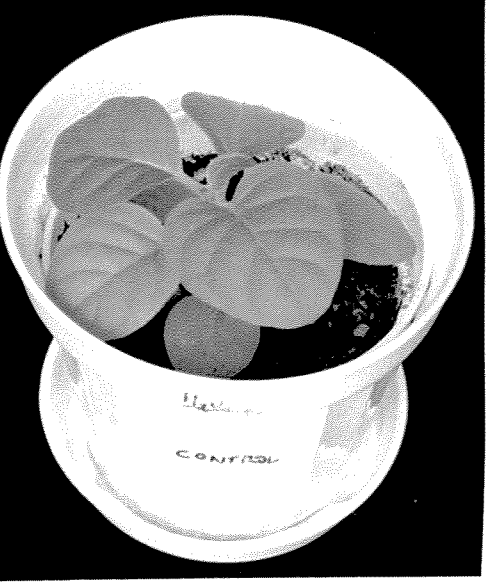
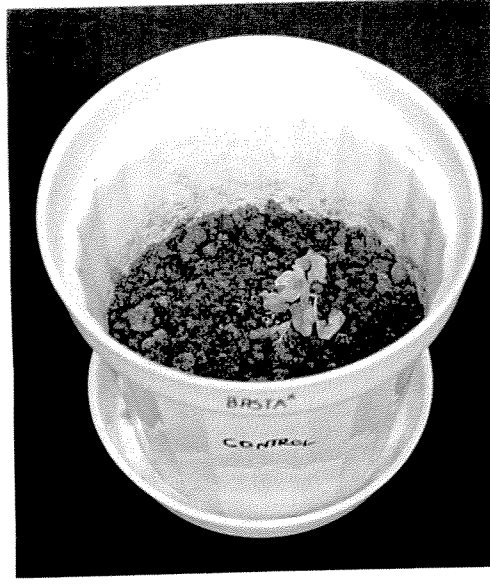

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ	
3		
18		

Şekil 3.4.6. Su ve % 0.25 (V/V) [®]BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme

Rejenerasyon sonrası toprağa alınan 1 aylık kontrol tütün bitkileri %0.25 (V/V) [®]BASTA veya su ile muamele edildikten sonra gelişmeleri takip edilmiştir.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ	
3		
18		

Şekil 3.4.7. Öncül transgenik tütün bitkilerinin %0.25 (V/V) [®]BASTA muamelesine gösterdikleri tepki. LBA:pDHB ve LB5-1:pGK5 ile transformasyonu sonucu elde edilen öncül transgenik bitkiler toprağa alındıktan 40 gün (pDHB) ve 17 gün (pGK5) sonra belirtilen dozda herbisit ile muamele sonrası gelişimleri takip edilmiştir. Bitkiler Şekil 3.4.6 da gösterilen bitkiler ile aynı günde muamele edilmişlerdir.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ	
23		
30		

Şekil 3.4.8. Su ve % 0.25 (V/V) [®]BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme

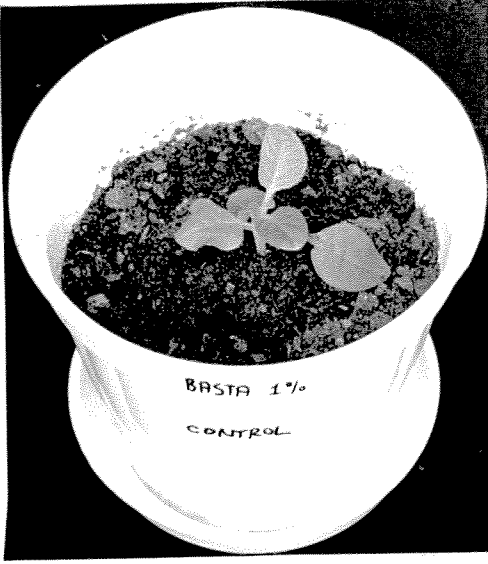
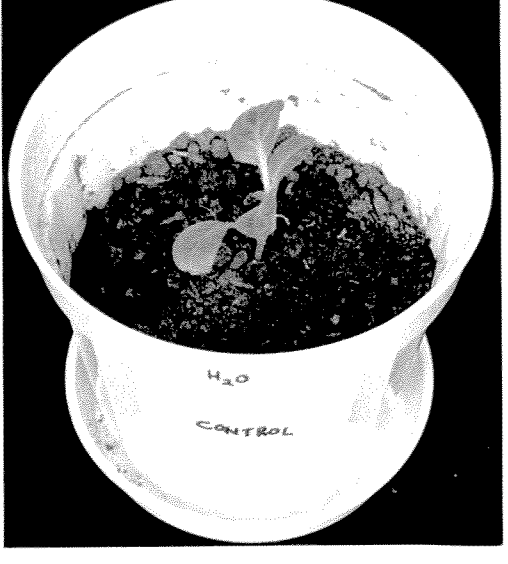
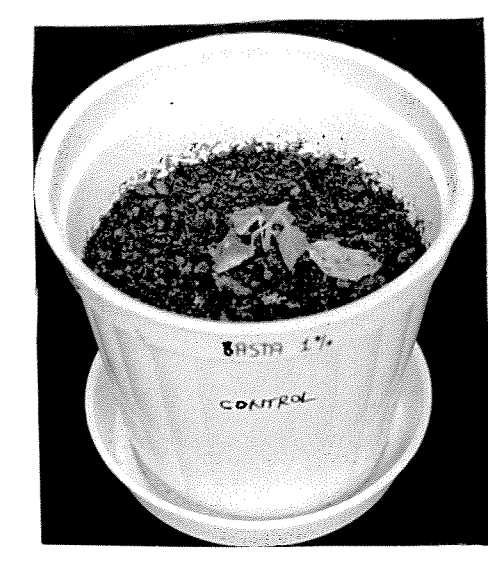
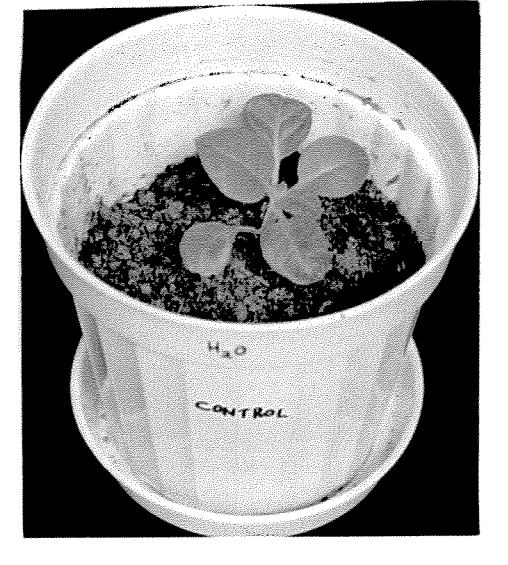
Şekil 3.4.6 da gösterilen bitkilerin uzun dönemdeki gelişmeleri görülmektedir.

3.4.3.2. % 1 (V/V) BASTA Uygulaması

Üretici firma tarafından önerilen uygulama dozu olan %1 (V/V) BASTA uygulaması kontrol bitkiler üzerindeki ölümcül etkisini 9 gün içerisinde göstermektedir (Şekil 3.4.9). Herbisit muamelesi sonrası yapraklardaki ilk sararmalar 2 gün içerisinde gözlenebilmektedir. Herbisit ile aynı doz ve şartlarda muamele edilen transgenik bitkiler ise muamele sonrası gelişmelerini devam ettirebilmektedirler (Şekil 3.4.10). Ancak yaprak boyama analizlerinde de gözleendiği gibi LB5-1:pGK5 transformasyonundan elde edilen bitkilerin herbisit direnci LBA:pDHB transformasyonu sonrası elde edilen bitkilerden daha düşüktür. Özellikle yaşlı yapraklar bu dozdaki herbisit muamelesi sonrası ölmekte fakat bitki daha sonra gelişimini devam ettirebilmektedir.


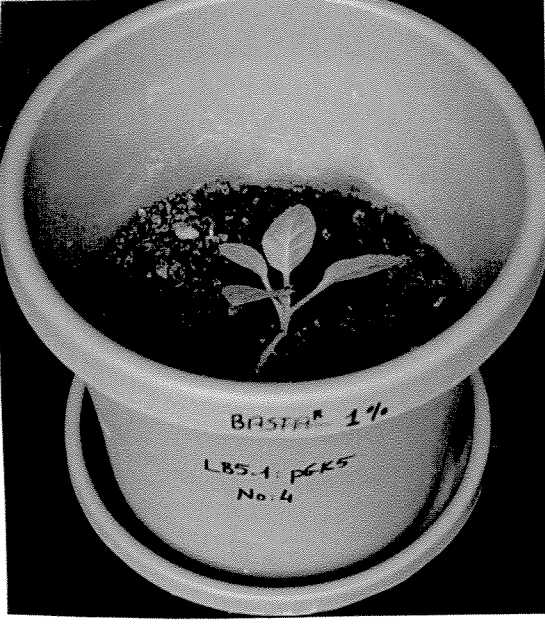
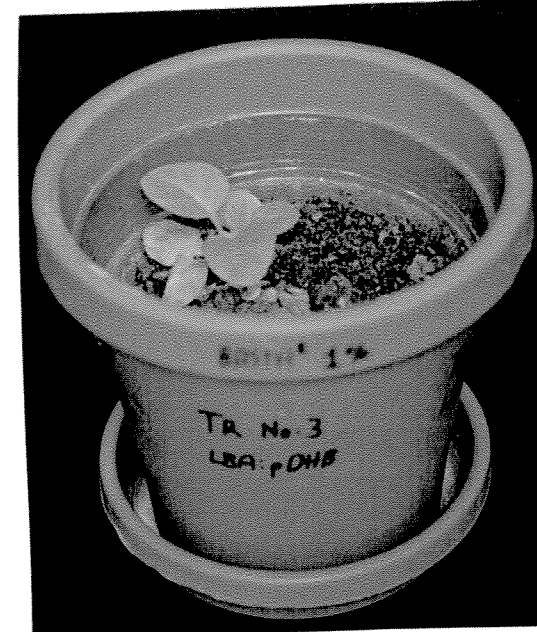
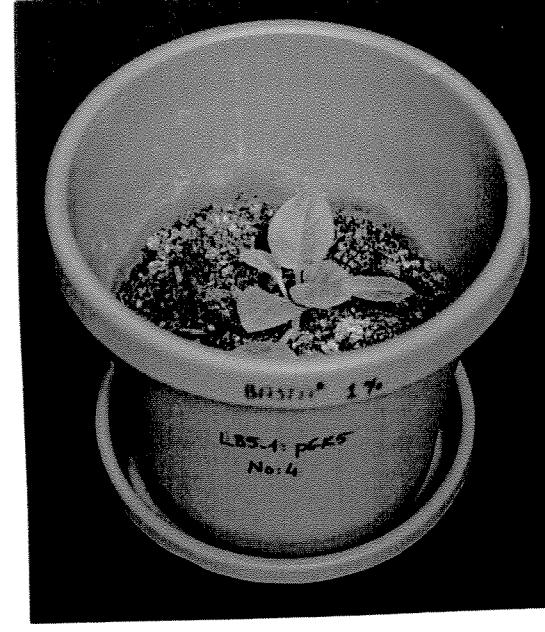
3.4.3.3. Herbisit Uygulamasının Transgenik Bitkilerin Gelişimi Üzerine Etkileri

Herbisit uygulaması sonrası transgenik bitkilerin gösterdiği gelişmenin saptanabilmesi amacıyla, deneylerden elde edilen transgenik bitkiler su ve herbisit ile muamele edildikten sonra gösterdikleri gelişim takip edilmiştir. Şekil 3.4.11 de görüleceği gibi herbisit ile muamele edilen bitkiler su ile muamele edilmiş transgenik bitkilerle mukayese edildiğinde uygulama sonrası 15 ila 20 gün süreyle daha yavaş bir gelişme göstermektedirler. Bu bitkiler daha sonra normal bir gelişme sürecine girmektedirler.

MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ	
2		
9		

Şekil 3.4.9. Su ve % 1 (V/V) [®]BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin gösterdikleri gelişme

Rejenerasyon sonrası toprağa alınan yaklaşık 1 aylık kontrol tütün bitkileri % 1 (V/V) [®]BASTA veya su ile muamele edilmiş ve gelişimleri takip edilmiştir.

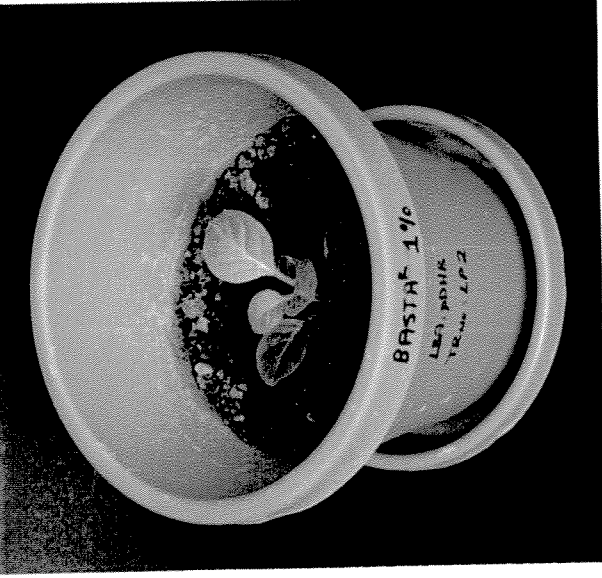
MUAMELE SONRASI GÜN	DENEY SETLERİ	
2		
21		

Şekil 3.4.10. Öncül transgenik tütün bitkilerinin % 1 (V/V) [®]BASTA muamelesine gösterdikleri tepki. Daha önce şekil 3.4.7 de gösterilen ve % 0.25 [®]BASTA muamelesinden etikilenmeyen öncül transgenik bitkiler, % 0.25 [®]BASTA muamelesinden 18 gün sonra % 1 (V/V) [®]BASTA ile muamele edilmişler ve gelişimler takip edilmiştir.

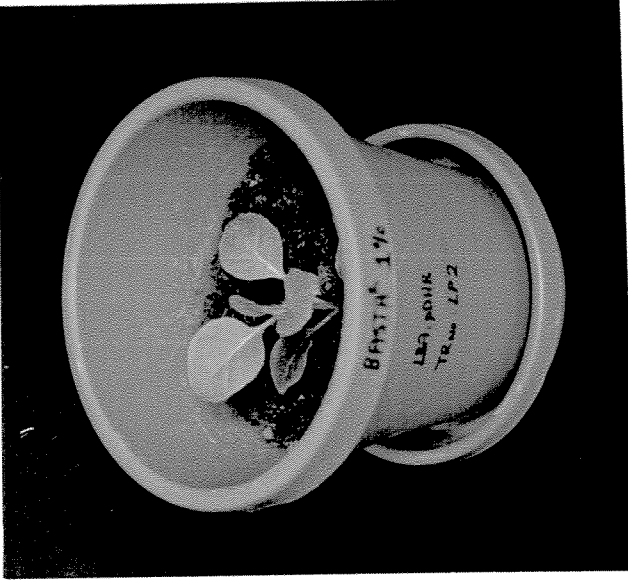
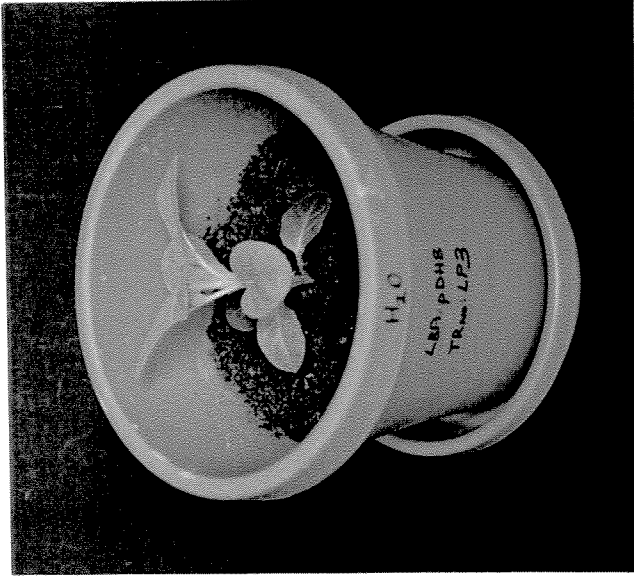
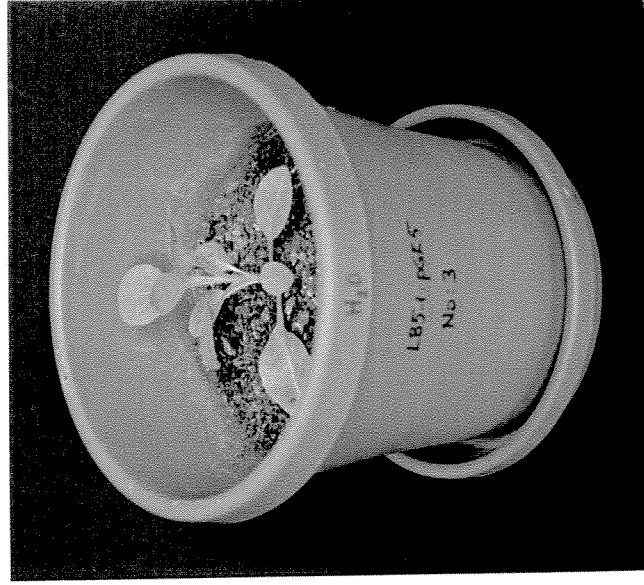
DENEY SETLERİ

GÜN

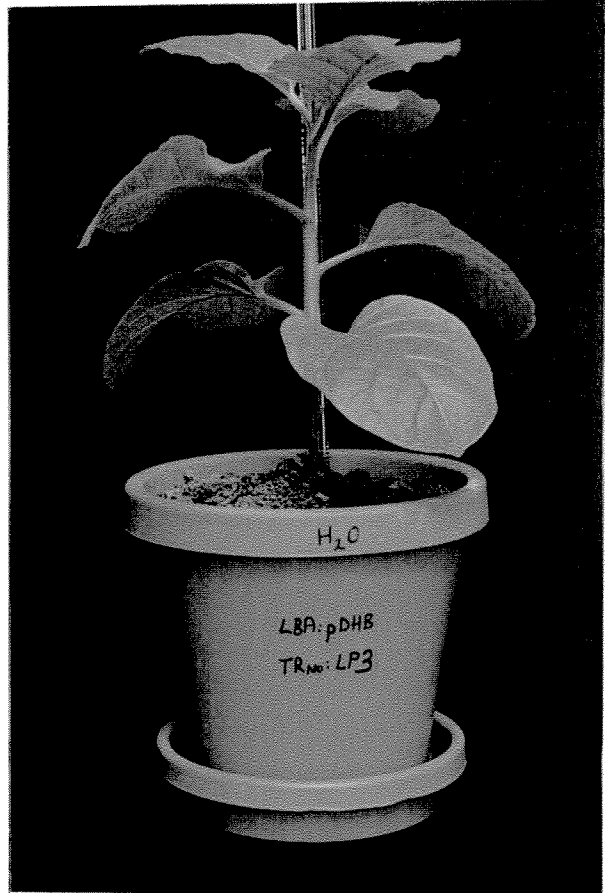
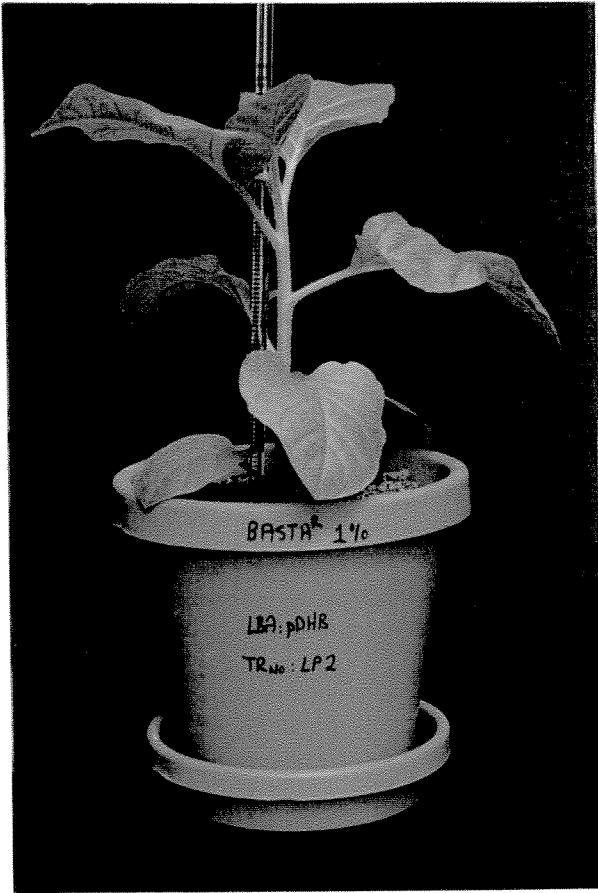
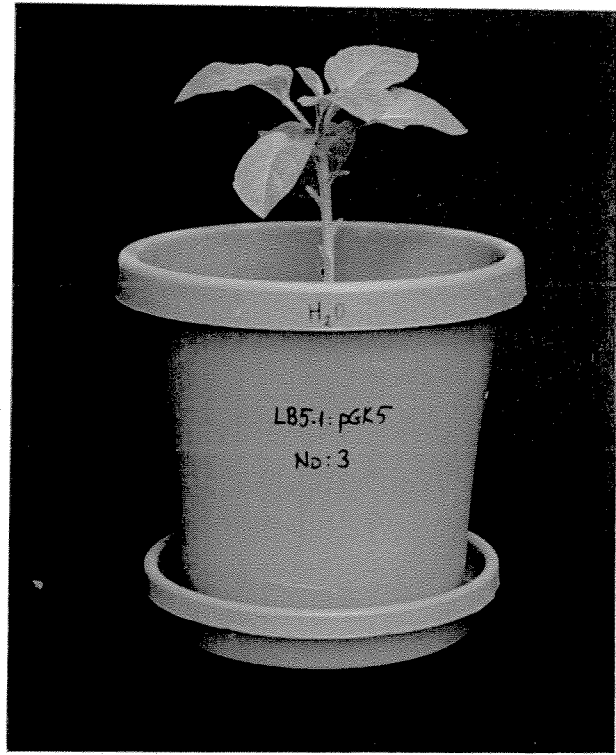
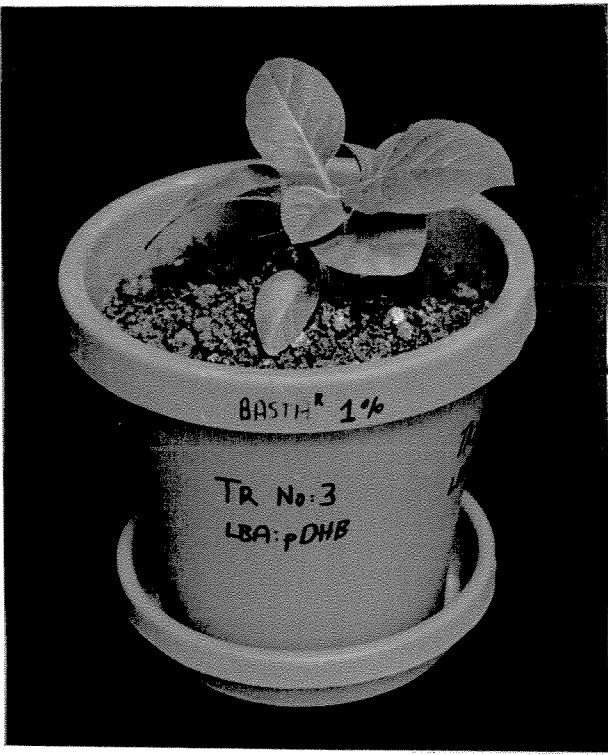
2



18



Şekil 3.4.11. Öncül transgenik tütün bitkilerinin % 1 (1/100) BASTA ve su muamelesine gösterdikleri tepki.



Şekil 3.4.12. Toprakta gelişimlerini sürdürmekte olan transgenik hatlar.

Toprakta gelişimlerini sürdürmekte olan farklı transgenik hatlar. Fotoğraflar bitkilerin topraktaki yaklaşık 100 günlük gelişimlerini göstermektedir.

3.4.4. Southern Blot Analizleri

Yapılan bu deneylerin amacı daha önceki bölümlerde analiz edilen bitkilerin genomlarında *bar* genini taşıdıklarının doğrulanmasıdır. Bu amaçla bahsi geçen bitkilerden genomik DNA örnekleri izole edilmiş, Pst-I restriksiyon enzimleri ile hidroliz edilmiş, agaroz jellerde ayrıştırılarak naylon membranlara aktarılmıştır. Bu çalışmalara paralel olarak deneylerde pDHB321.1 plazmidi Pst-I RE hidroliz edilmiş, agaroz jellerde ayrıştırılmış ve *bar* genine tekabül eden 560 bazlık parça (prob) bu jellerden izole edilerek , “Random Prime Labeling” esasına göre DIG-UTP ile işaretlenmiştir. İşaretlenen prob hibridizasyon deneylerinde kullanılmadan önce “Dot Blot” tekniği kullanılarak hangi derişimde sinyal alınabileceği saptanmıştır. Son olarak ta, genomik DNA’ların aktarıldığı naylon membran elde edilen prob ile hibridize edilerek *bar* geninin transgenik bitkilerin genomundaki varlığı gözlenmiştir. Aşağıdaki bölümlerde bu konuda yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar sunulmaktadır.

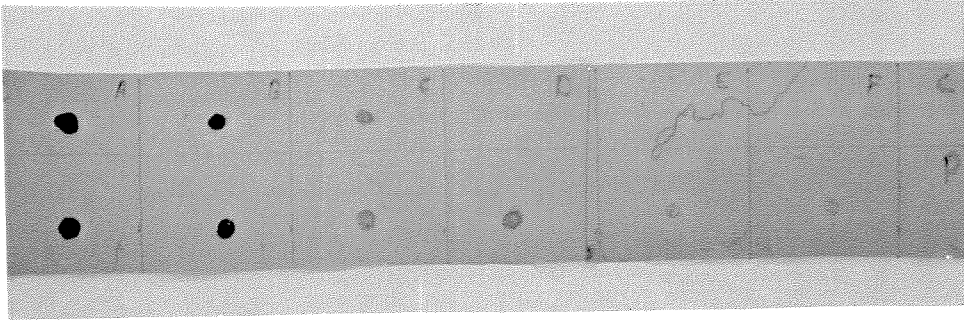
3.4.4.1. İnsert İzolasyonu İşaretlenmesi ve Derişim Tayini

Daha önceki bölümlerde de açıklandığı gibi pDHB321.1 plazmidi büyük ölçekte saflaştırılmıştır. Bu plazmidler daha sonra Pst-I RE ile hidroliz edilmiş ve agaroz jellerde ayrıştırıldıktan sonra *bar* genine tekabül eden 560 baz uzunluğundaki parçacık (insert) jellerden izole edilmiştir. İşaretleme işlemine geçilmeden önce elde edilen insert alınan örnek tekrar agaroz jelerde ayrıştırılarak izolasyon deneylerinin başarılı olup olmadığı test edilmiştir.

Bu deneyler sonucu insertin izole edildiği doğrulandıktan sonra elde edilen insert “Random Prime Labeling” esasına göre işaretlenmiştir.

İşaretleme sonrası hibridizasyon deneyine geçilmeden önce elde işaretlemenin başarısı ve eğer başarılı olunduysa hangi prob derişiminde kullanılan görüntüleme tekniğinde sinyal alınabileceği tayin edilmiştir. Bu amaçla işaretli prob 1/20 ile 1/ 20,000 arasındaki oranlarda

seyreltilmiş, naylon membranlara uygulanmış ve deneylerde kullanılacak NBT-X-fosfat yöntemiyle görüntülenmiştir. Deney sonucu Şekil 3.4.13’de verilmektedir.

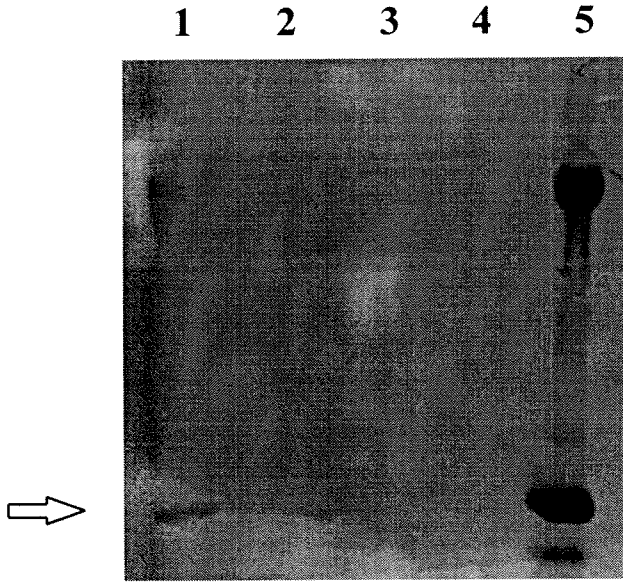


Şekil 3.4.13. İşaretlenen insertün değişik derişimlerde NBT-X-Fosfat yöntemi ile görüntülenmesi.

Şekil 3.4.12 de gösterilen insert “random prime labeling” esasıyla DIG-UTP ile işaretlenmiş ve 1/20 den 1/20000 oranında seyreltikten sonra 1μl naylon membranlar uygulanmış, UV ışık altında (312 nm) fikse edildikten sonra NBT-X-Fosfat yöntemi ile görüntülenmiş ve membranın fotoğrafı alınmıştır. C: Kite bulunan işaretli örnek, P: İşaretli insert. Fotoğrafta A-F bölümleri değişik derişimleri ve seyreltileri göstermektedir. Bu derişimler kontrol için A dan F ye: 1000, 100, 10, 1, 0.1 ve 0.01 pg/μl derişimde işaretli kontrol DNA’yı göstermektedir. Aynı bölümlere kontrol ile aynı derecede seyreltilmiş işaretli prob eklenmiştir.

3.4.4.2. Hibridizasyon Deneyleri

Örnek DNA'ların aktarıldığı naylon membran, *bar* probu ile hibridize edilmiş ve görüntülenmiştir. Elde edilen sonuç Şekil 3.4.13'de verilmektedir. Şekilden de görülebileceği gibi transgenik bitkilerden hazırlanan DNA örneklerinden bazıları hibridizasyon göstermektedir. Kontrol numunelerde herhangi bir hibridizasyon gözlenmemiştir. Bu sonuç *bar* geninin öncül transgenik bitkilerin genomunda bulunduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.4.14. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örneklerinin *bar* probu ile hibridizasyonu

Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örnekleri Pst-I RE ile hidrolize edildikten sonra agaroz jellerde ayrıştırılmış, naylon membranlara aktarılmış ve *bar* probuyla hibridize edildikten sonra NBT-X-Fosfat yöntemi ile görüntülenmiş ve fotoğrafı alınmıştır. Kolon sıralaması: 1. LBA:pDHB ile transform edilen bitkiden izole edilen DNA örneği (30 µg), 2 ve 3. LB5-1:pGK5 ile transform edilen bitkiden izole edilen DNA örneği (30 µg), 4. Kontrol bitkiden izole edilen DNA örneği (50 µg), 5. pDHB321.1 plasmidinin Pst-I RE hidrolizli örneği (10 µg). Ok 560 bp pozisyonunu göstermektedir.

3.4.5. PCR Çalışmaları

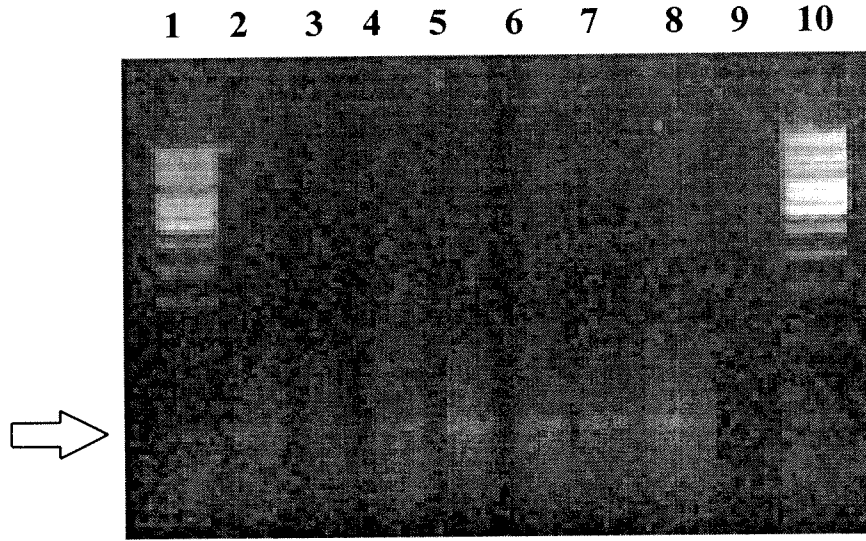
Bu deneylerdeki amaç “Southern Blot” deneylerindeki amacın aynıdır. Yani *bar* geninin öncül transgenik bitkilerin genomlarındaki varlığının doğrulanmasıdır. Ancak deneylerde kullanılan yöntem değişiktir.

PCR deneylerinde *bar* geni için hazırlanmış iki primer kullanılmıştır. Bu primerler transgenik bitkilerden izole edilen ve Pst-I ile hidroliz edilen DNA örneklerinin amplifikasyonunda kullanılmıştır. Kullanılan primerler *bar* genine özgün olduklarından PCR reaksiyonu sonrası *bar* geninin büyüklüğünde (560 bp) elde edilecek DNA parçacıkları bu genin bitki genomundaki varlığını doğrulayacaktır.

Bu deneylerden elde edilen örnek bir sonuç Şekil 3.4.15 de gösterilmektedir ve görüleceği gibi öncül transgenik bitkilerden hazırlanan tüm DNA örnekleri 580 bp civarında bant vermektedir. Bu sonuç, “Southern Blot” deneylerinden elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermekte ve *bar* geninin öncül transgenik bitkilerin genomlarındaki varlığını birkez daha doğrulamaktadır.

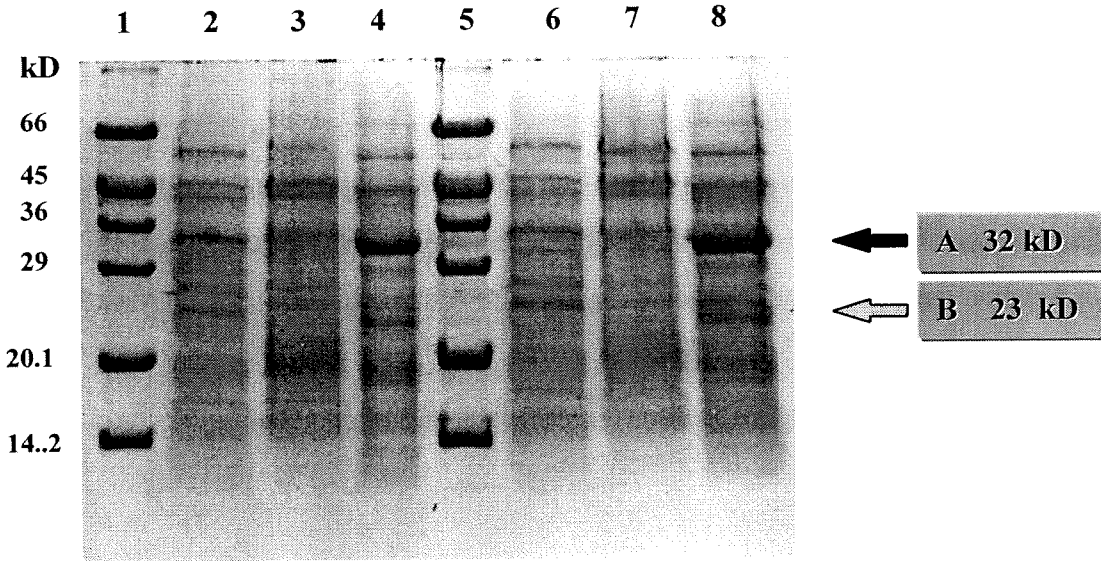
3.4.6. Elektroforez Çalışmaları

Bu çalışmalarda amaç “Southern” ve PCR deneyleri ile öncül transgenik bitkilerin genomlarındaki varlığının doğrulandığı *bar* geninin bu bitkilerde fonksiyonel olarak ifade edilip edilemediğinin protein seviyesinde gösterilmesidir. Şekil 3.4.16 den görülebileceği gibi öncül transgenik bitkiler 21 kilodalton ağırlığındaki PAT enzimini sentezleyebilirken kontrol bitkilerde bu protein gözlenmemektedir (A oku). Buna ek olarak LBA:pGKB5 ile transform edilen bitkiler PAT enziminin yanısıra kanamisin direnci sağlayan neomisin fosfotransferaz-II (NPT-II) enzimini de sentezlemektedirler (B oku). Bu protein beklendiği gibi hem kontrol hem de LBA:pDHB ile transforme edilen bitkilerde gözlenmemektedir.



Şekil 3.4.15. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örneklerinin bar primeri ile amplifikasyonu.

Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan 100 ng genomik DNA örnekleri *bar* genine özgün primerler kullanılarak PCR reaksiyonuyla amplifiye edilmiş ve agaroz jellerde ayrıştırılmıştır. **Kolon sıralaması:** 1 ve 10. 123 bp markör, 2-5. LBA:pDHB ile transform edilen bitkilerden hazırlanan DNA örnekleri, 6-8. LB5-1:pGK5 ile transform edilen bitkilerden hazırlanan DNA örnekleri, 9. Kontrol bitkilerden hazırlanan DNA örnekleri. Ok 560 bp pozisyonundaki amplifikasyonu göstermektedir.



Şekil 3.4.16. Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan protein örneklerinin SDS-PAGE profilleri.

Öncül transgenik ve kontrol bitkilerden izole edilen total çözebilir protein örnekleri poliakrilamid jellerde ayrıştırılmış ve Commasi Brilliant Mavisi ile boyandıktan sonra fotoğrafları alınmıştır. Jellere materyal metod kısmında hazırlanmış detayları verilen örneklerden 20 µl yüklenmiştir (yaklaşık olarak 200 µg protein). **Kolon sıralaması.** 1 ve 5. Sigma moleküler ağırlık markörleri (Yukarıdan aşağı; BSA: 66 kD, Yumurta albümini: 45 kD, Glyseraldehyde 3-fosfat dehidrogenaz: 36 kD, karbonik anhidraz: 29 kD, tripsin inhibitörü: 20.1 kD, α-laktalbumin: 14.2 kD.), 2 ve 6. LBA:pDHB ile transform edilmiş bitkilerin protein örnekleri, 3 ve 7. Kontrol bitkilerin protein örnekleri, 4 ve 8. LB5-1:pGK5 ile transform edilmiş bitkilerin protein örnekleri. A ve B okları sırası ile NPT-II ve PAT enzimlerinin bantlarını göstermektedir.

BÖLÜM 4. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Kasım 1994 tarihinden buyana yürüttüğümüz araştırmalar sonucu, aktif maddesi glufosinat amonyum ve/veya bialaphos olan total herbisitlere dirençli transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Elde edilen transgenik hatlardan LB5-1:pGK5 ile transform edilen bitkiler PPT'nin yanısıra kanamisin antibiyotiğinede direnç göstermektedir.

Bu bölümde elde edilen deneysel sonuçlar tartışılmakta ve gelecekte yapılabilecek çalışmalar özetlenmektedir.

4.1. Transformasyon Seleksiyon ve Rejenerasyon Çalışmaları

Deneyler sonucunda oldukça yüksek sayılabilecek transformasyon frekansları elde edilmiştir. Ortalama değerlerle *Agrobacterium* ile muamele edilen yaprak disklerinin %80'i seçici ajanların (PPT ve/veya kanamisin) varlığında kallus ve gövde oluşturabilmişlerdir. Seleksiyon esnasında kaçakların minimize edilebilmesi amacıyla yüksek dozda (10 µg/ml) PPT kullanılmıştır. Literatürde, benzeri çalışmalarda 1-3 µg/ml PPT'nin transforme olmuş hücrelerin seleksiyonu için yeterli olduğu gösterilmiştir (De Block ve arkadaşları 1987). Monokot bitkilerle yapılan araştırmalarda ise 5-10 µg/ml PPT kullanılabilir (Wilmink ve Dons 1993).

Çalışmalarda, transformasyonu takiben 30 ila 45 günlük bir süreçte rejeneren eden birçok gövde elde edilmiştir. Örneğin, on yaprak diski ile başlanan bir deneyde 45 günlük bir süreçte, 20 ila 30 adet gövde elde edilebilmektedir. Buna ek olarak, bu kültürde oluşan gövdeler kök oluşumları için uygun ortamlara aktarıldıktan sonra, geriye kalan kallus ve küçük gövdecikler alt kültüre alınmak suretiyle elde edilen gövde miktarında arttırılabilmektedir. Bu sayede, 10-20 yaprak diski ile başlanan bir transformasyon deneyinin sonucunda, 2 ila 3 aylık bir süreçte 100'den fazla gövde geliştirilebilmektedir.

Araştırmalarımızda elde ettiğimiz gövdelerin ortalama olarak %70'i seçici ajanların varlığında kök oluşturabilmişlerdir. Köklenme frekansı %50 ile %80 arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Hiğ bir deneyde %50'nin altında bir köklenme oranıyla karşılaşılmamıştır.

Genelde köklenmeyi takiben 30 ila 40 gün sonra bitkiler toprağa alınmışlardır. Projede yürütölen tüm deneyler esnasında en çok problemle karşılaşılan bölüm bu olmuştur. Toprağa alınan bitkilerin geliştirilebilmesi için yeterli altyapı olanaklarına sahip olmadığımızdan, toprağa aldığımız bitkilerin % 60'a yakın bir bölümü kaybedilmiştir.

Özet olarak, elimizdeki mevcut altyapı ve protokoller kullanılarak, ortalama değerlerle, 10 yaprak diski ile başlanan bir transformasyon deneyinde alt költüre gidilmeksizin, 70 ila 90 günlük bir çalışma süreci sonunda 5 ila 8 adet toprakta gelişmekte olan transgenik bitki elde edilebilmektedir ve bu sayı altyapı olanaklarının elverdiği ölçüde arttırılabilmektedir.

4.2. Transgenik Materyalin Analizi

Proje esnasında geliştirilen transgenik bitkiler değişik aşamalarda ve farklı teknikler kullanılarak herbisit dirençleri açısından analiz edilmişlerdir. Tüm deneylerde, *Agrobacterium* muamelesi dışında transgenik bitkilerle aynı şartlara maruz bırakılan kontrol bitkiler kullanılmıştır. Analizler esnasında kullanılan kontrol ve transgenik bitkilerin aynı gelişim aşamalarında olmalarına özen gösterilmiştir.

Yapılan analizler başlıca iki farklı yöntemle dayandırılmıştır. Bu yöntemlerden ilkinde, elde edilen bitkiler herbisit ile direkt olarak muamele edilip gösterdikleri direnç saptanmıştır. İkinci tip analiz yönteminde ise bitkilerin moleküler seviyede incelenmesine gidilmiş ve aktarılan genlerin bitki hücrelerindeki varlığı ve ifadesi analiz edilmiştir

4.2.1. Bitkilerin Herbisit Muamelesine Gösterdikleri Tepkiler

Bu analizler elde edilen bitkiler toprağa alınmadan ve alındıktan sonra yürütülmüştür. Deneylerde bitkiler değişik dozda hazırlanan ®BASTA herbisiti ile muamele edilip gösterdikleri morfolojik tepkiler izlenmiştir. Çalışmalarda üç değişik herbisit dozu kullanılmıştır. Bu dozlar, 0.5, 2 ve 6 gr litrede saf glufosinat amonyum'a tekabül eden %0.25, %1 ve %3 (V/V) ®BASTA preparatlarıdır.

BASTA herbisiti için üretici firma tarafından önerilen kullanım dozu, geniş yapraklı otlar için dekara 300 cc, çok yıllık otlar için ise dekara 750 cc dir. Önerilen kullanım şekli ise, belirtilen miktarın 20-50 litre suda çözülerek iyi bir kaplama sağlayabilecek şekilde atılmasıdır.

Deneylerde herbisit uygulamalarının bu öneriler doğrultusunda gerçekleştirilmesine çalışılmıştır ve kullanılan %1 (V/V) ®BASTA preparatı 300 cc'lik (30 litre de çözüldüğü varsayılırsa) herbisit dozuna eşdeğer gelmektedir. Muameleler esnasında en çok özen gösterilen nokta kontrol ve transgenik bitkilerin aynı miktarda herbisit ile muamele edilmesi olmuştur. Bu nokta kontrol ve transgenik bitkilerde gözlenen morfolojik tepkilerin eşit herbisit doz ve miktarından kaynaklandığının rasyonel olarak değerlendirilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

4.2.1.1. Bitkiler Toprağa Alınmadan Önceki Analizler

İlk aşama analizler kök gelişimini sürdürmekte olan bitki materyali üzerinde yürütülmüştür. Bu amaçla bitkiler toprağa transfer edilmeden önce kavonazların içinde, steril bir fırça yardımı ile belirtilen dozdaki herbisit ile muamele edilmişlerdir.

Kontrol bitkiler kullanılan en düşük herbisit dozunu (% 0.25 V/V) dahi tolere edememektedirler. Uygulamadan 15 ila 20 gün sonra bitkilerin yaprakları tamamen sararmakta ve bitki ölmektedir.

Kontrol bitkilerle mukayese edildiğinde deneyler sonucu elde edilen öncül transgenik bitkilerin %0.25 ve %1 (V/V) ®BASTA uygulamalarından etkilenmedikleri ve normal gelişimlerini devam ettirebildikleri gözlenmiştir. Daha yüksek herbisit derişimlerinde öncül transgenik bitkiler kontrole nazaran daha dirençli hale gelmekteiler ancak gelişimleri yavaşlamaktadır.

Bitkiler toprağa alınmadan önce, bir diğer analiz yöntemi olarak, transgenik ve kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin ölümcül dozda PPT ve/veya kanamisin içeren ortamlardaki kallus ve gövde oluşturabilme potansiyelleri kullanılmıştır. Bu deneylerde herhangi bir seleksiyon yapılmadığında hem transgenik hemde kontrol bitkilerden hazırlanan disklerin gelişim gösterebildikleri gözlenmiştir. Ancak ortamlara seçici ajanlar eklendiğinde kontrol bitkilerdeki gelişme tamamen dururken transgenik bitkilerden hazırlanmış diskler aynı gelişmeyi gösterebilmektedirler. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar transformasyon sonrası elde edilen transgenik bitkilerin herbisite direnç gösterdiğini doğrulamaktadır. Yapılan bu analizlerle doğrulanan bir diğer nokta da deneylerde seleksiyon amaçlı kullanılan PPT ve/veya kanamisin derişimlerinin kaçakları engelleyebildiğidir.

4.2.1.2. Bitkiler Toprağa Alındıktan Sonraki Analizler

Benzeri analizler, bitkiler toprağa transfer edildikten sonra da yürütülmüştür. Bu deneylerde % 0.25 ve % 1'lik herbisit dozları kullanılmış ve bitkilere 30 litre dekara tekabül eden 30 ml herbisit preparatı 1 m² alanda püskürtülmüştür.

Kontrol bitkilerde herbisit muamelesi sonrası doza dayalı bir tepki gözlenmiştir. % 0.25'lik doz 20 ila 25 gün sonunda lethal etki gösterirken, %1'lik doz 9 ila 12 gün sonucunda etkisini göstermektedir. Transgenik bitkiler ise her iki dozdan da etkilenmiyerek gelişimlerini sürdürebilmektedirler.

Bu deneylerde ayrıca birbirini takip eden herbisit uygulamalarının transgenik bitkiler üzerindeki etkilerinin takibide mümkün olmuştur. Bu amaçla % 0.25'lik herbisit

uygulamasından 20 gün sonra aynı bitkiler %1'lik preparatla muamele edilmişlerdir. Daha önce de vurgulandığı gibi transgenik bitkiler bu muamelelerden etkilenmemektedirler. Paralel deneylerde su püskürtülen kontrol ve transgenik bitkiler normal bir gelişimi profili göstermişlerdir.

Bu aşmada herbisit muamelesinin transgenik bitkilerin gelişimi üzerine etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla su ve herbisit ile muamele edilen transgenik bitkilerin muamele sonrası gösterdikleri gelişme takip edilmiştir. Herbisit ile muamele edilen transgenik bitkilerin, su ile muamele edilen transgenik bitkilere oranla 30 günlük bir süreçte daha yavaş geliştiği gözlenmiştir. Ancak daha sonra bitkiler normal gelişimlerini sürdürmektedirler.

4.2.2. Bitkilerin Moleküler Seviyedeki Analizleri

Bu çalışmalarda bitkilere aktarılan genler ve bu genlerin ürünü olan proteinlerin bitkilerdeki varlıkları araştırılmıştır. Bu amaçla herbisit direnci sağlayan *bar* geninin bitki genomlarındaki varlığının analizi amacıyla "Southern Blot" ve PCR deneyleri yürütülmüştür. Bu çalışmalara paralel olarak *bar* geninin ürünü olan PAT enziminin bitkilerdeki varlığı da elektroforez çalışmaları ile teyid edilmeye çalışılmıştır.

4.2.2.1. Southern Blot ve PCR Analizleri

"Southern Blot" çalışmaları iki kez tekrarlanmıştır. 20 µg genomik DNA ile yürütülen ilk denemede (sonuç gösterilmemektedir) blotlarda zayıf bir sinyal gözlenmiş bunun üzerine deney DNA miktarı 30 µg'a çıkartılarak tekrarlanmıştır (raporda sunulan sonuç). Ayrıca deneylerde kontrolde oluşabilecek özgün olmayan hibridizasyonların gözlenebilmesi amacıyla kontrol numuneler için daha yüksek DNA derişimleri (50 µg) kullanılmıştır.

Yapılan bu deneyde de, denenen bitkilerden sadece bir tanesinde *bar* genine tekabül eden belirgin bir sinyal, bir diğesinde ise zayıf bir sinyal gözlenebilmiştir. Bu deneylerde kullanılan bitkiler daha önce herbisit muamelesine maruz bırakılan ve direnç gösteren bitkiler

olduğundan, deney sonuçları jellere yüklenen DNA miktarının yetersiz kalması şeklinde açıklanabilmektedir. Nitekim PCR çalışmalarında aynı DNA numuneleri (200 ng) ve *bar* genine özgün primerler kullanılarak amplifikasyon sağlanabilmiştir.

Bu noktada, *bar* geninin bitki genomundaki varlığı diğer deneysel yöntemlerle de (PCR ve elektroforez çalışmaları) doğrulandığından ve proje kapsamında yeterli süre olmadığından “Southern Blot” deneylerinin tekrarına gidilmemiştir.

4.2.2.2. Elektroforez Çalışmaları

Yapılan elektroforez çalışmalarında aktarılan genlerin (*bar* ve *npt-II*) ilgili transgenik bitkilerde sentezlendiği gözlenmiştir. LBA:pDHB ile transform edilen bitkiler 21 kD ağırlığındaki PAT enzimini sentezleyebilmektedirler. LB5-1:pGK5 ile transforme edilen bitkiler ise beklendiği gibi PAT enziminin yanısıra yaklaşık 32 kD ağırlığındaki (Fuchs ve arkadaşları 1993) NPT-II enzimini de sentezleyebilmektedirler.

Elde edilen bu sonuçlar aktarılan genlerin bitki genomuna integre olduğunu ve fonksiyonel olarak ifade edildiğini göstermektedir.

Özet olarak, yapılan analizler bir bütün olarak ele alındığında transformasyon deneyleri sonucu elde edilen bitkilerin *bar* genini taşıdıkları, ifade edebildikleri ve bu sayede de herbisit direnci gösterebildikleri saptanmıştır.

4.3. İleriye Dönük Araştırma Önerileri

İlk etapta yapılması gereken çalışma elde edilen transgenik hatlardan F1 generasyonunun eldesidir. Elde edilecek bu tohumlarda aktarılan genlerin açılımlarının çalışılması gerekmektedir.

Ayrıca, ilk analizler sonucu herbisite direnç gösterdiği saptanan F1 hatları geliştirilmeli ve elde edilecek bitkilerin herbisite gösterdikleri direnç seviyeleri saptanmalıdır. Yüksek direnç gösteren bitkilerden ise F2 generasyon bitkiler elde edilerek arazi denemelerine tabi tutulmalıdır.

Halen konu ile ilgili olarak yüksek lisans öğrencimiz Yalım Soyer “Genetic Manipulation of Tobacco Plants Against Herbicide Resistance” başlıklı tez çalışmalarını yürütmektedir. Bu çalışmalarda, zamanın elverdiği süre içerisinde bu öğrencinin F1 hatlarının eldesi ve analizi çalışmalarını yürütmesi planlanmaktadır. Bu aşmaktan sonra yapılması öngörülen çalışmaların yürütülebilmesi içinde eldeki mevcut altyapı olanaklarının elverdiği ölçüde gayret sarfedilecektir. Ayrıca laboratuvarlarımızda halen domates, patates ve mercimek bitkileri üzerinde benzeri transformatasyon çalışmaları yürütülmekte ve bu yönde bir doktora ve iki yüksek lisans öğrencisi tez çalışmalarını sürdürmektedirler.

4.4. Sonuç

Raporun hazırlandığı Kasım-Aralık 1996 tarihi itibarıyla halen altı adet yaklaşık dört aylık transgenik hat laboratuvar koşullarında gelişimlerini devam ettirmektedirler. Ayrıca oluşturduğumuz alt kültürlerde gelişen birçok gövde kök oluşumları için ilgili ortamlara alınma aşamasındadırlar. Buna ek olarak yaklaşık 20 ila 30 adet bitki öncül transgenik bitki ise kök gelişimlerini tamamlamış ve/veya sürdürmektedirler. Bu bitkiler toprağa alınma aşamasına gelmişlerdir.

Sonuç olarak, proje kapsamında yürüttüğümüz araştırmalar sonucu, projede önerdiğimiz “**Herbisit Dirençli Transgenik Tütün Bitkilerin Geliştirilmesi**” gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Alijah R., Dorendorf J., Talay S., Pühler A., Wohlleben W., Genetic Analysis of the Phosphinothricin Tripeptide Biosynthetic Pathway of *Streptomyces viridochromogenes* Tü494, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 34, 749-755, (1991).
- Bechtold N., Ellis J., Pelletier G., In Planta *Agrobacterium* Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants, *Life Sciences*, 316, 1-5, (1993).
- Bedbrook J., Chaleff R.S., Falco S.C., Mazur B., Yadav N., Nucleic Acid Fragment Encoding Herbicide Resistant Plant Acetolactate Synthase, *Eur. Patent Appl.*, 0257993, (1988).
- Botterman J., Gosselé V., Thoen C., Lauwereys M., Characterization of Phosphinothricin Acetyltransferase and C-Terminal Enzymatically Active Fusion Proteins, *Gene*, 102, 33-37, (1991).
- Botterman J., Leemans J., Engineering Herbicide Resistance in Plants, *Trends in Genetics*, 4, 219-222, (1988).
- Boehringer Mannheim GmbH, Detection of DIG-Labelled Nucleic acids in *The DIG Systems User's Guide for Filter Hybridization*. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim, (1993), p:49-54.
- Brandle J.E., Miki B.L., Agronomic Performance of Sulfonylurea-Resistant Flue-Cured Tobacco Grown under Field Conditions, *Crop Science*, 33, 847-852, (1993).
- Brandle J.E., Morrison M.J., Hattori J., Miki B.L., A Comparison of Two Genes of Sulfonylurea Herbicide Resistance in Transgenic Tobacco Seedlings, *Crop Science*, 34, 226-229, (1994).
- Cabello P., De La Haba P., Maldonado J.M., Properties of Glutamine Synthetase Isoforms Isolated from Sunflower Leaves, *J. Plant Physiol.*, 144, 1-6, (1994).
- Cao J., Dyan X., McElroy D., Wu R., Regeneration of Herbicide Resistant Transgenic Rice Plants Following Microprojectile-Mediated Transformation of Suspension Culture Cells, *Plant Cell Rep.*, 11, 586-591, (1992).
- Chamberlain D.A., Brettell R.I.S., Last D.I., Witrzens B., McElroy D., Dolferus R., Dennis E.S., The Use of The Emu Promoter with Antibiotic and Herbicide Resistance Genes for the Selection of Transgenic Wheat Callus and Rice Plants, *Australian Journal of Plant Physiology*, 21, 95-112, (1994).

Cheung A.G., Bogorad L., Van Montagu M., Schell J., Relocating a Gene for Herbicide Tolerance: A Chloroplast Gene is Converted into a Nuclear Gene, *Proceedings of National Academy Sciences*, 85, 391-395, (1988).

Christensen A.H., Sharrock R.A., Quail P.H., Maize Polyubiquitin Genes: Structure, Thermal Perturbation of Expression and Transcript Splicing and Promoter Activity Following Transfer to Protoplasts by Electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18, 675-689, (1992).

Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M., Expression in Plants of a Mutant *aroA* Gene from *Salmonella typhimurium* Confers Tolerance to Glyphosate, *Nature*, 317, 741-744, (1985).

Cornejo M. J., Luth D., Blankenship K.M., Anderson O.D., Blechl A.N., Activity of a Maize Ubiquitin Promoter in Transgenic Rice, *Plant Molecular Biology*, 23, 567-581, (1993).

Damerval C., Vienne D., Zivy M. and Thiellement H. Technical improvements in two dimensional electrophoresis increases the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54, (1986).

Datta S.K., Peterhans A., Potrykus U., Genetically Engineered Fertile India-Rice Recovered from Protoplasts, *Bio/Technology*, 8, 736-740, (1990).

D'Halluin K., Botterman J., De Greef W., Engineering of Herbicide-Resistant Alfalfa and Evaluation under Field Conditions, *Crop Science*, 30, 866-871, (1990).

De Block M., Botterman J., Vandewiele M., J., Thoen C., Gosselé V., Thompson C, Van Montagu M., Leemans J., Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme, *EMBO Journal*, 6, 2513-2518, (1987).

De Block M., De Brouwer D., Tenning P., Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* Using *Agrobacterium tumefaciens* and the Expression of the *bar* and *neo* Genes in the Transgenic Plants, *Plant Physiology*, 91, 694-701, (1989).

De Greef W., Delon R., De Block M., Leemans J., Botterman J., Evaluation of Herbicide Resistance in Transgenic Crops Under Field Conditions, *Bio/Technology*, 7, 61-64, (1989).

Della-Cioppa G., Bauer S.C., Taylor M.L., Rochester D.E., Klein B.K., Targeting a Herbicide Resistant Enzyme from *Escherichia coli* to Chloroplasts of Higher Plants, *Bio/Technology*, 5, 579-584, (1987).

Downs C.G., Borst W.M., Hurst P.L., Stevenson D.G., Isoforms of Glutamine Synthetase in Asparagus Spears: the Cytosolic Enzyme Increases After Harvest, *Plant, Cell and Environment*, 17, 1045-1052, (1994).

Downs C.G., Christey M.C., Davies K.M., King G.A., Seelye J.F., Sinclair B.K., Stevenson D.G., Hairy Roots of *Brassica napus*: II. Glutamine Synthetase Overexpression Alters Ammonia Assimilation and the Response to Phosphinothricin, *Plant Cell Reports*, 14, 41-46, (1994).

Doyle J.J. ve Doyle J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15, (1990).

Eckes P., Schmitt P., Daub W., Wengenmayer F., Overproduction of Alfalfa Glutamine Synthetase in Transgenic Tobacco Plants, *Molecular General Genetics*, 217, 263-268, (1989).

Filho E.S.F., Figueiredo L.F.A., Neshich D.C.M., Transformation of Potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantigueira Using *Agrobacterium tumefaciens* and Evaluation of Herbicide Resistance, *Plant Cell Reports*, 13, 666-670, (1994).

Fromm M.E., Morris F., Armatrong C., Williams R., Thomas J., Klein T.M., Inheritance and Expression of Chimeric Genes in The Progeny of Transgenic Maize Plants, *Bio/Technology*, 8, 833-839, (1990).

Fuchs R.L., Heeren R.A., Gustafson M.E., Rogan G.J., Bartnicki D.E., Leimgruber R.M., Finn R.F., Hershman A., Berberich S. Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPT II) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Bio/Technology*, 11, 1537-1542, (1993).

Gambor, O., Miller, R. and Ojima, K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50, 151-159, (1968).

Gordon-Kamm W.J., Spencer T. M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Willets N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.V., Kausch A.P., Lemaux P.G., Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants, *The Plant Cell*, 2, 603-618, (1990).

Grant J.E., Cooper P.A., Mcara A.E., Frew T.J., Transformation of Peas (*Pisum sativum* L.) Using Immature Cotyledons, *Plant Cell Reports*, 15, 254-258, (1995).

Guilley H., Dudley H.K., Jonard D., Balazs E., Richards K.E., Transcription of Cauliflower Mosaic Virus DNA: Detection of Promoter Sequences and Characterization of Transcripts, *Cell*, 30, 763-773, (1982).

Halfter U., Morris P.C., Willmitzer L., Gene Targeting in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular General Genetics*, 231, 186-193, (1992).

Hall R.D., R-Bruinsma T., Weyens G., Rosquin I.J., Denys P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefévre M.P., Dunwell J.M., van Tunen A., Krens F.A., A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnology*, 14, 1133-1138, (1996).

Hamill J.D., Rounsley S., Spencer A., Todd G., Rhodes M.J.C. The use of polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Reports*, 10, 221-224, (1991)

Hara O., Murakami T., Imai S., Anzai H., Itoh R., Kumada Y., Takano E., Satoh E., Nagaoka K., Thompson C., The Bialaphos Biosynthetic Genes of *Streptomyces viridochromogenes*: Cloning, Heterospecific Expression, and Comparison with the Genes of *Streptomyces hygroscopicus*, *Journal of General Microbiology*, 137, 351-359, (1991).

Haughn G.W., Smith J., Mazur B., Somerville C., Transformation with a Mutant *Arabidopsis* Acetolactate Synthase Gene Renders Tobacco Resistant to Sulfonylurea Herbicides, *Molecular General Genetics*, 211, 266-271, (1988).

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Farley R.T., A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, 1229-1231, (1985).

Hoyle R., Herbicide-Resistant Crops are No Conspiracy, *Bio/Technology*, 11, 783-784, (1993).

Inoue H., Hiroshi N., Okayama H., High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids, *Gene*, 96, 23-28, (1990).

Karuppiah, N., Kaufman, P. Rapid and Inexpensive Micro-electroelution of Nucleic Acid and Protein from Agarose and Polyacrylamide Gels. *BioTechniques*, 9, 368, (1991).

Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-85, (1975).

Last D.I., Brettel R.I.S., Chamberlain D.A., Chaudhury A.M., Larkin P.J., Marsh E.L., Peacock W.J., Dennis E.S., pEmu: an Improved Promoter for Gene Expression in Cereal Cells, *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 581-588, (1991).

Lee L., Laramore C.L., Day P.R., Tümer N.E., Transformation and Regeneration of Creeping Bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) Protoplasts, *Crop Science*, 36, 401-406, (1996).

Lee M., Villemur R., Hussey P.J., Silflow C.D., Gant J.S., Snustad D.P., Differential Expression of Six Glutamine Synthetase Genes in *Zea mays*, *Plant Molecular Biology*, 23, 401-407, (1993).

Longstaff M., Newell C.A., Boonstra B., Porter A.J.R., Learmonth D., Hamilton W.D.O., The production and analysis of transgenic plants expressing anti-herbicide single chain antibody fragments. *Symposium of Engineering Crops for Industrial End Uses*, 16-18 Eylül, ICAR-Long Ashton Research Station Bristol, İngiltere, Poster Abstracts, (1996).

Lyon B.R., Llewellyn D.J., Huppertz J.L., Dennis E.S., Peacock W.J., Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Biol.*, 13, 533-540, (1989).

Lyon B.R., Cousins Y.L., Llewellyn D.J., Dennis E.S., Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Transgenic Res.*, 2, 162-169, (1993).

Mack G., Tischner R., Activity of the Tetramer and Octamer of Glutamine Synthetase Isoforms During Primary Leaf Ontogeny of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.), *Planta*, 194, 553-559, (1994).

Mazur B. J. and Falco S.C., The Development of Herbicide Resistant Crops. *Ann.Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 40, 441-470, 1989.

McNelly S.F., Hirel B., Gadai P., Mann A.F., Stewart G.R., Glutamine Synthetases of Higher Plants, *Plant Physiology*, 227, 97-107, (1983).

Mukopadhyay A., Töpfer R., Pradhan A.K., Steinbiss H.H., Schell J., Pental D., Efficient Regeneration of *Brassica oleracea* Hypocotyl Protoplasts and High Frequency Genetic Transformation by Direct DNA Uptake, *Plant Cell Reports*, 10, 375-379, (1991).

Murakimi T., Anzai H., Imai S., Satoh A., Nagaoka K., Thompson C.J., The Bialaphos Biosynthetic Genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular Cloning and Characterization of the Gene Cluster, *Molecular General Genetics*, 205, 42-50, (1986).

Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15, 473-497, (1962).

Newhouse K., Singh B., Shaner D., Stidham M., Mutations in Corn (*Zea mays* L.) Conferring Resistance to Imidazolinone Herbicides, *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 65-70, (1991).

OECD, Field Releases of Transgenic Plants, 1986-1992 An Analysis. OECD, Paris. (1993).

Odell J.T., Nagy F., Chua N.H., Identification of DNA Sequences Required for Activity of The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter, *Nature*, 313, 810-812, (1985).

Öktem, H.A., Özkan, F., Özalp, V.C., Yücel, M., *Agrobacterium* mediated gene transfer in tobacco. Doğa Botanik Dergisi 18: 397-405, (1994).

Özer Z., Niçin Yabancı Ot Bilimi (Herboloji)?, Türkiye I. Herboloji Kongresi, 3-5 Şubat Adana, Bildiriler, 1-7, (1993).

Pearson J., Ji Y.M., Seasonal Variation of Glutamine Synthetase Isoforms in Temperate Deciduous Trees Strongly Suggests Different Functions for the Enzymes, *Plant, Cell and Environment*, 17, 1331-1337, (1994).

Rathore K.S., Chowdhury V.K., Hodges T.K., Use of *Bar* as a Selectable Marker Gene and for the Production of Herbicide-Resistant Rice Plants from Protoplasts, *Plant Molecular Biology*, 21, 871-884, (1993).

Shackelford N.J., Chlan C.A., Identification of Antibiotics That Are Effective in Eliminating *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Molecular Biology Reporter*, 14, 50-57, (1996).

Shah D.M., Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winter J.A., Tümer N.E., Hironaka C.M., Sanders P.R., Aykent S., Gasser C.S., Siegel N.R., Rogers S.G., Fraley R.T., Engineering Herbicide Tolerance in Transgenic Plants, *Science*, 233, 478-481, (1986).

Shin D.I., Podila G.K., Huang Y., Karnosky D.F., Transgenic Larch Expressing Genes for Herbicide and Insect Resistance, *Can. j. For Res.*, 24, 2059-2067, (1994).

- Smeda R.J., Hasegava P.M., Goldsbrough P.B., Singh N.K., Weller S.C., A Serine-to-Threonine Substitution in the Triazine Herbicide-Binding Protein in Potato Cells Results in Atrazine Resistance without Impairing Productivity, *Plant Physiol.*, 103, 911-917, (1993).
- Somers D.A., Rines H.W., Gu W., Kaepler H.F., Bushnell W.R., Fertile Transgenic Oat Plants, *Bio/Technology*, 10, 1589-1594, (1992).
- Spencer T.M., Gordon-Kamm W.J., Daines R.J., Start W.G., Lemaux P.G., Bialaphos Selection of Stable Transformants from Maize Cell Culture, *Theoretical and Applied Genetics*, 79, 625-631, (1990).
- Spencer T.M., O'Brien J.V., Start W.G., Adams T.R., Gordon-Kamm W.J., Lemaux P.G., Segregation of Transgenes in Maize, *Plant Molecular Biology*, 18, 201-210, (1992).
- Stalker D.M., McBride K.E., Malyj L.D., Herbicide Resistance in Transgenic Plants Expressing a Bacterial Detoxification Gene, *Science*, 242, 419-422, (1988).
- Strauch E., Wohlleben W., Pühler A., Cloning of a Phosphinothricin-*N*-acetyltransferase Gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its Expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*, *Gene*, 63, 65-74, (1988).
- Streber W.R., Willmitzer L., Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology*, 7, 811-815, (1989).
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu Z., Accumulation of Ammonia in Plants Treated with Bialaphos, *J. Pesticide Sci.*, 11, 33-37, (1986).
- Thompson C., Movva N.R., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M., Botterman J., Characterization of Herbicide Resistant Gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*, *EMBO J.*, 6, 2519-2523, (1987).
- Tingey S.V., Walker E., Coruzzi G.M., Glutamine Synthetase Genes of Pea Encode Distinct Polypeptides which are Differentially Expressed in Leaves, Roots and Nodules, *EMBO Journal*, 6, 1-9, (1987).
- Toki S., Takamatsu S., Nojiri C., Ooba S., Anzai S., Iwata M., Christensen A., Uchiama H., Expression of a Maize Ubiquitin Gene Promoter-*Bar* Chimeric Gene in Transgenic Rice Plants, *Plant Physiology*, 100, 1503-1507, (1992).

Van Der Hoeven C., Dietz A., Landsmann J., Expression of Phosphinothricin Acetyltransferase from the Root Specific Par Promoter in Transgenic Tobacco Plants is Sufficient for Herbicide Tolerance, *Plant Cell Reports*, 14, 165-170, (1994).

Van Haute E., Joss H., Maes M., Warren G., Van Montagu M., Schell J., Intergenic Transfer and Exchange Recombination of Restriction Fragments Cloned in pBR322: A Novel Strategy for Reverse Genetics of *Agrobacterium tumefaciens*, *EMBO Journal*, 2, 411-417, (1983).

Vasil V., Brown S.M., Re D., Fromm M.E., Vasil I.K., Stably Transformed Callus Lines from Microprojectile Bombardment of Cell Suspension Cultures of Wheat, *Bio/Technology*, 9, 743-747, (1991).

Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K., Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus, *Bio/Technology*, 10, 667-674, (1992).

Vasil V., Srivastava V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K., Rapid Production of Transgenic Wheat Plants by Direct Bombardment of Cultured Immature Embryos, *Bio/Technology*, 11, 1553-1558, (1993).

Vinnemeier J., Pistorius E.K., Broer I., Purification and Partial Characterization of the *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 Phosphinothricin-*N*-acetyltransferase Mediating Resistance to the Herbicide Phosphinothricin in Transgenic Plants, *Z. Naturforsch*, 50c, 796-805, (1995).

Wan Y., Lemaux P.G., Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants, *Plant Physiology*, 104, 37-48, (1994).

Wehrmann A., Vilet A.V., Opsomer C., Botterman J., Schulz A. The similarities of bar and pat products make them equally applicable for plant engineers, *Nature Biotech.*, 14, 1274-1278, (1996).

Wholleben W., Arnold W., Broer I., Hilleman D., Strauch A., Pühler A., Nucleotide Sequence of Phosphinothricin-*N*-acetyltransferase Gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its Expression in *Nicotiana tabacum*, *Gene*, 70, 25-37, (1988).

Wilmink A. ve Dons J.J.M., Selective agents and marker genes for use in transformation of Monocotyledonous plants, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 11, 165-185, (1993).

Yamazaki M., Lin S., Hayashi T., Morita N., Asamizu T., Mourakoshi I., Saito K., Transgenic Fertile *Scoparia dulcis* . a Folk Medical Plant, Conferred with a Herbicide-Resistant Trait Using a Ri Binary Vector, *Plant Cell Reports*, 15, 317-321, (1996).

Yanai K., Yonekura K., Usami H., Hirayama M., Kajiwara S., Yamazaki M., Shishido K., Adachi T., The Integrative Transformation of *Pleurotus ostreatus* Using Bialaphos Resistance as a Dominant Selectable Marker, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 472-475, (1996).

Zuker A., Chang P.F.L., Ahroni A., Cheah K., Woodson W.R., Bressan R.A., Watad A.A., Hasegava P.M., Vainstein A., Transformation of Carnation by Microprojectile Bombardment, *Scientia Horticulturae*, 64, 177-185, (1995).

EKLER

EK.1: pDHB321.1 ve pGKB5 plasmidleri için alınan kullanım izini

AGREEMENT

Laboratoire de Biologie Cellulaire
INRA-Centre de Versailles
F-78026 Versailles Cédex
France

I agree to the following conditions under which a sample of: $\left(\begin{array}{l} \text{pGKB5} \\ \text{pDHB321.1} \end{array} \right)$ (u 250 ng)
+ CSSC1 (pMP90)

will be supplied to me by DAVID BOULCHEZ from the
Laboratoire de Biologie Cellulaire.

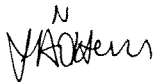
I state that that the above mentioned material(s) will exclusively and restrictedly be used in my laboratory under suitable containment conditions, and will not be used on human subjects.
I state that no patent will be taken or commercial use made of the above mentioned material(s), as well as of any strain or plasmid constructed using sequences derived from the above material(s), without explicit permission of the I. N. R. A. This agreement does not constitute such permission.
I confirm that the material(s) will not be supplied to other laboratories within or outside of my institution.

Additional conditions :

Requestor: DR. HÜSEYİN AVNI ÖKTEM

Function: ASSOC. PROF.

Address: BIOLOGY DEPT., M.E.T.U.
06531 ANKARA

Signature: 

Date :

Proposed use(s) of the material(s) provided :

Agrobacterium mediated transformation studies in tobacco.

In addition, we would appreciate being informed of any use of the supplied material for purposes other than those described above.

EK 2: Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

SOB: Bacto trypton %2, maya eksteresi %0.5, NaCl 10 mM 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄.

SOC: 20 mM gulukoz eklenmiş SOB çözeltisi.

STE: 0.1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA (pH 8.0)

SSC: 175.3 g NaCl, 88.2 g sodyum citrat (pH 7.0)

TAE: 0.1 M Tris, 125mM sodium asetat, 10mMEDTA (pH: 8.1)

TB: 10 mM HEPES, 55 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM Kcl (pH 6.7)

TBE: 0.09 M Tris-Borate, 1 mM EDTA (pH 8)

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH:7.4 or 8)

EK 3: SDS-PAGE Deneylerinde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

A. Stacking Jel Çözeltisi (%4):		1 ml için:
Akrilamid	130 µl	(%30 Akrilamid ve % 2.67 N-N methilen bis-Akrilamid)
dH ₂ O	0.6 ml	
Stacking buffer	0.25 ml	(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
SDS (%10)	10 µl	
APS (%10)	5 µl	
TEMED	1 µl	
B. Seperating Jel Çözeltisi:	10 ml için:	
Akrilamid	4 ml	(%30 Akrilamid ve % 2.67 N-N methilen bis-Akrilamid)
dH ₂ O	3.34 ml	
Seperating buffer	2.5 ml	
(1.5 M Tris-HCl; pH 8.8)		
SDS (%10)	0.1 ml	
APS (%10)	50 µl	
TEMED	5 µl	

C. SDS Örnek Tamponu: 8 ml için:
dH₂O 3.8 ml
0.5 M Tris-HCl 1.0 ml pH 6.8
Gliserol 0.8 ml
SDS (%10) 1.6 ml
 β -Merkaptoetanol 0.4 ml
Bromfenol mavisi 0.4 ml
(%0.05 w/v suda)

D. Elektroforez tamponu:
25 mM Tris pH 8.3
192 mM glisin
%1 SDS

E. Jel Boyama Çözeltisi: (1 litre için)
Coomassie mavisi R250 2.5 g
%95 Etanol 500 ml
Glacial Asetik Asit 100 ml
H₂O 400 ml

F. Destaining Çözeltisi: (1 litre için)
%95 Etanol 240 ml
Glacial Asetik Asit 100 ml
H₂O 660 ml

LİYOĞRAFİK BİLGİ FORMU

Proje No: TBAG-1262

2-Rapor Tarihi: 1996 Kasım

Rapor Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.10.1994 -31 10. 1996

Projenin Adı:

Herbisitlere Dirençli Transgenik Tütün Bitkilerinin Biyoteknolojik Yöntemler İle Geliştirilmesi

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Doç. Dr. Hüseyin Avni Öktem, Prof. Dr. Meral Yücel, Dr. Maki, Füsün İnci, Meltem Mavituna, Yalım Soyer, Metin Bilgin

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyoloji Bölümü 06531 ANKARA

Destekleyen Kuruluş(lar) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Atatürk Bulvarı No: 221, 06100 Kavaklıdere, Ankara

Özet (Abstract)

Projelede aktif maddesi glufosinat amonyum veya fosfinitricin (PPT) olan herbisitlere direnç gösteren transgenik tütün (*Nicotiana tabacum*, Samsun) bitkilerinin geliştirilmesi yönünde araştırmalar yürütülmüştür. Amaçla, glufosinat amonyumu asetilasyon yoluyla detoksifiye edebilen bir enzim olan fosfinitricin N-1 transferaz'ın (PAT) sentezinden sorumlu olan *bar* geni tütün bitkilerine aktarılmıştır. Araştırmalarda T-A bölgelerinde CaMV35S promotör ve ocs terminatör bölgelerinin kontrolü altındaki *bar* genini taşıyan IB321.1 ve pGKB5 binary vektörleri kullanılmıştır. Saf durumda elde edilen bu vektörler önce DMSO emi ile hazırlanan kompetan *E.Coli* HB101 suşlarına, daha sonrada "triparental mating" yöntemi ile *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşlarına mobilize edilmişlerdir. Gen transferi "yaprak diski transformasyonu" yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki vektör ile yapılan transformasyon deneylerinin sonucunda, kontrol bitkiler için lethal olan 10 mg/l PPT derişiminde kallus, gövde ve kök oluşumları gözlenmiştir. Bu oluşumları engelleyen öncül transgenik bitkiler kültür koşullarında 0.5, 2 ve 6 gr/l glufosinat amonyum içeren %0.25, ve %3 (V/V) [®]BASTA herbisit uygulamalarına direnç göstermiştir. Elde edilen öncül transgenik bitkiler tohum alındıktan sonra uygulanan %0.25 ve %1 (V/V) [®]BASTA herbisiti uygulamalarından da etkilenmemektedir. Aynı şartlarda geliştirilen ve % 0.25 ve %1 (V/V) [®]BASTA ile muamele edilen kontrol bitkilerin, muameleden 15 ila 20 gün sonra öldükleri gözlenmiştir. Toprakta gelişmekte olan transgenik bitkilerde yapılan Southern Blot ve PCR analizleri *bar* geninin bitki genomuna integre olduğunu göstermektedir. Protein seviyesinde yapılan çalışmalarda da transgenik bitkilerin kontrol bitkilerde bulunmayan 21 kD ağırlığındaki PAT enzimini sentezledikleri gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Herbisit direnci, Tütün, *Agrobacterium*, *bar*, PPT

Proje ile ilgili Yayın

Öktem, H.A., Soyer Y., Setenci F., Yücel M., "Herbisitlere dirençli transgenik tütün bitkilerinin geliştirilmesi" Anadolu, Ege Tarımsal Enstitüsü Araştırma Dergisi, Basılıyor, 1997.

Öktem H.A., Soyer Y., Setenci F., Yücel M., "Herbisitlere Dirençli Transgenik Tütün Bitkilerinin Biyoteknolojik Yöntemler İle Geliştirilmesi", Türkiye II. Herboloji Kongresi, 1-4 Eylül 1997, İzmir, Bildiri Kitabı ile Sunulmak Üzere Kabul Edildi.

Öktem, H.A., Soyer Y., Setenci F., Yücel M., "Development of PPT Resistant Tobacco", 8th European Congress on Biotechnology, 17-21 Ağustos, 1997, Budapeşte, Macaristan. Poster Olarak Sunulacak.

Bilim Dalı

Doçentlik B. Dalı Kodu: 401.03.02

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu: 401.01.05

Dağıtım (*):

 Sınırlı Sınırsız

Raporun Gizlilik Durumu:

 Gizli Gizli Değil

*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz.