



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MODEL BİTKİLERDE TRANSGEN ANLATIMININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ayşe Feyza TUFAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Doç.Dr. Filiz GÜREL

Haziran, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MODEL BİTKİLERDE TRANSGEN ANLATIMININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ayşe Feyza TUFAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Doç.Dr. Filiz GÜREL

Haziran, 2010

İSTANBUL

Bu alışma 23/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Filiz GÜREL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Hakan BERMEK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 4115 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle, tez çalışmam boyunca desteğini her zaman hissettiğim, bana yol gösteren, örnek aldığım değerli danışmanım Doç. Dr. Filiz GÜREL'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlilerine ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sevgili anneme, ağabeylerim Fatih, Tarık ve ikiz kardeşim Faruk TUFAN'a her zaman yanımda oldukları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Haziran, 2010

Ayşe Feyza TUFAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. BİYOTEKNOLOJİK ÇALIŞMALARDA “MODEL BİTKİLER”	3
2.1.1. Arpa.....	3
2.1.2. Tütün	5
2.2. TRANSGEN ANLATIMININ BELİRLENMESİ	6
2.2.1. Haberci (Raportör) Genler.....	6
2.2.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	8
2.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI	9
3. MALZEME VE YÖNTEM	13
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	13
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI.....	13
3.2.1. Arpa Embriyo Kültürünün Kurulması.....	14
3.2.2. Tütün Bitkisinin Yetiştirilmesi ve Eksplantların Çıkartılması	15
3.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI	15
3.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Irkları ve Plazmidler	15
3.3.2. Arpa Bitkisine Gen Aktarımı	16
3.3.3. Tütün Bitkisine Gen Aktarımı	17
3.4. GUS GEN ANLATIMININ HİSTOKİMYASAL ANALİZİ.....	17

3.5. TRANSGEN ANLATIMININ TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR) İLE BELİRLENMESİ	18
3.5.1 Bitki Yapraklarından Total RNA İzolasyonu.....	18
3.5.2. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	18
3.5.3. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	19
3.5.4. Agaroz Jel Elektrophorezi.....	19
4. BULGULAR	21
4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI	21
4.1.1. Arpa Dokularına Gen Aktarımı.....	21
4.1.2. Tütüne Gen Aktarımı.....	22
4.2. TRANSGEN ANLATIMI ANALİZLERİ.....	23
4.2.1. Histokimyasal Analizler.....	23
4.2.1.1. Arpada Yapılan Histokimyasal Analizler	23
4.2.1.2. Tütünde Yapılan Histokimyasal Analizler.....	26
4.2.2. Moleküler Analizler	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	:5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glukuronid (X-gluc)'in GUS geninin anlatım yaptığı hücrelerde -glukuronidaz enzimi ile etkileşime girerek ClBr-indigo maddesini açığa çıkartması.....	7
Şekil 2.2	:Tek aşamalı RT-PZR'nin temeli	8
Şekil 2.3	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla transformasyonda gerçekleşen temel moleküler olaylar	10
Şekil 2.4	:Asetosiringon (C ₁₀ H ₁₂ O ₄)'un kimyasal formülü	12
Şekil 3.1	:Arpa bitkisinin <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla transformasyonu	16
Şekil 3.2	:Agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1kb'lik DNA ladder	20
Şekil 4.1	:Tokak 157/37 ve Golden promise çeşitlerine ait 30 günlük bitkilerin seçici besiyerindeki görünüşleri.....	21
Şekil 4.2	:Beş haftalık tütün bitkilerinin MS besiyerindeki görünüşleri; Eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkiler.....	22
Şekil 4.3	:Transforme edilen yaprak disklerinin seçici besiyerindeki görünüşleri	22
Şekil 4.4	:Transforme edilen gövde eksplantlarının seçici besiyerindeki görünüşleri	23
Şekil 4.5	:Arpa Tokak 157/37 çeşidinin farklı <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ırklarıyla transformasyonundan sonra bitkiciklerde mavi boyanan bölgelerin görünüşü	24
Şekil 4.6	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL-1 ve EHA105 ırklarıyla transforme edilen Tokak 157/37 çeşidinde gözlenen GUS aktivitesi	24
Şekil 4.7	:Tokak 157/37 çeşidine AGL-1 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri	25
Şekil 4.8	:Tokak 157/37 çeşidine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri	25
Şekil 4.9	:Tütün bitkisine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri	26
Şekil 4.10	:Golden promise çeşidi kontrol bitkisinden ve transforme edilen bitkilerden izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.	27
Şekil 4.11	:Golden promise çeşidine ait RNA'ların RT-PZR'si sonrasında çoğaltılan genlerin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.....	27
Şekil 4.12	:Tokak 157/37 çeşidi kontrol bitkisinden ve transforme edilen bitkilerden izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri	28
Şekil 4.13	:Tokak 157/37 çeşidine ait RNA'ların RT-PZR'si sonrasında çoğaltılan genlerin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.	28

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	:Arpanın taksonomisi.....	3
Tablo 2.2	:Tütünün taksonomisi	5
Tablo 2.3	:Arpanın farklı genotiplerinde yapılan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla transformasyon çalışmaları ve sonuçları	11
Tablo 3.1	:Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri.....	14
Tablo 3.2	:Çalışmada kullanılan <i>A. tumefaciens</i> ırkları ve özellikleri.....	15
Tablo 3.3	:GUS boyama çözeltisinin içeriği.....	17
Tablo 3.4	:RT-PZR’de kullanılan primerler ve nükleotid dizileri	19
Tablo 3.5	:Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tamponlar....	20
Tablo 4.1	:Golden promise ve Tokak 157/37 çeşitlerine ait sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler ile 30 gün sonunda canlı kalan bitkilerin sayısı	21
Tablo 4.2	:Gen aktarımı yapılan tütün eksplantlarının seçici besiyerindeki durumları	23

SEMBOL LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrad Derece
AMV	: Avian Myeloblastoma Virüs
BAP	: 6-Benzilaminopürin
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
cm	: Santimetre
DEPC	: Dietil Pirokarbonat
DNaz	: Deoksiribonükleaz
EST	: Anlatım Dizi Etiketi
g	: Gram
GUS	: β-glukuronidaz
kb	: Kilobaz
l	: Litre
LB	: Luria-Bertani
MES	: 2-(N-Morfolino)etansülfonik Asit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmHg	: Milimetre Cıva
MMLV	: Moloney Murine Leukemia Virüs
MS	: Murashige ve Skoog
N	: Normal
NAA	: Naftelen Asetik Asit
nm	: Nanometre
NPT	: Neomisin Fosfotransferaz
OD	: Optik Yoğunluk
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
RT	: Ters Transkriptaz
RT-PZR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SVBV	: Strawberry Vein Banding Virüs
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
T-DNA	: Transfer Deoksiribonükleik Asit
V	: Volt
Vir	: Virülans
X-gluc	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid

ÖZET

MODEL BİTKİLERDE TRANSGEN ANLATIMININ KARŞILAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, model bitkilerden olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve tütünde (*Nicotiana tabacum* L.), *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılarak yabancı genlerin (transgen) anlatım düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Tokak 157/37 olgun embriyolarında, *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA105 ve AGL-1 ırklarının GUS geni anlatımındaki etkisi incelendi. Bu ırkların transformasyon verimliliği üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında AGL-1 ırkının EHA105'e göre daha verimli olduğu gözlemlendi. Golden promise ve Tokak 157/37 olgun embriyolarına EHA105 aracılığıyla gen aktarımından 30 gün sonra iki çeşit, seçici besiyerindeki canlılık açısından karşılaştırıldığında, Tokak 157/37 çeşidinde daha başarılı sonuçlar elde edildi (Tokak 157/37: %21,2; Golden promise: %11,6). Seçici besiyerindeki 30 günlük bitkilerden RNA izole edilerek, RT-PZR yöntemi ile GUS ve NPT II genlerinin anlatımı kontrol edildi. Yapılan çalışmalarda, Golden promise çeşidinde toplam 9 bitkiden 4'ünde GUS ve 2'sinde NPT II gen anlatımı gözlenirken, Tokak 157/37 çeşidinde 9 bitkinin 3'ünde zayıf düzeyde GUS, 3'ünde ise NPT II gen anlatımları tespit edildi. EHA105 *Agrobacterium* ırkı aynı zamanda tütün bitkisinin Samsun çeşidinde de denendi. Gen aktarımından 30 gün sonra, histokimyasal olarak test edilen dokuların tümünde değişen oranlarda yaygın şekilde GUS aktivitesi gözlemlendi. Transgen anlatımlarının analizleri, transformasyon verimi ve gen anlatım kararlılığını incelemeye önem taşımaktadır. Çalışmada elde edilen sonuçlar bazı bitkilerde genoma entegre olan genlerin 30 günlük kültür sürecinde anlatım yapmaya devam ettiğini göstermiştir. Golden promise çeşidine ait bitkiler Tokak 157/37'ye göre seleksiyon şartlarından daha fazla etkilenmesine karşın, bu bitkilerdeki transgen anlatım düzeyi daha yüksek bulundu.

SUMMARY

COMPARISON OF TRANSGENE EXPRESSION IN MODEL PLANTS

In this study, it was aimed to identify transgene expression levels in two model plants, barley (*Hordeum vulgare* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The efficacy of GUS gene expression was analyzed in EHA105 and AGL-1 strains of *Agrobacterium tumefaciens* in Tokak 157/37 mature embryos. When these strains were compared regarding their transformation efficiency, it was observed that AGL-1 strain was more efficient than EHA105. 30 days after gene transfer with EHA105 to Golden promise and Tokak 157/37 mature embryos, both of cultivars were compared in terms of viability of plants in selective medium, better results were obtained with Tokak 157/37 cultivar (Tokak 157/37: 21.2%; Golden promise: 11.6%). Expression of GUS and NPT II genes were examined by RT-PCR after isolating RNA from 30-day-old plants grown in the selective medium. During these analyses, 4 GUS and 2 NPT II gene expressions out of 9 plants were determined in Golden promise cultivar, while 3 GUS (low level) and 3 NPT II gene expressions out of 9 plants were determined in Tokak 157/37 cultivar. The *Agrobacterium* strain EHA105 was also tested in Samsun cultivar of tobacco plant. 30 days after gene transfer, intensive GUS activity was observed in all histochemically tested tissues in varying ratios. Transgene expression analyses are important to reveal transformation efficiency and gene expression stability. The results of our study suggest that genes integrated into certain plants continue their expression during a 30-day-period of culture. While Golden promise cultivar plants seemed to be affected more than Tokak 157/37 under selection conditions, they were found to show a higher transgene expression level.

1. GİRİŞ

Model bitkilerin kullanımı, bitkiler alemindeki biyolojik mekanizma ve süreçleri anlamının yanısıra çeşitli biyoteknolojik uygulamaların başarılmasında önem taşımaktadır. Monokotil bitkiler içinde çeltik (*Oryza sativa* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve *Brachypodium distachyon*; dikotil bitkilerde ise tütün (*Nicotiana tabacum* L.) ve *Arabidopsis thaliana* öne çıkan model bitkilerdir. Arpa gerek ülkemizde gerekse dünyada en çok yetiştirilen tahıllardan biridir. Daha çok hayvancılıkta yemlik ve bira sanayinde maltlık olarak kullanılan arpa diğer küçük taneli tahıllara benzemekle birlikte küçük genomlu diploid bir bitkidir (Bothmer ve diğ., 1995). Bu yönüyle arpa, hekzaploid bir bitki olan buğday için iyi bir genomik model olmasının yanısıra, tohum gelişimi ve çimlenmesi açısından tüm *Poaceae* ailesini temsil edebilir (Schulte ve diğ., 2009). Arpa ayrıca, İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde genetik temelli ve biyoteknolojik çalışmalarda (mutasyon ıslahı, doku kültürü ve gen aktarımı) bir model sistem olarak kullanılmıştır (Bilge ve diğ., 1981; Arı, 1991; Gürel, 1997; Gürel ve Gözükırmızı, 2000; Gözükırmızı, 2003; Gürel ve diğ., 2009). Tütün ise *in vitro* rejenerasyonu sağlanan ilk bitki türüdür (Skoog ve Miller, 1957). *Agrobacterium* enfeksiyonuna oldukça duyarlı olması ve hemen hemen tüm doku tiplerinden kolayca rejenere olabilmesi nedeniyle, tütün transformasyon çalışmalarının ilk yıllarından beri tercih edilen model bir bitkidir.

Bitki genomuna yabancı gen aktarımında kullanılan en yaygın yöntem *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyondur. Bu yöntemin bazı üstünlükleri; az sayıda transgen girişi sağlaması, uygulama kolaylığı, düşük maliyetli oluşu ve düşük gen sessizleşmesinin görülmesidir. Bitki transformasyonunun başarısında önemli bir kriter aktarılan yabancı genin (transgen) alıcı hücrelerde kararlı olarak anlatım yapmasıdır. Aktarılan yabancı gen, DNA aktarımından sonraki kısa bir sürede hücre içinde anlatım yapabilir ki bu aşamaya “Geçici Gen Anlatımı” adı verilmektedir. Birçok transformasyon yönteminde sadece az miktardaki DNA hücrenin kromozomuna entegre olmakta, bu durumdaki genler ise “Kararlı Gen Anlatımı” yapmaktadır. Geçici ve kararlı gen anlatımı,

dokularda *in vivo* (histokimyasal) ya da moleküler yöntemlerle belirlenebilir. Bu belirlemeler hücrelere gen aktarım frekansının önemli bir göstergesidir.

Bu tez çalışmasında, model bitkiler olan arpa ve tütünde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarılan genlerin anlatımlarının moleküler düzeylerde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bakterinin farklı ırkları kullanılarak gen aktarımları yapılmış ve markır genlerin dokulardaki etkinliği GUS histokimyasal analizine ek olarak RT-PZR yoluyla da araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, transformant kültürlerdeki yabancı gen anlatımlarının sürekliliğini göstermesi açısından önem taşımaktadır ve yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOTEKNOLOJİK ÇALIŞMALARDA “MODEL BİTKİLER”

Model bitki türlerinin kullanımı bitkiler alemindeki biyolojik süreç ve mekanizmaları detaylı olarak araştırmada önemli rol oynamaktadır. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* L. (çeltik) ve *Brachypodium distachyon* gibi türleri ideal kılan özelliklerin başında bu bitkilerin küçük genoma sahip olmaları, kısa yaşam döngüsüyle çoğalmaları, filogenide belirli bir pozisyonda bulunmaları gelmektedir (Flavell, 2009). Monokotil ve dikotil grupları temsil eden model bitkilerin çoğunun genom dizi bilgilerinin kısa sürede elde edilmesi, aynı zamanda bu bitkilerle yapılan biyoteknolojik çalışmalara da katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada, transformasyon sonrası markır genlerin anlatımlarını incelemek için model bitki türlerinden arpa ve tütün kullanılmıştır.

2.1.1. Arpa

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), *Poaceae* ailesinden Triticeae oymağının bir üyesidir. Arpanın taksonomisi Tablo 2.1’de görülmektedir.

Tablo 2.1: Arpanın taksonomisi (Anonim, 2010a)

Alem	Planta
Altalem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Liliopsida
Altsınıf	Commelinidae
Takım	Cyperales
Aile	Poaceae
Cins	<i>Hordeum</i> L.
Tür	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Arpa; erken olgunlaşması ve soğuk, kuraklık, alkali ve tuzlu topraklar gibi koşullara kolay adapte olabilmesi bakımından dünyada yaygın olarak ekimi yapılan bir tahıldır. Bu tahıl, dünya çapında tahıl üretiminde mısır (*Zea mays* L.), buğday (*Triticum*

aestivum L.) ve çeltik (*Oryza sativa* L.)’ten sonra dördüncü sırada yer almaktadır. 2009-2010 Mart verilerine göre (Anonim, 2010b) arpa üretiminde Türkiye; Avrupa Birliği, Rusya, Ukrayna, Kanada ve Avusturalya’dan sonra altıncı sırada yer almaktadır. Dünyada ekilen arpanın yaklaşık %85’i hayvan yemi olarak, geriye kalan kısmının çoğu da maltlık olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ise arpa, ekimi yapılan tahıllar arasında buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır ve üretilen arpanın çok büyük bir kısmı yurt içinde tüketilmektedir.

Arpa; kendine döllen, on dört kromozoma sahip diploid ($2n=2x=14$) yapısıyla (Bennett ve Smith 1976) tüm *Triticeae* türlerinin basit genomunu temsil etmektedir ve kısa yaşam döngüsü ile genetik ve fizyolojik çalışmalarda model bir bitki olarak kullanılmaktadır (Shewry, 1992). Henüz tüm genom dizisi yayınlanmamasına karşın (Sato ve diğ., 2009) genomun yaklaşık %80’inin yüksek oranda tekrarlanmış diziler içerdiği saptanmıştır (Schulte ve diğ., 2009). Ayrıca, yapılan çalışmalarla arpa genomuna ait 501,616 EST oluşturulmuş (Anonim, 2010c), abiyotik ve biyotik strese maruz kalan bitkilerden elde edilmiş cDNA kütüphaneleri kurulmuştur (Sreenivasulu ve diğ., 2008).

Arpada gen aktarımına dayalı biyoteknolojik çalışmalar 1990’lı yıllarda başlamıştır (Lazzeri, 1995; Jaehne ve diğ., 1994). İlk başarılı arpa transformasyonu, biyolistik temelli gen aktarımı yöntemiyle yapılmış ve bu şekilde istenilen DNA parçasının olgunlaşmamış embriyolara aktarımı sağlanmıştır (Wan ve Lemaux, 1994). Buna karşın, bu yöntemde aktarılan genin kararlı girişi ve gen anlatımında çeşitlilik gözlenmiştir. Tingay ve diğ. (1997) olgunlaşmamış embriyoları kullanarak arpada ilk olarak *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımını gerçekleştirmişlerdir. O zamandan beri çeşitli yöntemler geliştirilerek ilerlemeler kaydedilmiş (Matthews ve diğ., 2001; Trifonova ve diğ., 2001) ve gen aktarımı, olgunlaşmış embriyolara, androjenetik polen kültürlerine (Kumlehn ve diğ., 2006), izole edilmiş ovüllere (Holme ve diğ., 2006), mikrosporlar (Yao ve diğ., 1997) ve meristem kültürlerine (Zhang ve diğ., 1999) yapılmıştır. Ayrıca, transgenlerin entegrasyonu (Stahl ve diğ., 2002; Salvo ve diğ., 2004; Lange ve diğ., 2006) ve özel promotörlerin kullanımı üzerine kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür (Goedeke ve diğ., 2007; Hensel ve diğ., 2008). Arpanın transformasyon etkinliğinin genotipe bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Finnie ve diğ.,

2004) ve agronomik olarak önemli çeşitlerin bir çoğunda henüz transgen anlatımlarının doğası tam olarak anlaşılamamıştır.

2.1.2. Tütün

Solanaceae ailesinin bir üyesi olan tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinin beş yüz yıldan daha uzun bir süredir ekimi yapılmaktadır. Gerek tütünde gerekse bu ailenin diğer üyeleri olan patates ve patlıcanda genomların oldukça korunduğu belirlenmiştir. Tütünün taksonomisi Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Tütünün taksonomisi (Anonim 2010d)

Alem	Planta
Altalem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Altsınıf	Asteridae
Takım	Solanales
Aile	Solanaceae
Cins	<i>Nicotiana</i> L.
Tür	<i>Nicotiana tabacum</i> L.

Tütün; *in vitro* rejenere edilebilen ilk bitki türüdür. Doku kültüründe üretimi oldukça hızlı ve kolay olan tütün, tüm doku tiplerinden kolayca rejenere olabilmektedir. Nispeten kısa yaşam döngüsüne sahiptir. Standart doku kültürü koşullarının geliştirilmesinde (Murashige ve Skoog, 1962), katlanmış haploid üretim yöntemlerinin kurulmasında ve gen anlatımı araştırmalarında sıklıkla kullanılan model bir bitkidir (Belogradova ve diğ., 2009). *Agrobacterium tumefaciens* ile ilk transformasyon tütün gövde parçalarına yapılmış, maya alkol dehidrogenaz ve bakteriyel neomisin fosfotransferaz genleri aktarılmıştır (Barton ve diğ., 1983). Sonraki yıllarda transformasyonun doğasına ilişkin çeşitli çalışmalarda tütün kullanılmıştır. Bu bitkinin “Bright Yellow” çeşidinden elde edilen BY-2 hücre hattı çok hızlı bölünen bir deneysel sistem olarak benimsenmiş ve birçok araştırmada kullanılmıştır. Bitki hücre fonksiyonlarının anlaşılmasında, özellikle hücre bölünmesi, hücre iskeleti, sinyal iletimi, hücre içi trafiği ve organel farklılaşmasında BY-2 hücre hattı birçok yeni bulguya ulaşılmasını sağlamıştır (Nagata ve diğ., 1992).

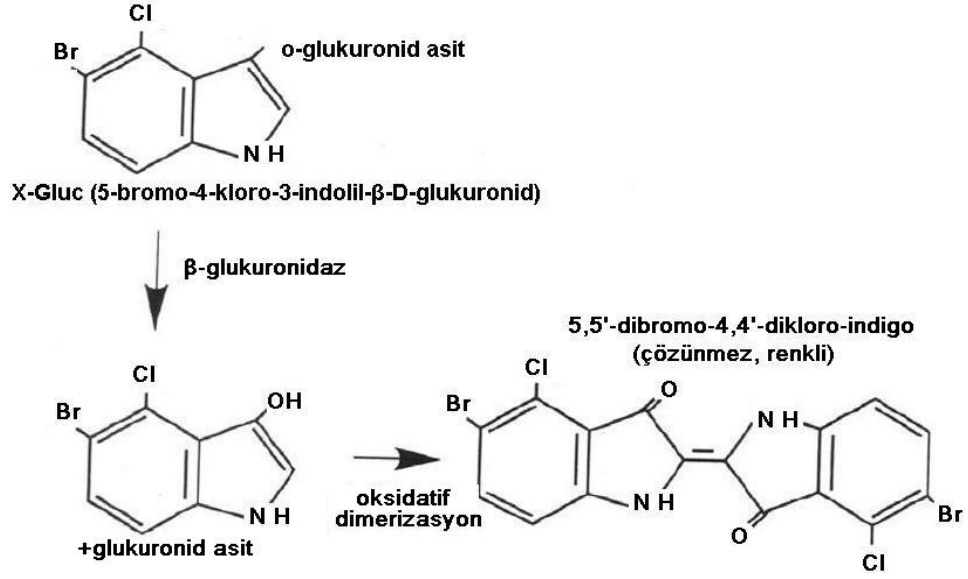
2.2. TRANSGEN ANLATIMININ BELİRLENMESİ

Transgen, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak bir organizmanın genomuna aktarılan yabancı DNA dizisidir. Transgenlerin döller boyu anlatım yaptığı bitki hatları transgenik olarak tanımlanır. Transformasyon ön çalışmalarında bitki dokularına en fazla aktarılan genler anlatımları hızlı olarak teşhis edilebilen “markır” (işaret) genleridir. Markır genlerin anlatımları hem doku düzeyinde histokimyasal olarak hem de moleküler yöntemlerle saptanabilir.

2.2.1. Haberci (Raportör) Genler

Transformasyondan sonra, aktarılan genlerin dokulardaki varlığını ve anlatımını tespit etmek için Southern melezlemesi, Northern melezlemesi ya da Polimeraz zincir reaksiyonu gibi yöntemler kullanılabilir. Ancak, bu yöntemler zahmetli ve optimizasyon gerektirmektedir. İlk olarak Jefferson tarafından (1987a) *Escherichia coli*’nin K12 ırkından klonlanmış olan β -glukuronidaz geni (GUS, *gusA*, *uidA*; EC 3.2.1.31), bitki transformasyonunda raportör bir gen sistemi olarak benimsenmiştir. Hücredeki β -glukuronidaz’ın tespiti transgen anlatımını göstermede hassas, hızlı ve kullanışlı; enzimin stabilitesi ve yüksek duyarlılığı ile florometrik ve histokimyasal analizi olanaklı kılan bir yoldur.

β -glukuronidaz, çeşitli β -glukuronidlerin parçalanmasını katalizleyen bir asit hidrolazıdır. GUS gen anlatımının histokimyasal analizi bu temele dayanır. GUS boyama çözeltisine katılan 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glukuronid (X-Gluc) GUS geninin anlatım yaptığı transformant hücrelerde β -glukuronidaz enzimi ile etkileşime girerek mavi renkteki dikloro-dibromo-indigo (ClBr-indigo) maddesini açığa çıkarmaktadır (Şekil 2.1). Bu şekilde, enzim aktivitesinin olduğu hücreler maviye boyanarak kolayca görüntülenebilir.



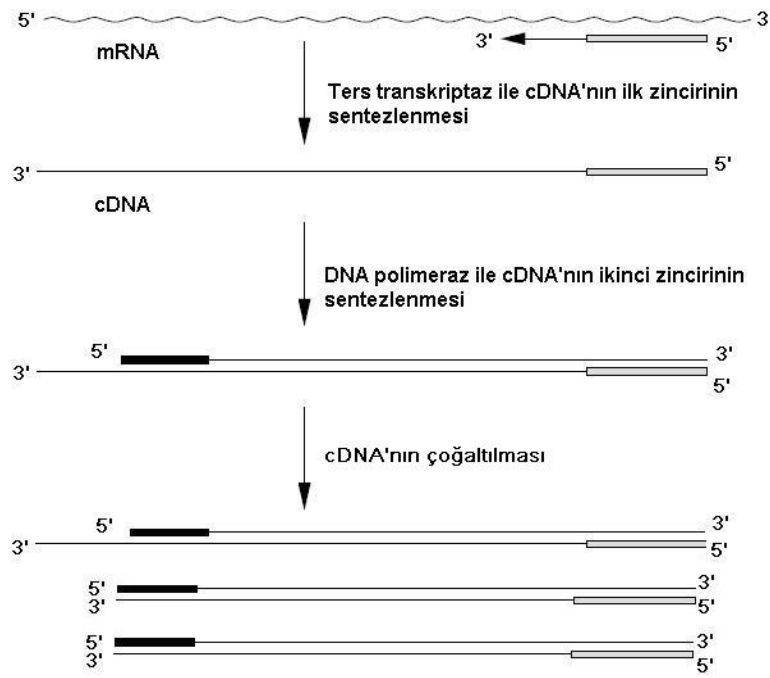
Şekil 2.1: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid (X-gluc)'in GUS geninin anlatım yaptığı hücrelerde β-glukuronidaz enzimi ile etkileşime girerek ClBr-indigo maddesini açığa çıkartması

GUS geni, yüksek bitki türlerinde bulunmadığından hatalı pozitif sonuçlar çok az görülmekte ve bitkilerde haberci gen olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, GUS analizini uygulamadan önce endojen GUS aktivitesinin yokluğunu doğrulamak ve fungal ve/veya bakteriyel kontaminasyondan kaynaklanmadığını göstermek önemlidir. Bu nedenle histokimyasal analizi steril şartlarda uygulamak ve elde edilen sonuçları negatif kontrollerle karşılaştırmak zorunludur. Uzun inkübasyon zamanlarında bakterilerin çoğalması, Jefferson ve Wilson tarafından rapor edildiği gibi (1991) X-gluc solüsyonuna sodyum azid (%0,02), kloramfenikol (100 µg/ml) ya da %20 metanol (Kosugi ve diğ., 1990; Hansch ve diğ., 1995; Gürel ve Gözükırmızı, 2000) eklenerek önlenabilir.

GUS ile transforme edilen yüksek bitkiler normal gelişimlerini sürdürebilir ve canlı dölleri oluşturabilir (Jefferson ve diğ., 1987b). GUS geninin anlatımı, ayrıca dokuya özgül gen anlatımı ve gen anlatımının gelişimsel düzenlenmesi gibi araştırmalarda bir araç olarak kullanılabilir. Sonuç olarak GUS genine dayalı histokimyasal analiz, transformasyon sürecinin anlaşılması ve geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

2.2.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), RNA transkriptlerinin tespiti ve miktarlarının belirlenmesinde son derece hassas bir yöntemdir. Yöntemin temeli; mRNA'nın RNA bağımlı DNA polimeraz (Ters transkriptaz) (RT) enzimi ile cDNA'ya çevrilmesi ve ardından PZR ile çift zincirli DNA moleküllerinin sentezi ve çoğaltımının gerçekleştirilmesidir (Şekil 2.2). Bu şekilde sadece genlerde kopyalama yapan bölgelerin analizi gerçekleştirilmiş olup, polipeptid zincirinde karşılığı olmayan lider, kuyruk ve intron dizileri de bertaraf edilmiş olur.



Şekil 2.2: Tek aşamalı RT-PZR'nin temeli

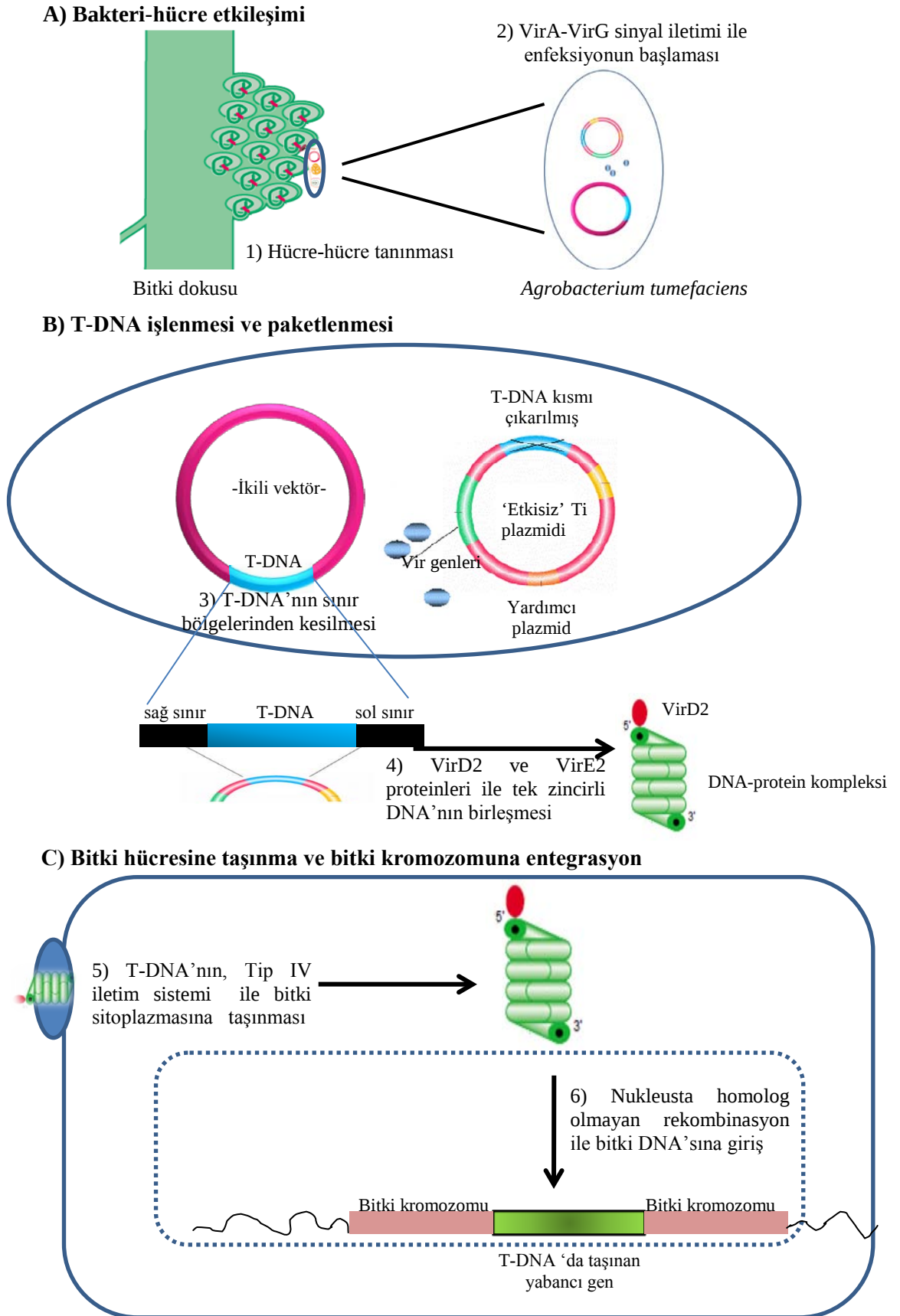
Ters transkriptaz normalde ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunmayan bir enzimdir, bununla birlikte retrovirüsler gibi sınırlı sayıda virüslerde bulunmaktadır. En çok kullanılan ve ticari olarak bulunan RT enzimleri onkogenik retrovirüsler olan Avian Myeloblastoma Virüs (AMV) ve Moloney Murine Leukemia Virüs (MMLV)'ten izole edilmiş olanlardır. AMV RT enzimi nispeten yüksek sıcaklık derecelerinde kullanılabilmesi (42-52°C) nedeniyle guanin ve sitozin miktarı fazla olan RNA kalıplarından tam uzunlukta cDNA transkripsiyonunda tercih edilmektedir. Ayrıca, AMV RT enzimi kullanıldığında uzayan cDNA zincirine nükleotidlerin katılımı MMLV'den daha hızlıdır. Buna karşın, AMV'nin mutasyon frekansı (1:30.000) MMLV'den (1:17.000) yaklaşık iki kat yüksektir. Bu çalışmada, RT-PZR uygulamasında AMV RT kullanılmıştır.

2.3. *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

Bitki genomuna yabancı gen aktarımında en yaygın araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. *A. tumefaciens* α -proteobacteria sınıfının *Rhizobiaceae* ailesinin bir üyesidir. Toprakta yaşayan, spor oluşturmayan, kendiliğinden hareket edebilen, çubuk şeklinde, gram negatif, fitopatojenik bir bakteridir. 600 bitki türünü içeren çok geniş konak aralığına sahiptir (De Cleene ve De Ley, 1976). Doğada, bitkilerde yaralanma ya da hasar sonucunda bitki dokularına girerek “taç tümörü” oluşumuna neden olmaktadır. Bu tümör oluşumunun bakteri hücrelerinde bulunan bir plazmidin (Ti plazmidi) küçük bir bölümü (T-DNA; “Transfer DNA”) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Chilton ve diğ., 1977). Bitkinin *Agrobacterium* ile enfeksiyonu sonucunda Ti plazmidinin üzerinde bulunan ve tümör oluşumundan sorumlu genleri (fitohormon ve opin biyosentezinde görevli genler) taşıyan T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve bitki kromozomu ile bütünleşmektedir (Chilton ve diğ., 1980; Willmitzer ve diğ., 1980). Bu bölgede bulunan genlerin transkripsiyonu sonucunda da tümör oluşumu ve opinler olarak adlandırılan bakterilerin karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullandığı düşük moleküler ağırlıklı karbon bileşenlerinin doğrudan biyosentezi gerçekleşmektedir.

Yukarıda bahsedilen nitelikleri 1980’li yıllarda *Agrobacterium*’un *in vitro* çalışmalarda bir gen aktarım sistemi olarak kullanılabilmesine yol açmıştır (De Framond ve diğ., 1983). Özellikle, opin sentezini sağlayan ve tümör oluşturan genlerin T-DNA bölgesinden çıkarılmasının bitki hücrelerine gen aktarımını hiçbir şekilde engellemediği, sağ ve sol sınır bölgesi olarak adlandırılan düzensiz tekrar dizilerinin arasına yerleştirilen DNA parçasının kolayca bitki hücrelerine aktarılabilirdiği ve *vir* bölgesinin T-DNA aktarımında rol oynadığı (Sheng ve Citovsky, 1996) detaylı çalışmalarla ortaya çıkarılmış, etkili bitki transformasyon vektörlerinin geliştirilmesine olanak vermiştir. Bu şekilde, zararsız hale getirilmiş Ti plazmidi ile bitkilerin enfeksiyonu ve rejenerasyonu sağlanmaktadır (Van Haute ve diğ., 1983).

Bitki hücrelerine *Agrobacterium* aracılığıyla T-DNA aktarımında “ikili vektör” sistemi geliştirilmiştir (Hoekema ve diğ., 1983; Bevan, 1984) ki burada *vir* genlerini taşıyan bir “yardımcı plazmid” ile istenilen genin T-DNA sınır bölgeleri arasına klonlandığı bir vektör birlikte bulunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyonda gerçekleşen temel moleküler olaylar

Agrobacterium aracılığıyla DNA aktarımıyla çok sayıda bitki türünün yanı sıra; maya (Bundock ve diğ., 1995; Piers ve diğ., 1996; Sawasaki ve diğ., 1996), mantar (De Groot ve diğ., 1998; Chen ve diğ., 2000; Rho ve diğ., 2001) ve kanser (HeLa) hücreleri de transforme edilmiştir (Kunik ve diğ., 2001). Özellikle, ikili vektör sistemi kullanılarak dikotil ve monokotil bitki türlerinde transformasyon yöntemleri için çok sayıda patent alınmış, çeşitli özellikler taşıyan bazı transgenik çeşitler ticari olarak piyasaya verilmiştir.

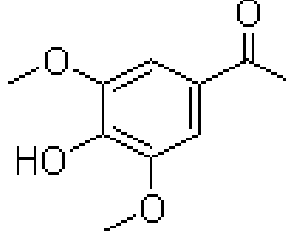
Tablo 2.3'te arpanın farklı genotiplerinde yapılan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyon çalışmaları ve sonuçları gösterilmiştir. Arpaya gen aktarımında en yüksek frekans Golden promise çeşidinde, 100 embriyodan 86 transgenik bitki eldesi ile sağlanmıştır (Hensel ve diğ., 2008).

Tablo 2.3: Arpanın farklı genotiplerinde yapılan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyon çalışmaları ve sonuçları (Goedeke ve diğ., 2007'den düzenlenmiştir).

Genotip	Doku tipi	Transformasyon etkinliği	Kaynak
Golden promise	Olgunlaşmamış embriyo	%12	Matthews ve diğ., 2001
Golden promise	Olgunlaşmamış embriyo	%17,9	Coronado ve diğ., 2005
Golden promise	Olgunlaşmamış embriyo	%86,7	Hensel ve diğ., 2008
Golden promise	Ovül	%5,5	Holme ve diğ., 2008
İgri	Androgenetik polen kültürü	2,2/başak	Kumlehn ve diğ., 2006
Schooner	Olgunlaşmamış embriyo	%0,9	Wang ve diğ., 2001

Monokotil bitkilerin transformasyon etkinliği dikotil bitkilere göre daha düşüktür. Bunun nedeni, dikotil bitkilerde yara bölgesinden salınan fenolik bileşenler ile bakteri hücreleri arasındaki doğal etkileşimin monokotil bitkilerde gerçekleşmemesidir. Bu gibi bileşiklerin sentezlenmediği monokotil bitkilerde, gen aktarım etkinliğini artırmak için bitki-bakteri etkileşimi aşamasında ortama *vir* genlerinin anlatımını teşvik eden maddeler ilave edilir. Çeşitli fenolik bileşikler arasında *vir* gen anlatımını teşvik ettiği en iyi bilinen bileşik asetosiringondur (3',5'-dimetoksi-4'-hidroksiasetofenon) (Stachel ve diğ., 1986). Asetosiringon (Şekil 2.4), düşük maliyeti ve ticari olarak elde edilebilmesi nedeniyle monokotillerle yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Glukoz ve galaktoz gibi monosakkaridler de ortamda asetosiringon bulunmadığı ya da

az miktarda bulunduğu zaman *vir* gen anlatımını indükleyebilir (Cangelosi ve diğ., 1990).



Şekil 2.4: Asetosiringon ($C_{10}H_{12}O_4$)’un kimyasal formülü

Bu çalışmada pCAMBIA2301 vektörünün ikili plazmid olarak kullanıldığı bir vektör sistemi kullanılmıştır. Bu plazmid üzerinde GUS geninin önüne, Strawberry Vein Banding Virüsünden (SVBV) izole edilmiş bir promotör dizisi klonlanmıştır. Bu promotörün anlatımı; çeşitli dikotil türlerde (tütün, biber, domates, salatalık ve kabak) (Wang ve diğ., 2000) test edilmiş, geçici ve kararlı GUS gen anlatımının gözlemlenmesi SVBV promotörünün fonksiyonel olduğunu ve bitki transformasyon çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Arpada yüksek bir yara-yanıtının olmayışı ve olgun embriyo kullanımından dolayı kültürdeki hücre bölünmesinin düşük olması, transformasyon frekansını sınırlayan faktörlerdir. Bu sorunların aşılmasında bakteri-konak hücre etkileşimini artırarak daha fazla hücrenin enfekte edilmesini sağlamak bir yol olabilir. Özellikle asetosiringon, pluronik F68 (Cheng ve diğ., 1997) ve sistein (Hensel ve diğ., 2008) gibi maddelerin transformasyon etkinliğini artırdığı bulunmuştur. Bu aşamada bakteri-konak etkileşimini artıracak yeni kemotaksik maddelerin denenmesi bir alternatif olabilir. Bu çalışmada *Agrobacterium* ile transforme edilen arpa ve tütün dokularında transgen anlatımlarının histokimyasal yöntem ve RT-PZR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Özellikle RT-PZR, ön çalışmalarda doku düzeyinde gözlenen GUS gen anlatımının moleküler düzeyde kanıtlanmasını sağlayacaktır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin Tokak 157/37 çeşidine ait olgun tohumlar 2009 Ekim ayında İstanbul Üniversitesi Botanik bahçesinde tarla ekimi yapılarak yetiştirilen bitkilerden elde edildi. Golden promise tohumları Minnesota Üniversitesi'nden, tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinin Samsun çeşidinin tohumları ise Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nden sağlandı.

3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI

Arpa ve tütün doku kültürlerinde Murashige ve Skoog (MS) (1962) besiyeri (Tablo 3.1) kullanıldı. MS besiyeri hazırlamak amacıyla 900 ml distile su içerisinde sırasıyla, 4,4 g/l MS tuz karışımı ve %3 sukroz çözündürüldü daha sonra çözeltinin pH'sı 1 N NaOH kullanılarak 5,7'ye ayarlanıp hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. Son olarak ortama %9 agar eklendi. Hazırlanan besiyeri otoklavda (121°C, 1,2 atmosfer basınç altında, 15 dakika) steril edildi ve sonrasında besiyerine 1 mg/l MS vitamin çözeltisi eklendi. Daha sonra, kullanılan bitki materyaline ve transformasyon öncesi ve sonrasına göre besiyerine ilave maddeler eklendi (bakınız 3.3.2 ve 3.3.3).

Gen aktarım çalışmasında *A. tumefaciens*'in üretilmesi için Luria-Bertani (LB) besiyeri hazırlandı. Bu amaçla, 200 ml distile su içerisine sırasıyla %1 tripton, %0,5 maya ekstraktı ve %1 NaCl çözündürüldü ve 1 N NaOH kullanılarak pH 7,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

Çalışmada kullanılan tüm metal ve cam malzemeler alüminyum folyoyla kaplanıp 200°C'de pastör fırınında steril edildi. Tüm doku kültürü çalışmaları, laminar hava akımlı steril kabinde gerçekleşti. Bitkilerin ve eksplantların yetiştirilmesinde bitki

büyütme kabini (25°C’de, 16 saat ışık/8 saat karanlık) (Angelantoni Ekochl1500) kullanıldı.

Tablo 3.1: Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri

İçerikleri	Konsantrasyon (mg/l)
Makroelementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂	332
MgSO ₄	180,7
KH ₂ PO ₄	170
Mikroelementler	
KI	0,83
Na ₂ EDTA	37,3
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Karbonhidrat	
Sukroz	30000
Vitaminler ve diğer bileşenler	
Myo-inositol	100
Glisin	2
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin hidroklorid	0,5
Tiamin hidroklorid	0,1

3.2.1. Arpa Embriyo Kültürünün Kurulması

Arpa olgun embriyo kültürünün kurulması için öncelikle tohumlar %20’lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 20 dakika bekletildi ve ardından 3-5 kez steril distile su ile yıkandı. Ardından, tohumların testaları çıkartıldı ve tohumlar 30 dakika boyunca steril suda bekletildi. Süre sonunda, tohumların embriyoları steril bir bistüri yardımıyla çıkartılarak steril suya konuldu. Embriyoların çıkartılma işlemi tamamlandıktan sonra

tüm embriyolar sırasıyla %99'luk etanol içerisinde 20 saniye bekletildi ve ardından 3 kez steril distile suyla yıkandı. Daha sonra embriyolar steril kurutma kağıdında kurutuldu ve kesik yüzeyleri besiyerine temas edecek şekilde MS besiyerlerinde kültüre alındı. Transformasyon işlemine kadar, 2 gün süresince bitki büyütme kabinine konuldu.

3.2.2. Tütün Bitkisinin Yetiştirilmesi ve Eksplantların Çıkartılması

Tütün bitkisinin steril ortamda yetiştirilmesi için, tohumlar %20'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 20 dakika bekletildi ve ardından 4-5 kez steril distile su ile yıkandı. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tütün tohumları steril kurutma kağıdına alındıktan sonra MS besiyerlerine aktarıldı ve 5-6 hafta boyunca bitki büyütme kabininde yetiştirildi. Ardından, gen aktarımı amacıyla tütün bitkisinin yapraklarından 0,5 cm² çapında diskler ve tütün gövdelerinden 1 cm uzunluğunda eksplantlar çıkartıldı.

3.3. *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

3.3.1. *Agrobacterium tumefaciens* Irkları ve Plazmidler

Çalışmada kullanılan *A. tumefaciens* ırkları ve özellikleri Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

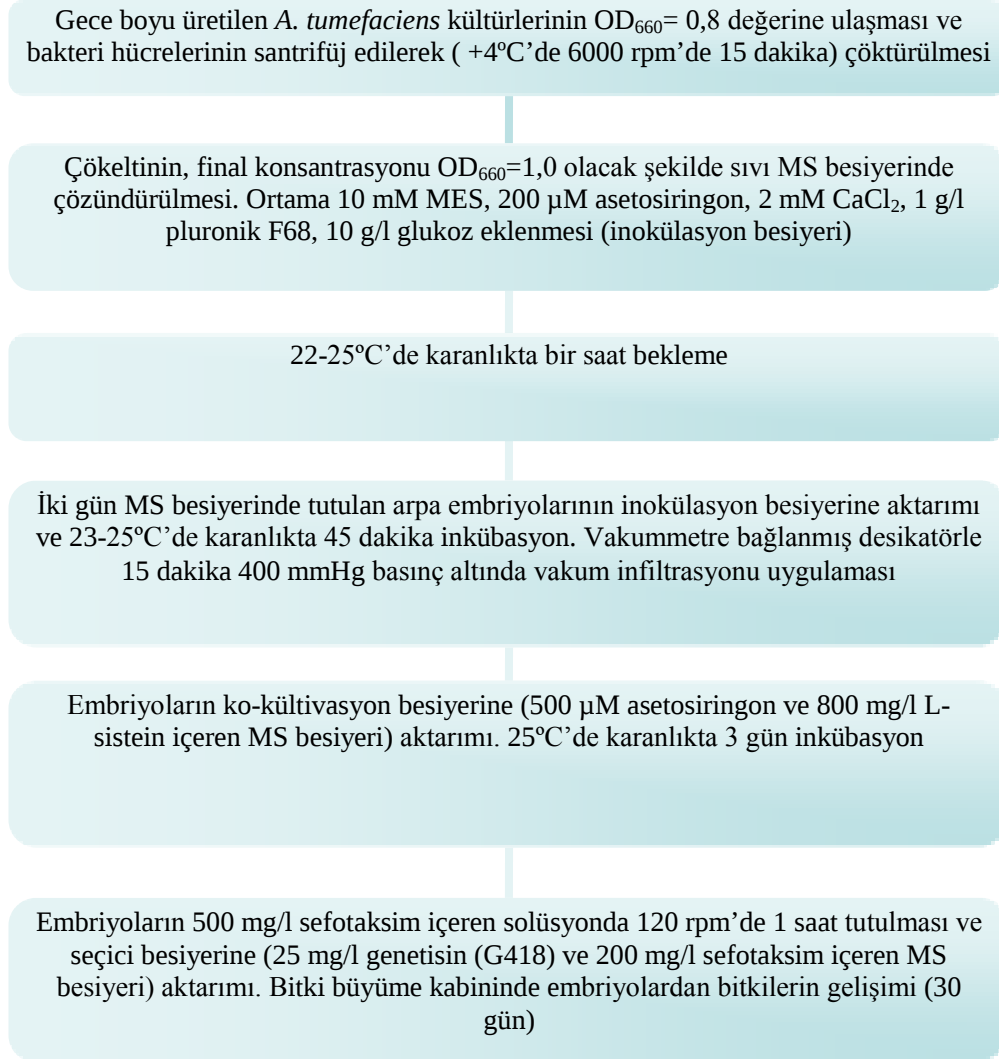
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan *A. tumefaciens* ırkları ve özellikleri

<i>Agrobacterium</i> ırkı	İkili plazmid ve taşıdığı markırlar	Antibiyotik markırı
AGL-1	pCAMBIA2301/ <i>npt II</i> , <i>gusA</i>	200mg/l karbenisilin +50mg/l kanamisin
EHA105	pCAMBIA2301/ <i>npt II</i> , <i>gusA</i>	50 mg/l rifampisin +50mg/l kanamisin

A. tumefaciens bakterisinin üretiminde ilgili antibiyotikleri içeren LB besiyeri kullanıldı. Tüm kültürlerin üretimi; 28°C'de, 180 rpm'de çalkalamalı etüvde gece boyu yapıldı. Üretilen bakterilerin OD₆₆₀ değeri tütün bitkisi için 0,4, arpa bitkisi için ise 0,8 olduğunda transformasyon deneylerine başlandı.

3.3.2. Arpa Bitkisine Gen Aktarımı

Arpa bitkisine yapılan gen aktarımının aşamaları Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Yapılan işlemler aşağıda kısaca özetlenmiştir.



Şekil 3.1: Arpa bitkisinin *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyonu

3.3.3. Tütün Bitkisine Gen Aktarımı

Tütün bitkisine yapılan gen aktarımlarında yaprak ve gövde eksplantları kullanıldı. *A. tumefaciens* kültürlerinin OD₆₆₀ değeri 0,4'e geldiğinde bakteri hücreleri santrifüj edilerek çöktürüldü ve çökelti 200 µM asetosiringon içeren infiltrasyon besiyerinde (10mM MgSO₄, 10mM MES, pH 5,6) çözündürüldü. Eksplantlar bu solüsyonun içerisine aktarılıp 22-25°C'de karanlıkta 30 dakika bekletildi. Daha sonra solüsyon süzülüp eksplantlar steril filtre kağıtlarında kurutuldu ve ko-kültivasyon besiyerine (3,0 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA içeren MS besiyeri) aktarıldı. Kültürler 25°C'de karanlıkta 2 gün kültüre bırakıldı. Kültürlemeden sonra eksplantlar 500 mg/l sefotaksimle yıkanıp steril kurutma kağıdında kurutulduktan sonra seçici besiyerine (200 mg/l sefotaksim ve 25 mg/l genetisin içeren ko-kültivasyon besiyeri) aktarıldı ve bitki büyütme kabiniinde 30 gün süre ile kallus ve sürgün gelişimi sağlandı.

3.4. GUS GEN ANLATIMININ HİSTOKİMYASAL ANALİZİ

A. tumefaciens ile 3 gün süresince karanlıkta kültüre alınan embriyolarda GUS gen anlatımını belirlemek için bu embriyolar X-gluc içeren bir çözeltiye (Tablo 3.3) aktarılıp 55°C'de gece boyu bekletildi.

Tablo 3.3: GUS boyama çözeltisinin içeriği

Stok çözelti konsantrasyonları	Final konsantrasyonu
12,5 mM Potasyum ferrisiyanid	1,5 mM
12,5 mM Potasyum ferrosiyanid	1,5 mM
Triton X-100	%0,8 (v/v)
40 mM 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid (X-gluc)	6 mM
Metanol	%20 (v/v)
Toplam Hacim	5000 µl

Boyamadan sonra, dokular etanole alındı ve stereo mikroskop (Olympus SZX7) altında incelendi. Skorlamada, dokular üzerinde mavi bölgeler boyuta bakılmaksızın bir transformasyon kümesi olarak kabul edildi.

3.5. TRANSGEN ANLATIMININ TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR) İLE BELİRLENMESİ

3.5.1 Bitki Yapraklarından Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, seçici besiyerindeki 30 günlük arpa bitkilerinin yapraklarından (gen aktarımı yapılan bitkiler ile kontrol bitkileri) Promega Z3100 kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Taze yaprak materyali, sıvı azotla dondurulup seramik havan kullanılarak öğütüldü. 60 mg parçalanmış dokuya 175 µl parçalama tamponu (+4°C) eklenip öğütme işlemine devam edildi. Ardından homojenata 350 µl RNA seyreltme tamponu eklendi ve homojenat birkaç kez ters yüz edip karıştırıldıktan sonra $14,000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Saydam lizata %95'lik 200 µl etanol eklendi ve 3-4 kez pipetaj yapılarak karıştırıldı ve bu karışım toplama tüpü üzerinde bulunan filtreli tüpe aktarıldı ve $12,000-14,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından, toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılıp filtreli tüpe 600 µl RNA yıkama solüsyonu eklendi ve $14,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar boşaltıldıktan sonra her bir örnek için 50 µl DNaz inkübasyon karışımı hazırlandı ve bu karışım tüpün filtresini tamamen kaplayacak şekilde örneklerle uygulandı. 15 dakika 20-25°C'de inkübasyondan sonra filtrelere 200 µl DNaz durdurucu solüsyon eklendi ve $12,000-14,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre üzerine 600 µl RNA yıkama solüsyonu eklendi ve $12,000-14,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü boşaltılıp tekrar 250 µl RNA yıkama solüsyonu eklendi ve iki dakika yüksek hızda santrifüjlendi. Ardından total RNA, RNA'yı içeren filtre yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde 50 µl nükleaz-içermeyen suyun eklenmesi ve $12,000-14,000 \times g$ 'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmesiyle elde edildi. Çalışmada olası RNaz kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüm malzemeler iki kez otoklavlandı.

3.5.2. Total RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülerek belirlendi. A_{260}/A_{280} oranı 1,7-2,1 arasında olan RNA'lar saf olarak kabul edildi. 260 nm'deki 1 absorbans ünitesi tek zincirli RNA'nın 40 µg/ml'sine eşit olduğu için RNA miktarı:

RNA (µg/ml) = A_{260} x sulandırım katsayısı x 40 formülüne göre hesaplandı.

3.5.3. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

A. tumefaciens aracılığıyla transformasyonla aktarılan β -glukuronidaz (GUS) haberci geninin ve *neomisin fosfotransferaz II* (NPT II) markır geninin bitki hücrelerindeki anlatımlarını transkript düzeyinde incelemek amacıyla izole edilen RNA örneklerinin tek aşamalı RT-PZR (Takara RR024)'si gerçekleştirildi. Tablo 3.4'te RT-PZR'de kullanılan primerlerin nükleotid dizileri verilmiştir.

Tablo 3.4: RT-PZR'de kullanılan primerler ve nükleotid dizileri

Çoğaltılan gen dizisi	Primer dizisi 5'→3'
GUS	GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG GGT TAC GCG TTG CTT CCG CCA
NPT II	ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG
AKTİN	GTC CTT TTC CAG CCA TCT TTC CAA GAA TCG ACC CTC CAA TCC
VİRB11+21	TGC CGC ATG GCG CGT TGT AG
VİRG15	GAA CGT GTT TCA ACG GTT CA

Ters transkripsiyon ve PZR çoğaltımında kullanılan bileşenlerin final konsantrasyonları; 1X tek aşamalı RNA PZR tamponu, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 0,8 u/μl RNaz inhibitörü, 0,1 u/μl AMV RT XL, 0,1 u/μl AMV-Optimized Taq, 0,4 μM ileri ve geri primerler, 1 μg total RNA olacak şekilde 0,5 ml'lik steril mikrotüplere konuldu.

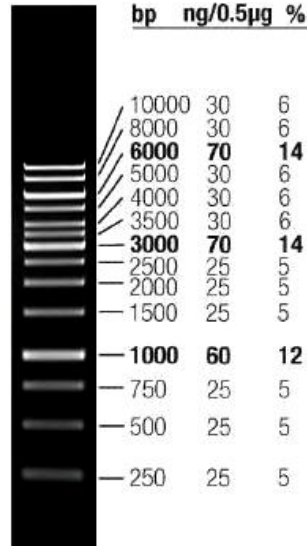
Reaksiyon koşulları:

50°C'de 30 dakikada AMV RT XL ile mRNA moleküllerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi. 94°C'de 2 dakika RT'nin inaktivasyonu sağlandı. Ardından PZR 30 döngüde (94°C'de 30 saniye DNA'nın denatürasyonu, 55°C'de 30 saniye primerlerin bağlanması ve 72°C'de 2 dakika uzama) gerçekleştirildi. Reaksiyon +4°C'de durduruldu.

3.5.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Total RNA ve RT-PZR ürünlerinin nitel analizi agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirildi. %1'lik agaroz jel hazırlamak amacıyla, 40 ml 1X TAE tamponuna (Tablo 3.5) 0,4 g agaroz konulup mikrodalga fırında orta ayarda 2 dakika süre ile çözündürüldü. Agaroz jel yaklaşık 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 0,5

$\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür ilave edildi. Ardından jel, tarağın yerleştirilmiş olduğu yatay elektroforez kasedine döküldü ve 30 dakika boyunca katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra jel, 1X TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi ve örnekler, taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklendi. Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi işleminde; 5 μl RNA ve 10 μl RT-PZR örnekleri 6X elektroforez yükleme tamponu (Tablo 3.5) ile karıştırıldı. Tüm örnekler 70 V'de 50 dakika yürütüldü. Markır olarak "GeneRuler™ 1kb DNA ladder" (Fermentas SM0311) kullanıldı (Şekil 3.2). Bantlar, UV ışık altında transillüminatör makinesi kullanılarak fotoğraflandı.



Şekil 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1kb'lik DNA ladder (Anonim, 2010e)

Tablo 3.5: Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tamponlar

Tampon	İçerik
50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu	242 g Tris bazı, 57,1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
6X Elektroforez yükleme tamponu	%0,25 Bromofenol mavisi, %40 sukroz

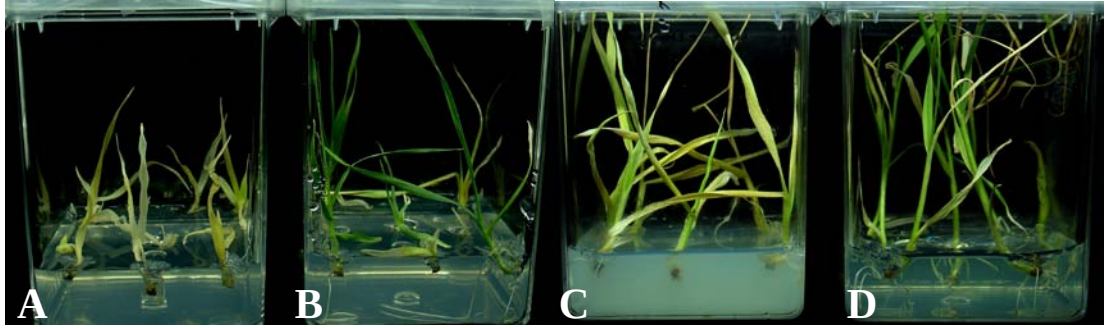
RNA moleküllerinin jelde yürütülmesinden önce olası RNaz etkisini önlemek amacıyla %0,1'lik DEPC'li su hazırlandı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bu solüsyon DEPC kalıntısının tamamen uzaklaştırılması için otoklavlandı. DEPC; etkili, özgül olmayan RNaz inhibitörüdür. Karsinojenik olduğu için kullanılırken dikkat edilmelidir. Elektroforezde kullanılan jel yatağı, tarak ve elektroforez tankı önce deterjanla yıkanıp ardından yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan DEPC'li su ile durulandı.

4. BULGULAR

4.1. *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

4.1.1. Arpa Dokularına Gen Aktarımı

Arpanın Tokak 157/37 çeşidinden 94, Golden promise çeşidinden 60 embriyoya EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımı yapıldı. Tokak 157/37 bitkilerinin Golden promise'e göre daha yeşil ve uzun sürgünler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). 30 günün sonunda Tokak157/37 çeşidinde 20; Golden promise çeşidinde ise 7 transformant bitki elde edildi (Tablo 4.1).



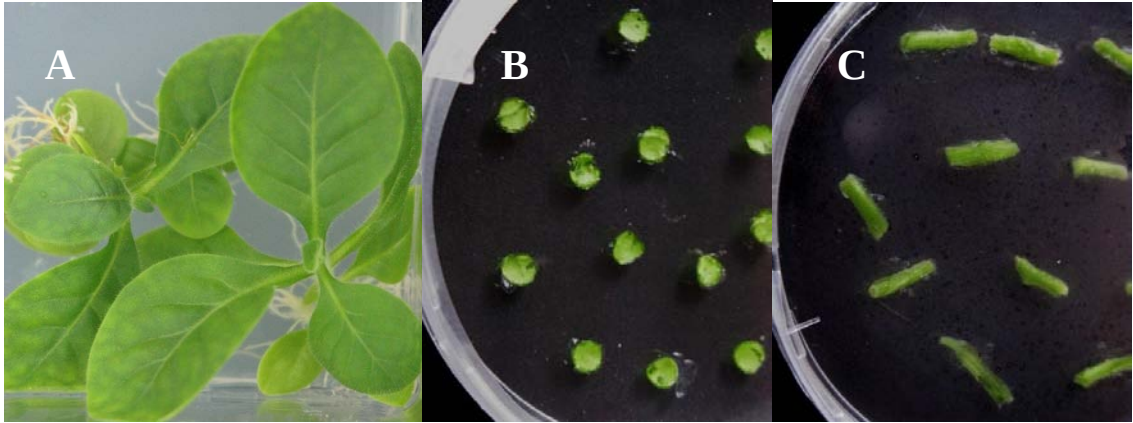
Şekil 4.1: Tokak 157/37 ve Golden promise çeşitlerine ait 30 günlük bitkilerin seçici besiyerindeki (MS+25 mg/l genetisin+200 mg/l sefotaksim) görünüşleri. A: Golden promise kontrol bitkileri; B: Golden promise transformant bitkiler; C: Tokak 157/37 kontrol bitkileri; D: Tokak 157/37 transformant bitkiler

Tablo 4.1: Golden promise ve Tokak 157/37 çeşitlerine ait sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler ile 30 gün sonunda canlı kalan bitkilerin sayısı

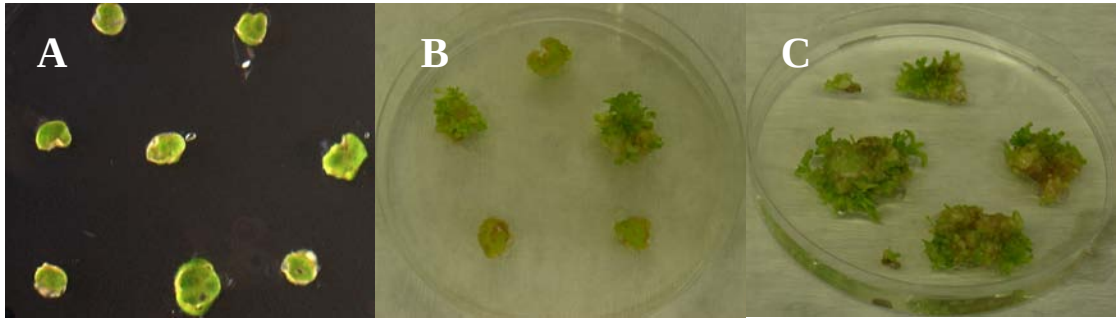
	Toplam embriyo sayısı	Sürgün ve kök gelişimi gösteren bitki sayısı	Seçici besiyerinde yeşil kalan bitki sayısı (%)
Golden promise transformasyon	60	28	7 (11,6)
Golden promise kontrol	30	13	-
Tokak 157/37 transformasyon	94	47	20 (21,2)
Tokak 157/37 kontrol	30	14	-

4.1.2. Tütün Gen Aktarımı

Tütün bitkisine gen aktarımında Samsun çeşidinin tohumlarından MS besiyerinde çimlendirilmiş 5-6 haftalık bitki eksplantları kullanıldı. Bu bitkilerden 74 yaprak diski ve 17 gövde eksplantı çıkartıldıktan sonra (Şekil 4.2) Malzeme ve Yöntemde açıklanan şekilde 3 mg/l BAP+0,1 mg/l NAA+200 mg/l sefotaksim+25 mg/l genetisin içeren MS besiyerlerinde kültürlendi.



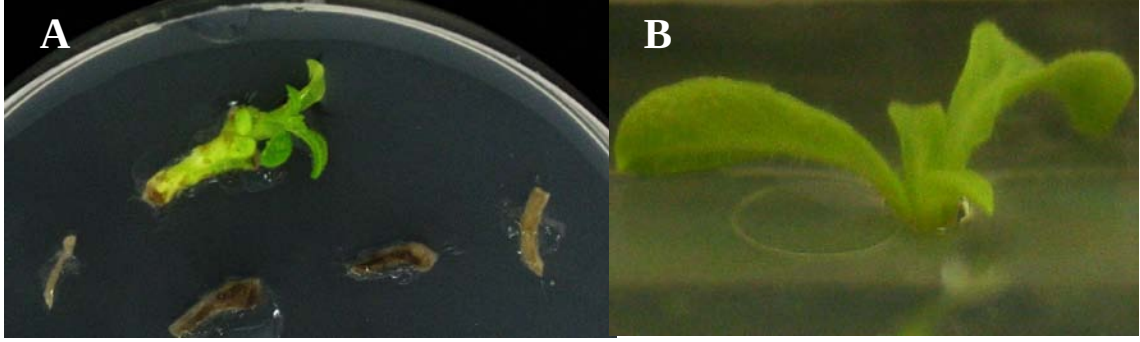
Şekil 4.2: A: Beş haftalık tütün bitkilerinin MS besiyerindeki görünüşleri; Eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkiler: B: Transformasyonda kullanılan yaprak diskleri; C: Transformasyonda kullanılan gövde eksplantları



Şekil 4.3: Transforme edilen yaprak disklerinin seçici besiyerindeki görünüşleri. A: 7 günlük; B: 30 günlük; C: 35 günlük yaprak diskleri

Transformasyondan 7 gün sonra, seçici besiyerindeki 74 yaprak diskinden 22'si sararmış renkte gözlenirken, 30 günün sonunda disklerin 42/74'ünde yeşil görünüm korundu (Şekil 4.3).

Transforme edilen 17 gövde eksplantının altısı yeşil kalarak bölünmeye devam etti. Gövde eksplantlarından ayrılan nodüller 200 mg/l sefotaksim+25 mg/l genetisin içeren MS besiyerinde sürgün gelişimi gösterdi (Şekil 4.4). Tüm çalışmaların özeti Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4: Transforme edilen gövde eksplantlarının seçici besiyerindeki görünüşleri. A: 10 günlük; B: 20 günlük gövde eksplantı

Tablo 4.2: Gen aktarımı yapılan tütün eksplantlarının seçici besiyerindeki durumları

	<i>Eksplant Tipi</i>	
	Yaprak diski	Gövde parçaları
Gen aktarımı yapılan eksplant sayısı	74	17
Seçici besiyerinde canlı kalan eksplant sayısı	42	6

4.2. TRANSGEN ANLATIMI ANALİZLERİ

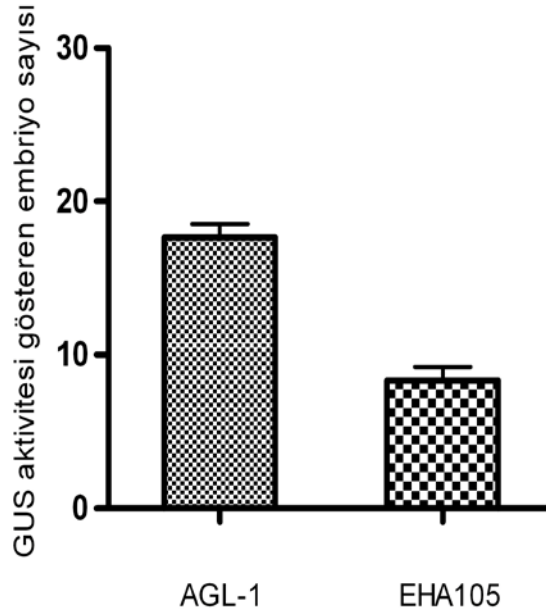
4.2.1. Histokimyasal Analizler

4.2.1.1. Arpada Yapılan Histokimyasal Analizler

A. tumefaciens AGL-1 ve EHA105 ırklarının transformasyon etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla arpanın Tokak 157/37 çeşidine ait olgun embriyolara gen aktarımı yapıldı ve 3 gün karanlıkta bitki büyütme kabininde kültürlendikten sonra bitkiciklere GUS histokimyasal analizi uygulandı (Şekil 4.5). AGL-1 ve EHA105 ırkında elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da verildi. Unpaired T testiyle; AGL-1 ırkında gözlenen GUS aktivitesinin EHA105 ırkına göre anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($P < 0,05$).

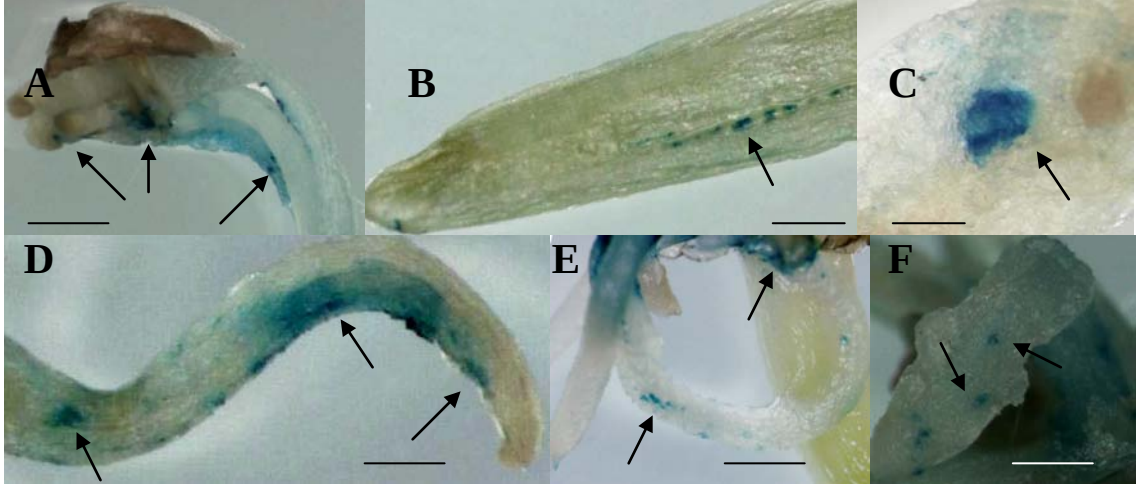


Şekil 4.5: Arpa Tokak 157/37 çeşidinin farklı *Agrobacterium tumefaciens* ırklarıyla transformasyonundan sonra bitkiciklerde mavi boyanan bölgelerin görünümü. A: EHA105 ırkı; B: AGL-1 ırkı (Bar: 1cm)

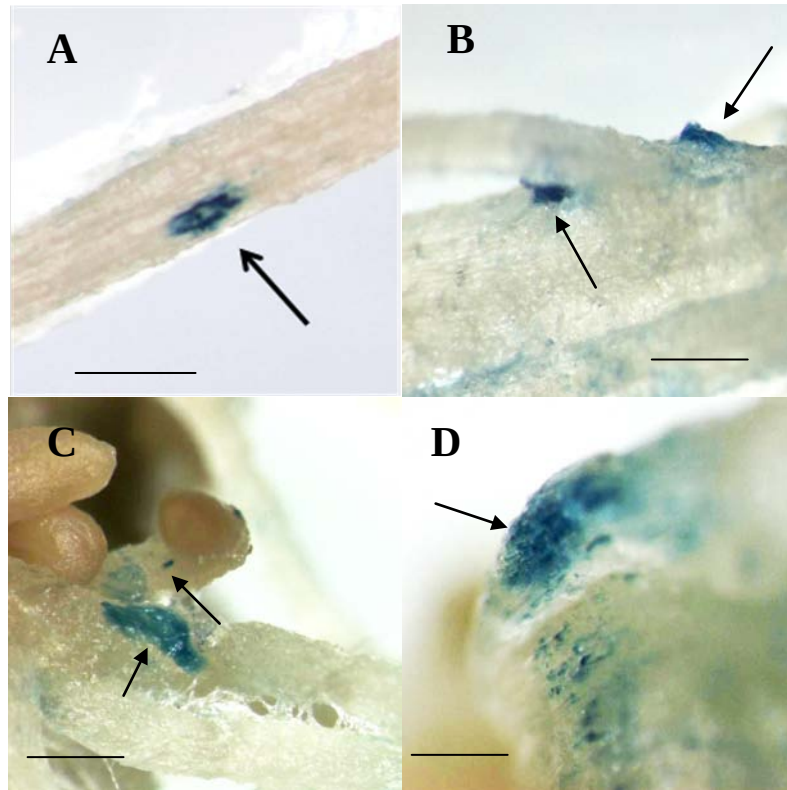


Şekil 4.6: *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 ve EHA105 ırklarıyla transforme edilen Tokak 157/37 çeşidinde gözlenen GUS aktivitesi. Deneyler her birinde 30 embriyo olacak şekilde 3 tekrarlı yapılmıştır (AGL-1: $17,67 \pm 0,8819$; EHA105: $8,333 \pm 0,8819$; P değeri: 0,0017).

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de Tokak 157/37 çeşidinin AGL-1 ve EHA105 ırklarıyla transformasyonun ardından GUS gen anlatımının gözlemlendiği bitkiciklerinin stereo mikroskopta çekilen fotoğrafları görülmektedir.



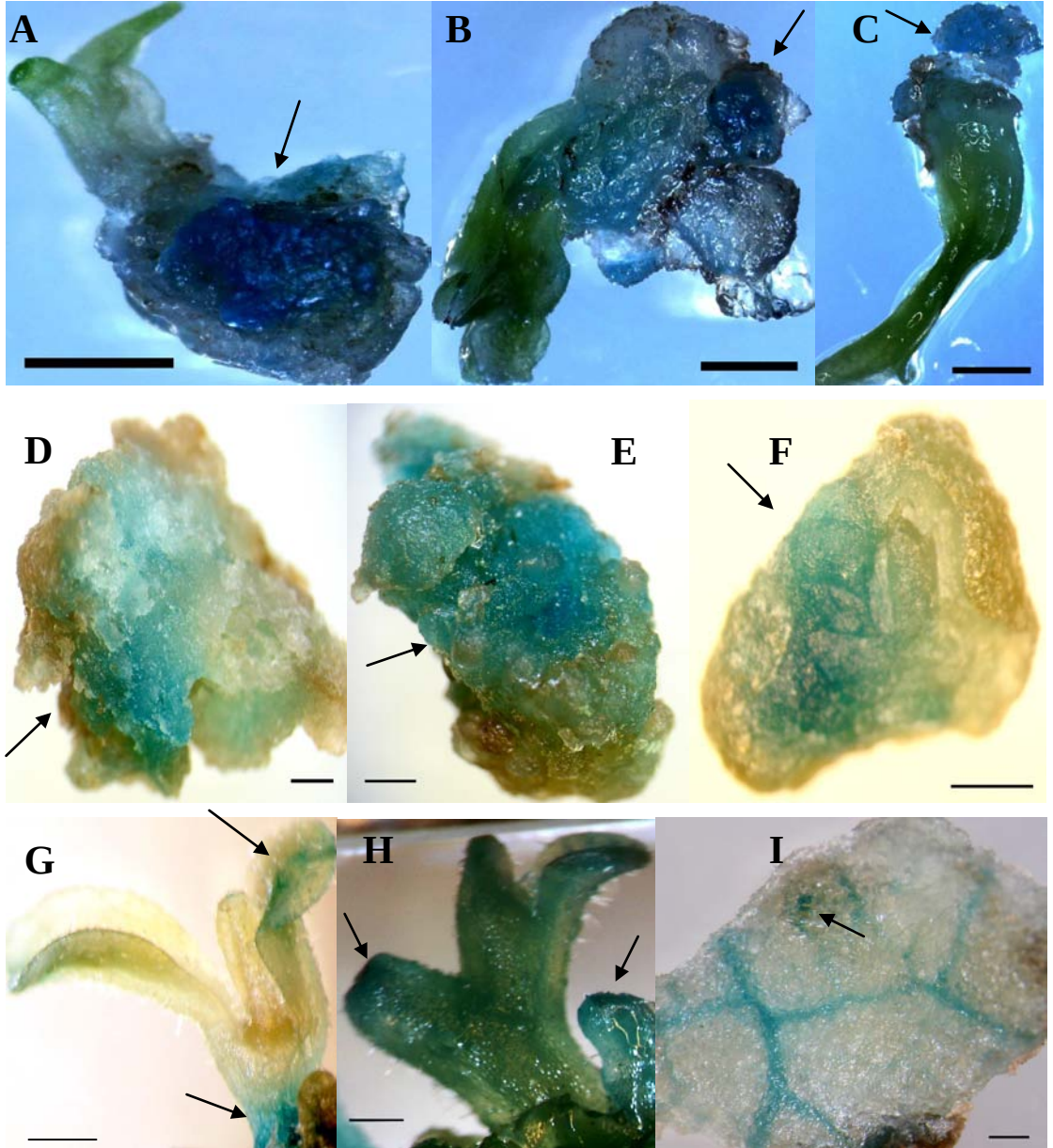
Şekil 4.7: Tokak 157/37 çeşidine AGL-1 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri. A-B: Sürgünde; C-D-E-F: Kökte GUS gen anlatımı yapan bölgeler (Bar: 0,2 cm)



Şekil 4.8: Tokak 157/37 çeşidine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri. A: Sürgünde; B-C-D: Kökte GUS gen anlatımı yapan bölgeler (Bar: 0,2 cm)

4.2.1.2. Tütünde Yapılan Histokimyasal Analizler

Tütün Samsun çeşidine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından 30 gün sonra aktarılan markır genin (GUS) etkinliğini ortaya koymak için kallus ve yaprak eksplantları GUS boyama çözeltisine konulup gece boyunca 37°C’de inkübe edildikten sonra stereo mikroskop altında incelendi. Tütünde test edilen tüm yaprak ve kalluslarda değişen yoğunluklarda mavi bölgeler gözlemlendi (Şekil 4.9).

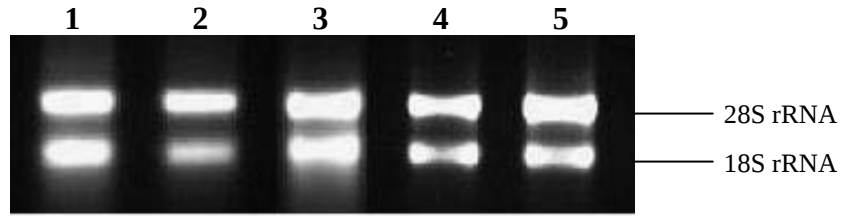


Şekil 4.9: Tütün bitkisine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından sonra GUS boyama çözeltisiyle boyanan bölgelerin stereo mikroskop altındaki görünüşleri. A-B-C-D-E-F: Kallus dokusunda; G-H: Bitkide; I: Yaprakta GUS gen anlatımı yapan bölgeler (Bar: 0,2 cm)

4.2.2. Moleküler Analizler

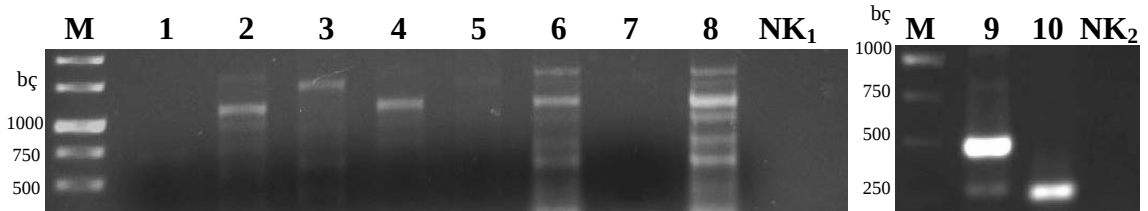
Arpa bitkisinin Golden promise ve Tokak 157/37 çeşitlerine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından 30 gün sonra transgen anlatımının belirlenmesi amacıyla kontrol bitkilerinden ve transforme edilen bitkilerden izole edilen total RNA'ların nicel ve nitel analizleri yapıldı. Bu RNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranı 1,7-2,0 arasında bulundu. Total RNA'ların izolasyon sırasında yıkılmadıkları ve DNA kontaminasyonu olmadığı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterildi.

İzole edilen RNA'ların miktarları Bölüm 3.5.2'de belirtildiği gibi hesaplandı ve final konsantrasyonları 1 µg olacak şekilde, Tablo 3.4'te belirtilen özgün primerlerle tek aşamalı RT-PZR'leri gerçekleştirildi. Ardından %1'lik agaroz jelde görüntülendi.



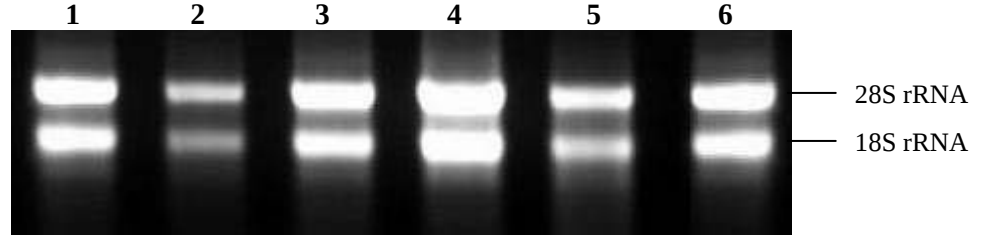
Şekil 4.10: Golden promise çeşidi (1) kontrol bitkisinden ve (2-5) transforme edilen bitkilerden izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri

Golden promise çeşidinden izole edilen RNA'ların (Şekil 4.10) RT-PZR'leri sonucunda GUS ve NPT II genleri ile kontrol olarak aktin geni çoğaltıldı (Şekil 4.11). RT-PZR analizi yapılan 9 bitkinin 4'ünde GUS, 2'sinde NPT II gen anlatımı tespit edildi (Şekillerde, analiz edilen 9 bitkiden olumlu sonuçların gözlemlendiği bitkiler gösterilmektedir).



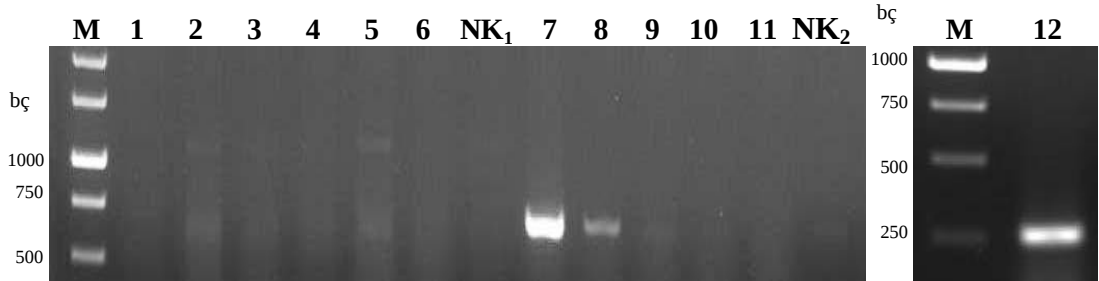
Şekil 4.11: Golden promise çeşidine ait RNA'ların RT-PZR'si sonrasında çoğaltılan genlerin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri. M: Markır; 1: Transformant bitki NPT II geni; 2: Transformant bitki GUS geni; 3: Transformant bitki NPT II geni; 4: Transformant bitki GUS geni; 5: NPT II geni negatif sonuç; 6: Transformant bitki GUS geni; 7: NPT II geni negatif sonuç; 8: Transformant bitki GUS geni; NK₁: Negatif kontrol (GUS geni); 9: RT-PZR kiti pozitif kontrolü; 10: Kontrol bitkisi aktin geni; NK₂: Negatif kontrol (NPT II geni)

GUS: 1,2 kb, NPT II: 0,7 kb, Aktin: 0,25 kb, RT-PZR kiti pozitif kontrolü: 0,46 kb



Şekil 4.12: Tokak 157/37 çeşidi (1) kontrol bitkisinden ve (2-6) transforme edilen bitkilerden izole edilen total RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri

Tokak 157/37 çeşidine ait izole edilen RNA'ların (Şekil 4.12) RT-PZR'leri sonucu toplam 9 bitkinin 3'ünde GUS ve NPT II genlerinin anlatım yaptığı belirlendi (Şekil 4.13). RT-PZR'de VirB11+21 ve VirG15 primerleri de kullanılarak *Agrobacterium* kontaminasyonunun olmadığı gösterildi (Şekil 4.13; 1 no'lu kuyu). Tokak 157/37'de GUS gen anlatımının düşük düzeyde olduğu buna karşın NPT II geninin Şekil 4.13; 7 no'lu transformant bitkide yüksek düzeyde anlatım yaptığı tespit edildi (Şekillerde, analiz edilen 9 bitkiden olumlu sonuçların gözlemlendiği bitkiler gösterilmektedir).



Şekil 4.13: Tokak 157/37 çeşidine ait RNA'ların RT-PZR'si sonrasında çoğaltılan genlerin %1'lik agaroz jeldeki görünüşleri. M: Markır; 1: VirB11+21 ve VirG15 primerleri negatif sonuç; 2: Transformant bitki GUS geni; 3: Transformant bitki GUS geni; 4: GUS geni negatif sonuç; 5: Transformant bitki GUS geni; 6: GUS geni negatif sonuç; NK₁: Negatif kontrol (GUS geni); 7: Transformant bitki NPT II geni; 8: Transformant bitki NPT II geni; 9: Transformant bitki NPT II geni; 10: NPT II geni negatif sonuç; 11: NPT II geni negatif sonuç; NK₂:Negatif kontrol (NPT II geni); 12: Kontrol bitkisi aktin geni

GUS: 1,2 kb, NPT II: 0,7 kb, Aktin: 0,25 kb, VirB11+21 ve VirG15: 0,246 kb

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada model bitkilerden, monokotil bir bitki olan arpaya ve dikotil bir bitki olan tütüne *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla markır genler aktarıldı ve bu genlerin anlatımları histokimyasal ve moleküler düzeyde incelendi.

Toplam 94 Tokak 157/37 ve 60 Golden promise embriyosuna *Agrobacterium*'un iki farklı ırkı (EHA105 ve AGL-1) ile GUS ve NPT II genleri aktarıldı. Seleksiyon şartlarındaki canlılıkları açısından kullanılan iki arpa genotipinde farklılık gözlemlendi. Her iki genotipte kontrol bitkilerde %50 oranında organ gelişimi gözlenmesine karşın, 30 günün sonunda bu bitkiler tamamen sararıp kurudu. Transformant bitkilerde ise 30. günün sonunda Golden promise'de %11,6, Tokak 157/37'de %21,2 oranında bitkide yeşil görünüm korundu. Bu oranlar bitki dokularında NPT II anlatımı yapmaya devam eden hücrelerin varlığını düşündürmektedir. Literatürde Golden promise ile yapılan çalışmalarda olgunlaşmamış embriyo kökenli kallusların organogenezi ile transgenik klonal bitkiler elde edilmektedir. Bu bitkilerin elde edilme oranı 100 embriyo başına 7-86 arasındadır (Hensel ve diğ., 2008). Çalışmamızda izlediğimiz yol ise olgun embriyo dokusuna doğrudan gen aktarımı yapılarak seleksiyon ile transformant olmayan hücrelerin elimine edilmesi şeklindedir. Bu açıdan yerel bir çeşit olan Tokak 157/37'nin Golden promise'e göre seleksiyon şartlarındaki yanıtının farklı olduğu söylenebilir. Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir tez çalışmasında (Karakaş, 2005) 30 gün sonunda seleksiyon besiyerindeki bitkilerin tamamen sarardığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ko-kültürleme aşamasında kullanılan sistein, bakterinin neden olduğu nekrozu azaltarak sağlıklı bitkilerin gelişiminde etkili olmuş olabilir.

Tez çalışmasında transgen anlatımlarının belirlenmesinde güvenilir bir yol olan histokimyasal analizler kullanılmıştır. Bu analizlerde test çözeltisine eklenen %20 metanol, olası endojen GUS aktivitesini tamamen baskılayarak doğru sonuçların eldesine olanak vermektedir. Histokimyasal analizlerde ilk karşılaştırma *Agrobacterium*'un EHA105 ve AGL-1 ırklarının transformasyon üzerindeki etkinliğidir.

Buna göre, AGL-1 ırkı kullanıldığında gen aktarım frekansı bariz şekilde artmıştır (Şekil 4.6). Bu özellikle dokulardaki histokimyasal analizlerde de (Şekil 4.5 A ve B) görülebilir. EHA105 uygulanan embriyolardan gelişen dokularda GUS aktivitesi zayıf ve daha az sayıda doku parçasında gözlenirken, AGL-1’de daha güçlü bir mavi renk yoğunluğu elde edilmiştir. AGL-1 ile elde edilen transformantların sürgün ve köklerindeki bu mavi renkli bölgeler daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında (Karakaş, 2005) daha yoğun ve belirgindir. Tahıllar arasında mısırdan EHA101 ve EHA105’in; arpa ve buğdayda ise AGL-0 ve AGL-1’in transformasyon için tercih edildiği görülmektedir (Hensel ve diğ., 2008). Ancak arpada EHA101 ve LBA4404’ün kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Wu ve diğ., 1998). Gerek AGL-1 gerekse EHA105, EHA101 ırkından türevlenmiştir (Cheng ve diğ., 2004) ve bu ırklarda sürekli anlatım yapan mutant *VirG* nin varlığı onlara süpervirulent ırk olma niteliği kazandırmıştır. Arpada yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu AGL-0 ve AGL-1 ırklarıyla yapıldığından ilk kez bu çalışmada EHA105 ile AGL-1’in karşılaştırılması, ırkların transformasyon verimindeki önemini kanıtlamaktadır.

Çalışmada transgen anlatımının moleküler düzeyde analizinde Ters transkriptaz PZR’nin kullanımı tercih edilmiştir. Bu yöntem hızlı, az maliyetli ve güçlü bir tekniktir. En önemli olumsuz yönü ise tüm bitki dokusunun kullanımı sonucu elde edilen materyalinin kaybıdır. Bu nedenle birçok tahıl transformasyon yönteminde tercih edilmediği görülür. Çalışmamızda test edilen Golden promise ve Tokak 157/37 bitkilerinin çoğunluğunda GUS ve NPT II genlerinin anlatımı tespit edilmiştir. Bu genotipler arasındaki en önemli fark GUS geni anlatım düzeyinin Tokak 157/37’de daha düşük olmasıdır. Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.11 ve Şekil 4.13) seleksiyon şartlarına dayanıklılık ve histokimyasal analiz gözlemlerinden anlaşıldığı gibi dokularda transformant hücrelerin varlığını ve gen anlatımının devam ettiğini düşündürmektedir.

Diğer model bitki olan tütün *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir bitkidir. Bu bitkiye gen aktarımı birçok tahıl bitkisine göre daha kolay gerçekleşmektedir. Çalışmamızda tütünün Samsun çeşidinin yaprak disklerine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımından 30 gün sonra test edilen tüm yaprak ve kalluslarda GUS gen anlatımı gözlenmiştir. Bu durum EHA105 ırkının gen aktarım etkinliğinin dikotil ve monokotil bitkilerdeki farklılığını da ortaya koymaktadır. Dung

ve diğ. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, tütünün K326 çeşidine ait yaprak disklerine EHA105 ırkı aracılığıyla gen aktarımı yapılmış ve analiz edilen kallus ve sürgünlerde %60-70 oranında GUS aktivitesi gözlenmiştir. Li ve diğ. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise tütün bitkisinin Petite Havana çeşidinin yaprak eksplantlarına GV3850 ırkı aracılığıyla gen aktarımı yapılmış ve eksplantların %35,1'inin GUS aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmamızda standart yöntemden farklı olarak, infiltrasyon besiyerine 200 μ M asetosiringon eklenmesi bakteri-konak hücre etkileşimini artırarak yüksek transformasyon etkinliğine neden olmuş olabilir.

Transgen anlatımlarının histokimyasal ve moleküler analizinin yapılması transformasyon çalışmasının verimini ölçmek açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada ilk kez laboratuvarımızda model olarak kullanılan arpa bitkisinde, transgenlerin anlatımı RT-PZR yöntemiyle belirlenmiştir. Kullanılan yöntemler ileride arpada gen işlevleri üzerinde yapılacak çalışmalara katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

ANONİM, 2010a, *Hordeum vulgare* L. Taxonomic Hierarchy [online], Itis Report http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=40874 [Ziyaret Tarihi: 2 Mayıs 2010].

ANONİM, 2010b, *World Barley Production, Consumption, and Stocks* [online], United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=378&hidReportRetrievalTemplateID=7> [Ziyaret Tarihi: 4 Nisan 2010].

ANONİM, 2010c, *dbEST: database of "Expressed Sequence Tags"* [online], NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html [Ziyaret Tarihi: 16 Nisan 2010].

ANONİM, 2010d, *Nicotiana tabacum* L. Taxonomic Hierarchy [online], Itis Report <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> [Ziyaret Tarihi: 2 Mayıs 2010].

ANONİM, 2010e, *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* [online], Fermentas, http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_sm0311.pdf [Ziyaret Tarihi: 2 Mayıs 2010].

ARI, Ş., 1991, *X ve gamma ışınlarının arpa doku kültürlerine etkileri*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

BARTON, K.A., BINNS, A.N., MATZKE, A.J.M., CHILTON, M.D., 1983, Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny, *Cell*, 32 (4), 1033-1043.

BELOGRADOVA, K., LEWICKA, I., HEBERLE-BORS, E., TOURAEV, A., 2009, *An Overview on Tobacco Doubled Haploids*, *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Advances in haploid production in higher plants, Springer, Netherlands, 75-85.

BENNETT, M.D., SMITH, J.B., 1976, Nuclear DNA amounts in angiosperms, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 227-274.

BEVAN, M.W., 1984, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucleic Acids Research*, 12, 8711-8721.

BİLGE, E., ORALER, G., GÖZÜKIRMIZI, N., OLGUN, A., TOPAKTAŞ, M., 1981, Experimental mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.), *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası*, Seri B 46, 29-35.

BOTHMER, R.V., JACOBSEN, N., BADEN, C., JORGENSEN, R.B., LINDE LAURSEN, I., 1995, *An ecogeographical study of the genus Hordeum*, 2nd edition, Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 92-9043-229-2.

BUNDOCK, P., DEN DULK-RAS, A., BEIJERSBERGEN, A., HOOYKAAS, P.J., 1995, Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*, *The EMBO Journal*, 14 (13), 3206-3214.

CANGELOSI, G.A., ANKENBAUER, R.G., NESTER, E.W., 1990, Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6708-6712.

CHEN, X., STONE, M., SCHLAGNHAUFER, C., ROMAINE, C.P., 2000, A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10), 4510-4513.

CHENG, M., FRY, J.E., PANG, S., ZHOU, H., HIRONAKA, C.M., DUNCAN, D.R., CONNER, T.W., WAN, Y., 1997, Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Physiology*, 115, 971-980.

CHENG, M., LOWE, B.A., SPENCER, T.M., YE, X., ARMSTRONG, C.L., 2004, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 31-45.

CHILTON, M.D., DRUMMOND, M.H., MERIO, D.J., SCIAKY, D., MONTOYA, A.L., GORDON, M.P., NESTER, E.W., 1977, Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis, *Cell*, 11, 263-271.

CHILTON, M.D., SAIKI, R.K., YADAV, N., GORDON, M.P., QUETIER, F., 1980, T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (7), 4060-4064.

CORONADO, M.J., HENSEL, G., BROEDERS, S., OTTO, I., KUMLEHN, J., 2005, Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 591-599.

DE CLEENE, M., DE LEY, J., 1976, The host range of crown gall, *Botanical Review*, 42, 389-466.

DE FRAMOND, A.J., BARTON, K.A., CHILTON, M.D., 1983, Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering, *Biotechnology*, 1, 262-269.

DE GROOT, M.J., BUNDOCK, P., HOOYKAAS, P.J., BEIJERSBERGEN, A.G., 1998, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi, *Nature Biotechnology*, 16 (9), 839-842.

DUNG, T.T., DUC, L.T., HO, H.H., UYEN, N.V., 2006, *Agrobacterium*-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance, *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*, 20-21 October 2006 Nong Lam University Ho Chi Minh City, 156-160.

FINNIE, C., STEENHOLDT, T., ORIOL, R.N., SØREN, K., JØRGEN, L., HENRIK, B.P., PREBEN, B.H., OLE, O., BIRTE, S., 2004, Environmental and transgene expression effects on the barley seed proteome, *Phytochemistry*, 65 (11), 1619-1627.

FLAVELL, R., 2009, *Role of Model Plant Species*, Plant genomics, Humana Press, Springer Science+Business Media, New York, 1-18.

GOEDEKE, S., HENSEL, G., KAPUSI, E., GAHRTZ, M., KUMLEHN, J., 2007, Transgenic barley in fundamental research and biotechnology, *Transgenic Plant Journal*, 1, 104-117.

GÖZÜKIRMIZI, N., 2003, Pioneering biotechnological works on *Hordeum vulgare* L. cvs performed in collaboration with the Istanbul University Biology Department and the TUBITAK Research Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, *Turkish Journal Of Botany*, 27, 243-248.

GÜREL, F., 1997, *Monokotil bitkilerde transformasyon çalışmaları*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 2000, Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation, *Plant Cell Reports*, 19, 787-791.

GÜREL, F., KARAKAŞ, Ö., ALBAYRAK, G., ARI, Ş., 2009, Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Acta Biologica Hungarica*, 60 (3), 309-319.

HANSCH, R., KOPREK, T., MENDEL, R.R., SCHULZE, J., 1995, An improved protocol for eliminating endogenous β -glucuronidase background in barley, *Plant Science*, 105, 63-69.

HENSEL, G., VALKOV, V., MIDDLEFELL, W.J., KUMLEHN, J., 2008, Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions, *Journal of Plant Physiology*, 165 (1), 71-82.

HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R., HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A., 1983, A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid, *Nature*, 303, 179-180.

- HOLME, I.B., BRINCH-PEDERSEN, H., LANGE, M., HOLM, P.B., 2006, Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules, *Plant Cell Reports*, 25 (12), 1325-1335.
- HOLME, I.B., BRINCH-PEDERSEN, H., LANGE, M., HOLM, P.B., 2008, Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules, *Plant Cell Reports*, 27, 1833-1840.
- JAEHNE, A., BECKER, D., BRETTSCHEIDER, H., LOERZ, H., 1994, Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley, *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 525-533.
- JEFFERSON, R.A., 1987a, Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system, *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387-405.
- JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A., BEVAN, M.W., 1987b, GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *The EMBO Journal*, 6 (13), 3901-3907.
- JEFFERSON, R.A., WILSON, K.J., 1991, The GUS gene fusion system, *Plant Molecular Biology Manual*, B14, 1-33.
- KARAKAŞ, Ö., 2005, *Arpada gen aktarım frekansının artırılmasına yönelik çalışmalar*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KOSUGI, S., OHASHI, Y., NAKAJIMA, K., ARAI, Y., 1990, An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppressed endogenous β -glucuronidase activity, *Plant Science*, 70, 133-140.
- KUMLEHN, J., SERAZETDINOVA, L., HENSEL, G., BECKER, D., LOERZ, H., 2006, Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Biotechnology Journal*, 4 (2), 251-261.
- KUNIK, T., TZFIRA, T., KAPULNIK, Y., GAFNI, Y., DINGWALL, C., CITOVSKY, V., 2001, Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (4), 1871-1876.
- LANGE, M., VINCZE, E., MØLLER, M.G., HOLM, P.B., 2006, Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Reports*, 25 (8), 815-820.
- LAZZERI, P.A., 1995, *Stable transformation of barley via direct DNA uptake; electroporation- and PEG- mediated protoplast transformation*, Methods in molecular biology; plant gene transfer and expression protocols, Humana Press, New Jersey, 95-106.

LI, B., XIE, C., QIU, H., 2009, Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency, *Plant Cell Reports*, 28, 373-386.

MATTHEWS, P.R., WANG, M.B., WATERHOUSE, P.M., THORNTON, S., FIEG, S.J., GUBLER, F., 2001, Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector, *Molecular Breeding*, 7, 195-202.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.

NAGATA, T., NEMOTO, Y., HASEZAWA, S., 1992, Tobacco BY-2 cells as the "HeLa" cells in the cell biology of higher plants, *International Review of Cytology*, 132, 1-30.

PIERS, K.L., HEATH, J.D., LIANG, X., STEPHENS, K.M., NESTER, E.W., 1996, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (4), 1613-1618.

RHO, H.S., KANG, S., LEE, Y.E., 2001, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*, *Molecules and Cells*, 12 (3), 407-411.

SALVO-GARRIDO, H., TRAVELLA, S., BILHAM, L.J., HARWOOD, W.A., SNAPE, J.W., 2004, The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping, *Genetics*, 167 (3), 1371-1379.

SATO, K., SHIN, I.T., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YOSHIDA, H., TAKEDA, K., YAMAZAKI, Y., CONTE, M., KOHARA, Y., 2009, Development of 5006 full-length CDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources, *DNA Research*, 16 (2), 81-89.

SAWASAKI, Y., INOMATA, K., YOSHIDA, K., 1996, Trans-kingdom conjugation between *Agrobacterium tumefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*, a bacterium and a yeast, *Plant and Cell Physiology*, 37 (1), 103-106.

SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, K., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P., STEIN, N., 2009, The international barley sequencing consortium—at the threshold of efficient access to the barley genome, *Plant Physiology*, 149 (1), 142-147.

SHENG, J., CITOVSKY, V., 1996, *Agrobacterium*-plant cell interaction: have virulence proteins, will travel, *Plant Cell*, 8, 1699-1710.

SHEWRY, P.R., 1992, *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*, Oxford: The Alden Press, CAB International, 085198-725-7.

SKOOG, F., MILLER, C.O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro, *Symposium of the Society of Experimental Biology*, 54 (11), 118-131.

SREENIVASULU, N., GRANER, A., WOBUS, U., 2008, Barley genomics: an overview, *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1-13.

STACHEL, S.E., NESTER, E.W., ZAMBRYSKI, P.C., 1986, A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 379-383.

STAHL, R., HORVATH, H., VAN FLEET, J., VOETZ, M., VON WETTSTEIN, D., WOLF, N., 2002, T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (4), 2146-2151.

TINGAY, S., MCELROY, D., KALLA, R., FIEG, S., WANG, M., THORNTON, S., BRETTELL, R., 1997, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation, *The Plant Journal*, 11, 1369-1376.

TRIFONOVA, A., MADSEN, S., OLESEN, A., 2001, *Agrobacterium* mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions, *Plant Science*, 161, 871-880.

VAN HAUTE, E., JOOS, H., MAES, M., WARREN, G., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1983, Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*, *The EMBO Journal*, 2, 411-417.

WAN, Y., LEMAUX, P.G., 1994, Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants, *Plant Physiology*, 104 (1), 37-48.

WANG, Y., GABA, V., WOLF, D., XIA, X.D., ZELCER, A., GAL-ON, A., 2000, Identification of a novel plant virus promoter using a potyvirus infectious clone, *Virus Genes*, 20 (1), 11-17.

WANG, M.B., ABBOTT, D.C., UPADHYAYA, N.M., JACOBSEN, J.V., WATERHOUSE, P.M., 2001, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes, *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 149-156.

WILLMITZER, L., DE BEUCKELEER, M., LEMMERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1980, DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells, *Nature*, 287, 359-361.

WU, H., MCCORMAC, A.C., ELLIOTT, M.C., CHEN, D.F., 1998, *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 161-171.

YAO, Q.A., SIMION, E., WILLIAM, M., KROCHKO, J., KASHA, K.J., 1997, Biolistic transformation of haploid isolated microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Genome*, 40, 570-581.

ZHANG, S., CHO, M.J., KOPREK, T., YUN, R., BREGITZER, P., LEMAUX, P.G., 1999, Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings, *Plant Cell Reports*, 18, 959-966.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul'da doğdu. Liseyi 2001 yılında Hacı Sabancı Lisesinde tamamladı. Lisans diplomasını 2007 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden aldı. 2008 bahar yarıyılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans'a başladı.