

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

HERBİSİTLERE TOLERANSLI TRANSGENİK BUĞDAY (Triticum sp.) ÇEŞİTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Doç. Dr. Selma ONARICI

Murat AYCAN

Deniz KÖM

Mustafa KAYAN

14A0447002

07.05.2014

07.05.2018

18.07.2018

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2018 "

U.M.B

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

HERBİSLERE TOLERANSLI TRANSGENİK BUĞDAY (Triticum sp.) ÇEŞİTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Özet

Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak herhangi bir organizmadan izole edilen bir gen istenen bir organizmaya aktarılabilimekte, bu şekilde ıslahın temelini oluşturan genetik çeşitliliğin artışı sağlanmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarda bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium tumefaciens*, en çok kullanılan yöntemdir. Buğday, insan beslenmesinde kullanılan bitkiler arasında ekiliş ve üretim bakımından dünyada ilk sırada yer almaktadır. Buğday tanesi uygun besleme değeri, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle yaklaşık 50 ülkenin temel besini durumundadır. Buğday başta unlu mamuller olmak üzere birçok gıda ve sanayi sektöründe kullanılmaktadır. Bu nedenle, gerek klasik ve gerekse modern biyoteknolojik tekniklerle yeni buğday genotiplerinin geliştirilmesi ve insanların kullanımına sunulması son derece önemli ve değerlidir. Buğdayda biyoteknolojik teknikler kullanılarak yapılan gen aktarımındaki başarı oranı, %0.1-0.01 arasındadır. Bir başka deyişle, gen aktarım çalışmaları sonucu transgenik (yabancı bir genin genoma yerleştirildiği) bir buğday elde etme olasılığı, 1/1000 ile 1 / 10 000 arasında değişmektedir. Bu ise, yabancı bir genin buğday genomuna entegre edilmesinin ne denli zor olduğunu göstermektedir. Buğdayın insan beslenmesindeki yeri düşünüldüğünde, bu bitkinin birim alan verimini düşüren biyotik (hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk) stres faktörlerine karşı dayanıklılığını artıracak tarımsal bir genin bitki genomuna yerleştirilmesi yönünde yapılacak herhangi bir çalışmanın ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Projede, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla ekmeklik ve makarnalık buğdaya aktarılacak *bar* geni ile 'glifosinat amonyum' herbisite toleranslı transgenik buğday çeşitlerinin geliştirilmesine çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, buğday, herbisite tolerans

IMPROVING TRANSGENIC WHEAT (Triticum sp.) CULTIVARS TOLERANT TO HERBICIDES

Abstract

Using biotechnological methods, a gene isolated from any organism can be transferred to a desired organism, thereby increasing the genetic diversity that underpins the breeding. *Agrobacterium tumefaciens* is the most widely used method for gene transfer to plants in biotechnological. Wheat is ranked first in cultivation among plants in the whole world in terms of planting and production used for human nutrition. The grain of wheat is the basic nutrient of about 50 countries due to its convenient nutritive value, storage and handling convenience. Wheat is mainly used in many food and industrial sectors, including bakery products. For this reason, it is extremely important and valuable to develop new wheat genotypes by the help of classic and modern biotechnological techniques and to make them available to use for the people. The success rate of gene transfer using biotechnological techniques in wheat is between 0.1-0.01%. In other words, as a result of a gene transfer studies, the probability of obtaining a transgenic wheat (a genetic locus of a foreign gene) is between 1/1000 and 1 / 10,000. This shows how difficult it is to integrate a foreign genome into the wheat genome. When considering the place of wheat in human nutrition, it becomes clear how important it is for any plant to be placed in the plant genome that will increase its resistance to biotic (diseases and pests) and abiotic (high and low temperature, drought, salinity) stress factors, which reduce the yields by unit of area. In the project, the development of transgenic wheat varieties tolerant to 'glyphosate ammonium' herbicide by transferring the *bar* gene to *Triticum aestivum* and *Triticum durum* through *Agrobacterium tumefaciens* has been studied.



Key Words: *Agrobacterium tumefaciens*, wheat, herbicide tolerans

II. Amaç ve Kapsam

Önerilen proje, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bir adet makarnalık ve bir adet ekmeklik buğday (*Triticum* sp.) çeşidine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla herbisite dayanıklılık geninin (*bar*) aktarılmasını amaçlamıştır. Proje kapsamında, buğday genomuna *Agrobacterium tumefaciens*'in 'GV2260 AoPR1-cry1Ac-pTF101.1' hattı kullanılarak 'glifosinat amonyum' herbositine toleransı belirleyen *bar* geni yerleştirilecek ve böylece buğday tarımının yapıldığı bölgelerde yabancı ot mücadeleinde yaygın olarak kullanılan 'glifosinat amonyum' herbositine karşı toleranslı buğday çeşitleri geliştirilecektir.

Bitkiler, yeryüzündeki yaşamın kaynağını oluştururlar. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i bitkisel kaynaklıdır. Geriye kalan enerji ve protein gereksinimi ise hayvansal ürünlerden karşılanmaktadır. Dünyanın birçok bölgesinde her yıl açlık ve yetersiz beslenme nedeniyle binlerce insan ölmektedir. İnsanoğlunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenerek yeryüzündeki varlığını devam ettirebilmesi için; besin maddeleri üretiminin artırılması gerekmektedir. Besin maddeleri içerisinde özellikle bitkisel besin maddeleri üretiminin artırılması büyük önem taşımaktadır. Yeryüzünde karaların kapladığı alanlar 14 milyar hektardır. Halen bu karasal alanın %10'luk kısmında bitkisel üretim yapılmaktadır. Dünya karalarının %20'sini meralar, %20'sini dağlar, %20'sini buzullar, %20'sini ise çöller kaplamaktadır. Geriye kalan %10'luk alan ise çok yüzeysel bir toprak örtüsüne sahiptir. Dağlar ve buzullarla kaplı alanlarda tarımsal faaliyetlerin olanaksız olduğu göz önüne alındığında, geriye potansiyel tarım alanı olarak meralar, çöller veya yetersiz toprak örtüsüne sahip alanlar kalmaktadır. Genellikle engebeli ve çok eğimli alanları kaplayan meraların tarla arazisi olarak kullanılması büyük ölçüde olanaksızdır. Çöllerin ve yetersiz toprak örtüsüne sahip olan alanların tarıma uygun duruma getirilmesi ise büyük yatırım gerektirir. Ayrıca, her yıl artan nüfusa paralel olarak tarım alanlarının amaç dışı kullanıldığı (yerleşim, yol, fabrika vb.) dikkate alındığında, bitkisel üretimin artırılması için tarıma daha fazla alan ayrılamayacağı ortadadır. Bu durumda, bitkisel üretimin artırılması, birim alandan elde edilen verimin artırılmasıyla mümkün olacaktır.

Birim alandan alınan verimin artırılması için bir yandan bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi, bir yandan da yetişirmede kullanılan tarım tekniklerinin (gübreleme, sulama, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi) iyi bir şekilde uygulanması gereklidir. Günümüzde 2.6 dekar olan kişi başına işlenebilir alanın 2050 yılında 1.5 dekara kadar düşeceği beklenmektedir (Vasil, 1998). Son 50 yılda ulaşılan tarımsal verim artışı, modern ıslah yöntemlerinin uygun yetişirme teknikleri ile birlikte kullanılması sonucu elde edilmiştir. Bugüne kadar uygulanan ıslah programlarında daha çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışılmış, kültür bitkilerine hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık

clt. b

kazandırılması ikinci planda kalmıştır. Bugün bitki ıslahının tarımsal üretimin artırmasındaki payı ve önemi tartışılmaz bir gerçekjtir. Klasik ıslah yöntemleri bitkisel üretimin artırılmasında oldukça başarılı olmasına karşın, doğası gereği yavaş ve zaman alıcıdır. Yapılan melezlemelerde bağlılık (linkage) nedeniyle istenilen özelliklerle birlikte istenmeyen birçok özellik de yeni bireye geçebilmektedir. Ayrıca, bu yöntemlerde doğadaki dar sınırlar içerisinde bulunan çeşitlilikten faydalananmak esastır. Günümüzde özellikle insan beslenmesinde önemli yeri olan ürünlerde genetik çeşitliliğin sınırlarına yaklaşılmıştır. Oysa ki, klâsik bitki ıslahı yöntemlerinden beklenen başarı, üzerinde çalışılan populasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, populasyonda var olan genetik çeşitliliğin artırılması gerekmektedir. Populasyon boyutlarındaki artış ise yer, zaman ve maliyet açısından önemli artışlara yol açmaktadır (Özgen ve Türet 1995). Populasyondaki genetik çeşitliliğin artırılması, türler arasındaki uyuşmazlığın kaldırılması, bağlılık engelinin aşilarak yalnız istenilen genin aktarılması, mutasyonlar, protoplast füzyonu, haploid hücre ve bitkilerle mümkündür. İşte, bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde yukarıda açıklamaya çalıştığımız klâsik bitki ıslahının doğasında var olan zorluklar, bitki doku kültürleri ve bitki biyoteknolojisi teknikleri kullanılarak kolayca aşılabilmektedir.

Günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Geliştirilen yeni biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan, öncelikle farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorunluluğu ortadan kaldırılacağından, klâsik ıslahta yabani gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan kısırlık ve uyuşmazlık sorunu çözümlenmiş olmaktadır. Klâsik bitki ıslahının temelini oluşturan varyasyon ve seleksiyon, yeni teknolojide karşımıza transformasyon ve *in vitro* seleksiyon olarak çıkmaktadır. *In vitro* seleksiyonlar, tüm bitki yerine hücre seçimine olanak sağlamaktır; bu ise tarlada binlerce bitki yerine, petri kutularında milyonlarca hücre üzerinde çalışmak anlamına gelmektedir. *In vitro* koşullarda seleksiyonun herhangi bir zamanda yapılabilmesi nedeniyle, bitkinin gelişme dönemlerine bağlı kalınmaması da önemli bir avantaj sağlamaktadır (Simmonds, 1983; Philips ve Eberhart, 1993).

Toprakta kendiliğinden gelişen yabancı otlar, kültür bitkileriyle su, besin maddesi ve ışık bakımından rekabete girmekte, kültür bitkilerine zarar veren hastalık ve zararlılara da konukçuluk yapmaktadır (Uygur vd., 1984). Yabancı ot kontrolünde, kimyasal mücadele en yaygın ve en etkili yöntemdir (Zoschke, 1994). Yabancı ot kontrolünde kullanılan herbisitler, kültür bitkilerinde gelişmede gerileme ve verim kaybı gibi bazı sorunlara neden olmaktadır. Yabancı otlarla mücadele yapılmadığında, verimde %60-70 oranında düşüşler ortaya çıkmaktadır. Yabancı ot mücadelelesine rağmen, verimde %15'lik azalma görülebilmektedir. Buğday tarımında yabancı otlarla mücadelede kullanılan en önemli



herbisit 'glifosinat amonyum'dur. Glifosinat amonyum, buğdayda yapraklarda sararma, ileriki aşamlarda kahverengileşme ve gelişmede gerilemeye, sonuçta verimin düşüşüne neden olur.

Bar geniyle Herbositlere Toleranslı Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi

Buğday gibi dar yapraklı kültür bitkileri içerisinde gelişen geniş yapraklı yabancı otlarla mücadelede başarılı sonuçlar alınırken, ürün içinde gelişen dar yapraklı yabancı otların yok edilmesi mümkün olmamaktadır. Klasik ıslah yöntemleriyle, az sayıda türde herbositlere dayanıklı genotipler geliştirilebilmiştir. Diğer taraftan, geliştirilen 'glifosinat amonyum' ve 'glifosat' herbositleri, etkili yabancı ot kontrolü sağlamıştır. *Bar*/*pat* veya *EPSPS* geninin bitkilere aktarılmasıyla, sırasıyla 'glifosinat amonyum' ve 'glifosat' herbositlerine toleranslı transgenik bitkiler kolaylıkla elde edilebilmektedir. Herbositlere toleranslı bitkilerin en önemli avantajları; işçilik, mekanizasyon ve akaryakıt maliyetlerinde sağladıkları tasarruftur. Kültür bitkileri ilk fide dönemlerinde çok hassas olup, bu dönemde uygulanan kültürel ve kimyevi uygulamalardan yüksek oranda etkilenebilmektedirler. Herbositlere toleranslı kültür bitkileri ise, ilk gelişme döneminde yabancı ot kontrolü amacıyla yapılan herbosit uygulamalarından etkilenmekte ve böylece %100'e varan oranlarda yabancı ot kontrolü sağlanabilmektedir. Herbositlere toleranslı transgenik bitkilerin üretiminde kullanılan en başarılı yöntem, herbisinin etken maddesini parçalayan yeni bir enzimin sentezinden sorumlu olan tek bir genin bitkilere aktarılmasıdır. *Streptomyces hygroscopicus* ve *S.viridochromogenes* bakterilerinden izole edilen 'Fosfinotrisin-N-asetiltransferaz' enziminin sentezinden sorumlu olan *bar* ve *pat* genlerinin bitkilere aktarılması sonucu geniş spektrumlu 'glifosinat amonyum' herbisitine karşı toleranslı çeşitler geliştirilmiştir (De Block vd., 1987; Salamini ve Moto, 1994; Öktem vd., 2004). Bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens*'ten izole edilen *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) geninin aktarılmasıyla yine geniş spektrumlu 'glifosinat amonyum' herbisitine toleranslı çeşitler elde edilmiştir (Shah vd., 1986; Öktem vd., 2004). Önerilen bu proje kapsamında seçici markör geni olarak herbositlere toleransı sağlayan *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden izole edilen *bar* geni kullanılacaktır. Gen aktarımı sonucu elde edilen bitkiler, *bar* geninin üretmiş olduğu PAT enzimi sayesinde 'glifosinat amonyum' herbisitine toleranslı olacaktır. Seçici markör gen olarak antibiyotiğe dayanıklılığı sağlayan genlerin bulunmaması, bu genlerden kaynaklanan endişeleri de ortadan kaldıracaktır. Yapılan araştırmalarda *bar* geninin sentezlediği PAT (fosfinotrisin-N-asetiltransferaz) enziminin hedef dışı organizmalarda alerjik ya da toksik herhangi bir etkisine rastlanmamıştır (MacKenzie vd., 2007; Scheideler vd., 2008).

III. Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

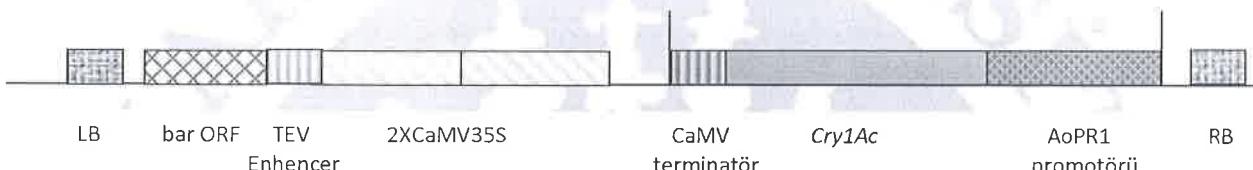
Projede ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bir adet makarnalık (Çakmak 79) ve bir adet ekmeklik buğday (Bezostaja-1) (*Triticum sp.*) çeşidi kullanılmıştır.

Eksplant Materyali

Denemelerde olgun buğday embriyoları kullanılmıştır.

Bakteri Materyali

Bakteri materyali olarak 'AoPR1-cry1Ac-pTF101.1' plazmidini (Şekil 1) taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 hattı kullanılmıştır. Plazmidin T-DNA bölgesinde AoPR1 promotörü tarafından kontrol edilen ve gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin 'glifosinat amonyum' içeren besin ortamında seçilebilmesini sağlayan *bar* geni bulunmaktadır.



Şekil 1. AoPR1 promotörü ile kontrol edilen *Cry1Ac* ve *bar* ORF genini içeren pTF101.1 ifade kaseti

Yöntem

Aktarılan Genler

Bağışıklık sistemi transformasyonunda aktarılacak istenen karakteri içeren gen kasetleri proje kapsamında hazırlanmıştır. Promotor, gen ve terminatör ardışık klonlamalar yapılarak bir araya getirilmiştir. Bu çalışmalar sırasında istenilen DNA parçaları uygun restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmiş, ardından DNA markörü ile birlikte agaroz jelde yürütülmüştür. DNA parçası kit yardımıyla jelenen izole edilmiş ve ligaz enzimi kullanılarak daha önceden aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş vektöre bağlanmıştır. Ardışık klonlamalar sırasında aracı vektörler kullanılmış ve hazırlanan kaset, son olarak kullanılan vektöre klonlandıktan sonra çoğaltılmıştır. Kullanıma hazır hale getirilen gen kasetleri elektroporasyon sistemi ile *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmış ve PCR kontrolleriyle onaylandıktan sonra -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında

CH. M.

distile saf su kullanılarak, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyümeye düzenleyicileri ilâve edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılmış, 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta $24\pm1^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur.

***Agrobacterium* Kültürlerinin Büyüütülmesi**

Gen aktarım çalışmalarında kullanılan *A. tumefaciens* "GV2260 p35S GUS-INT" hattı -80°C 'deki muhafaza edilen gliserol stoklardan alınarak 50 ml'lik steril tüplerde seçici antibiyotikleri içeren sıvı YEP (Yeast Extract Peptone) besin ortamında 28°C 'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültürlerinden örnekler lup ile alınarak petri kapları içerisinde seçici antibiyotikleri içeren katı NA (Nutrient Agar) besin ortamına yayılarak, 2 gün süreyle 28°C 'de gelişmeye bırakılmıştır. Katı besin ortamlarında gelişen bakteri kültürleri 2 ay boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza altına alınarak, ihtiyaç durumunda kullanılmıştır. Gen aktarımında kullanılan katı besin ortamından gelişen bakteri kültürlerinden alınan örnekler 50 ml'lik steril tüplere, yalnızca seçici antibiyotikleri bulunduran sıvı YEP besin ortamına konularak 28°C 'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca tekrar büyütülerek gen aktarımında kullanılmıştır. Tüm bakteri büyütme ortamlarına seçici antibiyotik olarak 100 mg/l spektinomisin ve 300 mg/l streptomisin eklenmiştir. Seçici antibiyotikler steril stok solüsyonlarından alınarak kullanılmıştır.

Buğdayda Tohum Yüzey Sterilizasyonu, Embriyo İzolasyonu

Yüzey sterilizasyonu yapılacak tohumlar manyetik karıştırıcıda etil alkol (%70) içerisinde 5 dakika bekletilerek 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 25 dakika ticari çamaşır suyunda (%5 sodyum hipoklorit içeren) çalkalanıp 6-7 kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril tohumlar, 33°C 'de yaklaşık 2 saat bekletilerek, embriyoların kolayca ayrılması sağlanmıştır (Özgen vd. 1998). Steril edilen tohumların embriyoları steril kabin içerisinde bistüri yardımıyla dikkatlice tohumdan ayrılmıştır.

***Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı**

Gen aktarımı aşağıda tarif edildiği şekilde yapılmıştır.

Agrobacterium tumefaciens "GV2260 AoPR1-cry1Ac-pTF101.1" bakteri hattı, 100 mg/l spektinomisin ve 300 mg/l streptomisin içeren 10 ml YEP besin ortamında bir gece boyunca büyütülmüştür.

Ulu. M. 15

İnokülasyon için sıvı, ko-kültivasyon ve/veya seleksiyon için de katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Seleksiyon ortamına 2-5 mg/l herbisit ve 500 mg/l duocid ilave edilmiştir. Duocid seleksiyon ortamında *Agrobacterium tumefaciens*'in gelişimini engellerken, herbisit gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin seçimi için kullanılmıştır.

YEP besin ortamında büyüyen bakteri kültürlerinden alınan örnekler inokülasyon ortamlarında 1/50 oranında seyreltilmiştir.

Eksplantlar bu inokülasyon ortamlarında belli sürelerle inokule edilmiştir.

Inokule Edilen Embriyolardan Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonu

İnokule edilmiş embriyolar, ya 2 gün boyunca ko-kültivasyona tabi tutulmuş ve daha sonra seleksiyon ortamına geçirilmiş ya da doğrudan seleksiyon ortamlarına alınmıştır. İnokule edilmiş embriyoların skutellum kısmı aşağı gelecek şekilde kallus oluşumu için 20 g/l sukroz ve 3 mg l⁻¹ 2,4-D içeren seleksiyon ortamına yerleştirilerek, 24±1°C sıcaklığa sahip karanlık inkübatorde 14 gün kültüre alınmıştır. Bu süre sonunda oluşan kalluslar, 20 g/l sukroz içeren 2,4-D'siz seleksiyon ortamına aktarılarak, iklim dolabında 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 24±1°C sıcaklıkta 4 hafta süreyle tutulmuştur. Bu süre sonunda incelenen karakterlerde ölçümler yapılmıştır.

Transgenik Adayı Rejenere Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler, 2-5 mg/l herbisit bulunduran ve büyümeye düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamında 4-6 hafta süreyle köklendirmeye konulmuştur. Köklenen bitkicikler, sıcaklık ve nemi kotrollü iklim odasında içerisinde torf bulunduran saksılara alınmış, saksıların üzerine ince naylon poşet geçirilerek, nem oranının yüksek tutulması sağlanmıştır. Böylece, henüz dış ortam şartlarına alışmamış bitkiciklerin aniden su kaybederek ölmesi engellenmiştir. Saksı üzerindeki naylon poşete belli aralıklarla (4-5 gün) makas yardımıyla delikler açılarak nem oranı yavaş yavaş azaltılmış, en sonunda da saksı üzerindeki naylon poşet tamamen kaldırılmıştır. Bu şekilde bitkiciklere iklimlendirme uygulanmış ve dış ortam şartlarına alıştırılarak, daha sonra saksılar seraya aktarılarak bitkilerin büyümesi sağlanmıştır. Toprakta gelişen bitkilerin yapraklarında Histokimyasal GUS analizi yapılmıştır.

Aktarılan Genin (bar) Bitkilerde Doğrulanması

Gen aktarımının teyit edilmesi PCR yöntemiyle yapılmıştır. PCR yönteminde genomik DNA Dellaporta vd. (1983) ve Özcan (1997)'a göre taze yaprak dokularından izole edilmiştir. Yaprak

11.5

numuneleri doku kültüründe gelişmiş bitkiciklerin saksılarda büyütülmesiyle elde edilen bitkilerden alınmış ve böylece bakteri kaynaklı bulaşma riski azaltılmıştır. Ayrıca, PCR reaksiyonu sırasında alınan numunelerde Yang vd. (2013)'nin bildirdiği protokol kullanılarak primer yardımıyla *Agrobacterium tumefaciens*'in kromozomunda bulunan *chv* virulans geninin varlığına bakılarak, jelde bu gene ait bant görülmemiği taktirde, bakteri bulaşıklığının olmadığı anlaşılmıştır. Daha sonra aktarılan genlere özgü primerler kullanılarak aktarılan genler uygun PCR koşullarında çoğaltılmıştır. Çalışmada negatif (gen aktarımı yapılmayan bitkiler) ve pozitif (plazmit DNA) kontrol da kullanılmıştır. PCR işleminden sonra reaksiyonlar agaroz jеле yüklenerek analiz edilmiştir.

Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulacak, her muamele içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 5 tekrarlamalı 100x10 mm'lik Petri kaplarından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin (\sqrt{X}) transformasyonu uygulanmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).

IV. Analiz ve Bulgular

Bialophos Dozlarının Belirlenmesi

Gen aktarım çalışmalarında en önemli aşamalardan birisi gen aktarılacak bitkinin seçici antibiyotiğe karşı tepkisinin belirlenmesidir. Aktarılan gen kasetinin içerisinde bulunan seçici gen, transgenik adayı bitkilerin *in vitro* şartlarda belirlenmesini sağlar. *In vitro* seleksiyon işleminin hassasiyeti, gen aktarım başarısının doğru bir şekilde belirlenmesinin vazgeçilemez şartıdır.

In vitro şartlar altına izole edilen buğday embriyoları içerisinde 0 mg/L kontrol, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2mg/L, 2.5 mg/L ve 3 mg/L bialophos ile MS tuz ve mineralleri bulunan ortamda gelişen embriyo sayısı (%), gelişen sürgün uzunluğu ve gelişen kök uzunluğu Tablo 1'deki gibidir.

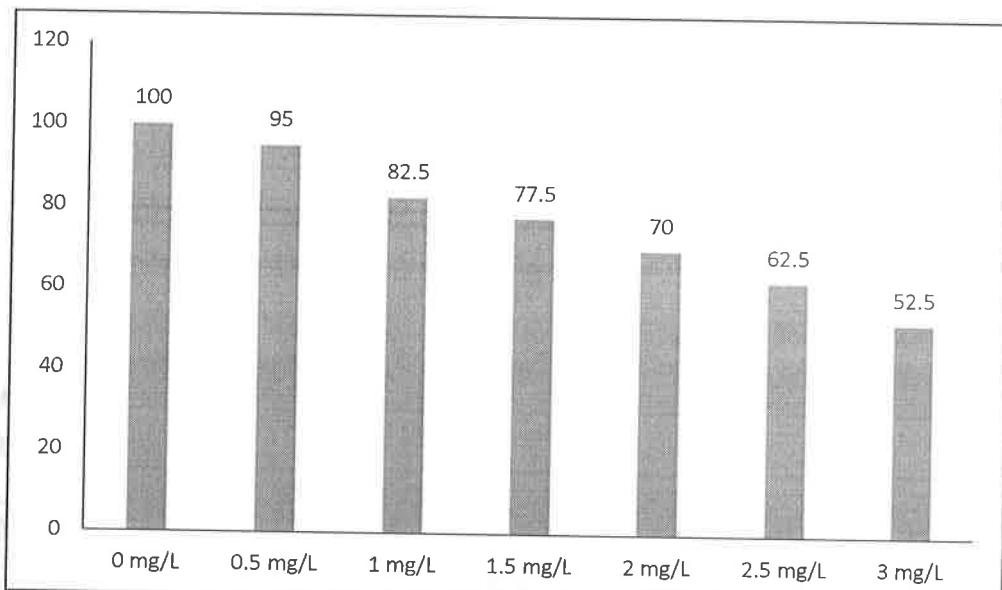
Tablo 1. Bialophos herbisiti bulunan ortamda buğday embriyosunun gelişim değerleri

Bialophos Dozu (mg/L)	Gelişen Embriyo Sayısı (%)	Gelişen Sürgün Uzunluğu (cm)	Gelişen Kök Uzunluğu (cm)
0	100	4.00	1.50
0.5	95	2.01	0.84
1	82.5	0.80	0.54
1.5	77.5	0.53	0.47
2	70	0.42	0.30
2.5	62.5	0.31	0.20

Uluçay

3	52.5	0.27	0.11
---	------	------	------

Tablo 1'de görüldüğü gibi Bialophos herbisitinin miktarı arttıkça buğday embriyoları üzerinde göstermiş olduğu olumsuz etki gözlenmektedir. Gelişen embriyo sayısı bialophos dozu arttıkça azalmaktadır. Özellikle 3 mg/L bialophos dozunda embriyo gelişimi %50'ye kadar düşmüştür (Şekil 1).

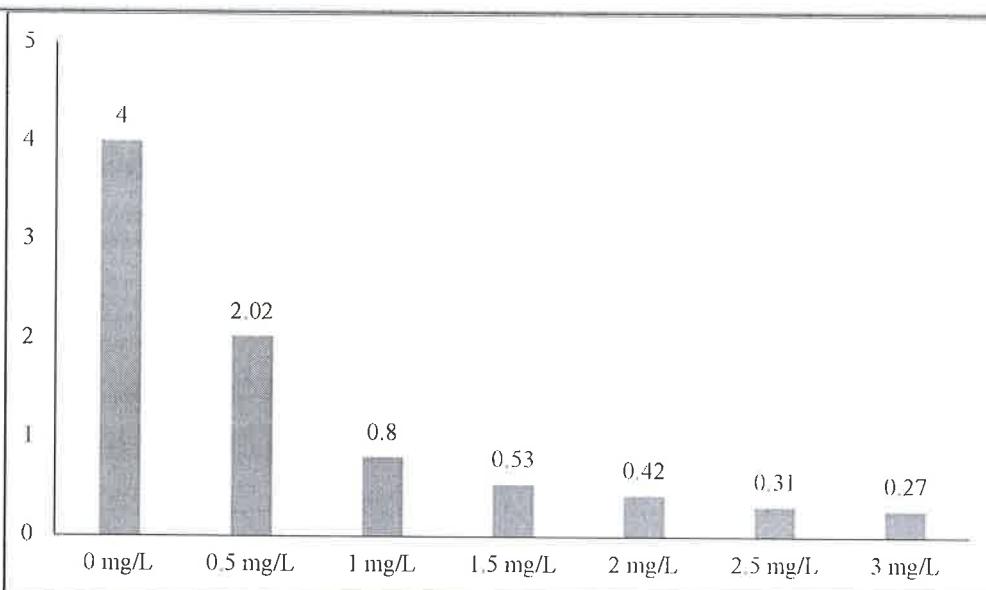


Şekil 1. Gelişen embriyo sayısı (%)

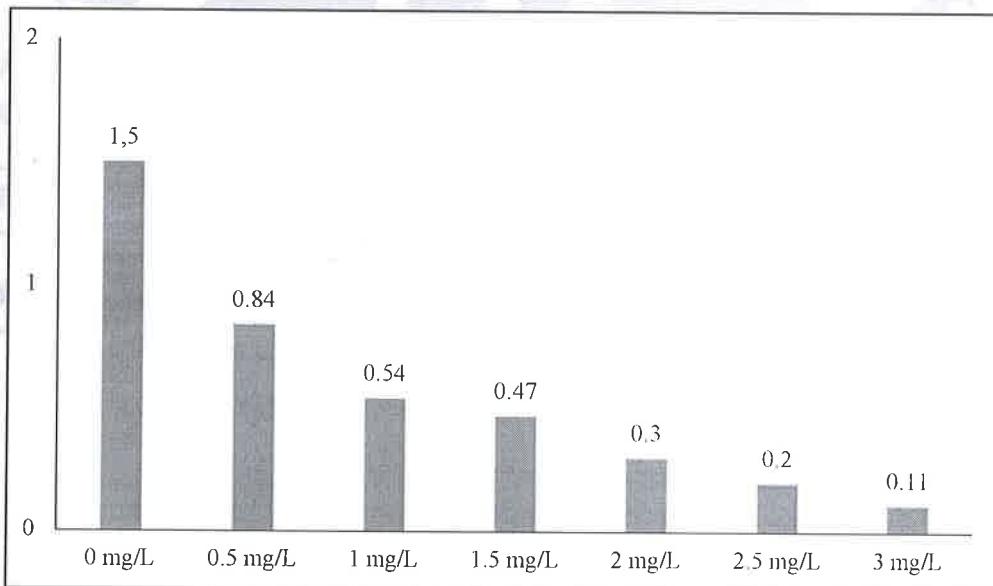
Gelişen sürgün uzunluğuna bakıldığından, tüm bialophos dozları kontrole göre düşük bulunmuştur. Artan dozlara göre gelişen sürgün uzunlığında azalma gözlenmektedir. Özellikle 2.5 mg/L ve 3 mg/L bialophos dozlarında gelişen sürgün uzunluğu çok düşük gözlenmiştir (Şekil 2). Gelişen kök uzunluğuna bakıldığından, en düşük etki 0.5 mg/L bialophos dozunda gözlenmiştir. Artan bialophos dozlarında gelişen kök uzunlığında azalmalar gözlenmiştir. Özellikle 3 mg/L bialophos dozunda kök uzunluğu en az olarak gözlenmiştir.

1946

U.U.Y



Şekil 2. Gelişen sürgün uzunluğu (cm)



Şekil 3. Gelişen kök uzunluğu (cm)

Yapılan denemeler sonucunda gen aktarımı yapılan buğday bitkisinin *in vitro* seleksiyonu için 2 mg/L Bialophos dozu kullanılmıştır.

Gen Aktarım Çalışmaları

Buğday tohumundan izole edilen embriyolara direkt *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 2. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla inoküle edilen buğday embriyolarının seleskiyon ortamında kültüre alınması

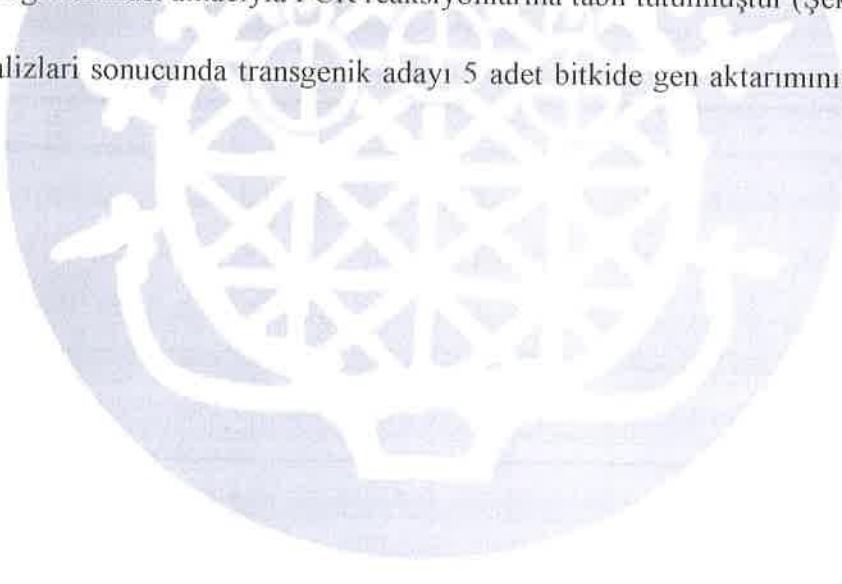
Seleksiyon Ortamından	Seleksiyon Ortamında	Toprağa Aktarılan	Toprakta Gelişen	PCR Pozitif Transgenik
-----------------------	----------------------	-------------------	------------------	------------------------

Ülker

Kültüre Alınan Embriyo Sayısı (Adet)	Gelişen Transgenik Adayı Bitki Sayısı (Adet)	Transgenik Adayı Bitki Sayısı (Adet)	Transgenik Adayı Bitki Sayısı' (Adet)	Bitki Sayısı (Adet)
30.00	14.00	14.00	5.00	0.00

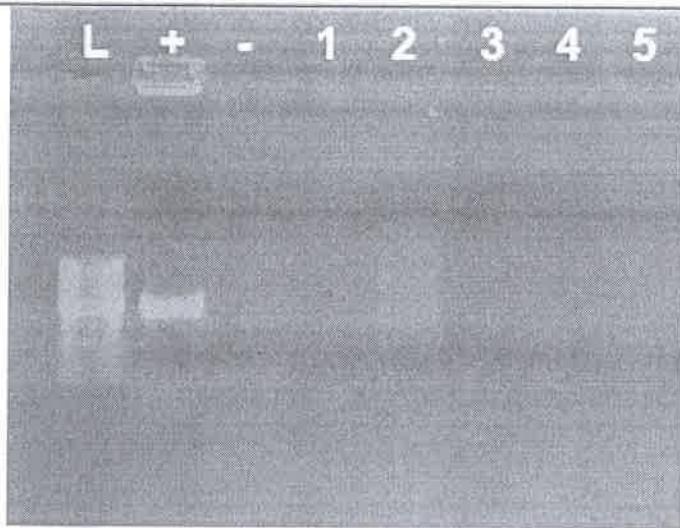
Yapılan denemeler de buğday embriyolarına *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılmıştır. Her deneme 30 adet embriyoya gen aktarımı yapılmış, gen aktarımı yapılan embriyolar 2 gün boyunca içerisinde bialophos bulunmayan normal kültür ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda embriyolar içerisinde herbisit (bialophpos) bulunan ortamlara aktarılarak 15 gün seleksiyona tabi tutulmuştur. Seleksiyon sonunda 30 adet *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılan embriyodan 14 tanesi gelişmeyi başarmıştır. Seleksiyon ortamında gelişen 14 adet bitkicik toprağa aktarılarak aklimatizasyon sürecine tabi tutulmuş, kademeli olarak normal iklim şartlarına adaptasyonu sağlanmıştır. Aklimatizasyon sonucunda toprağa aktarılan 14 adet bitkiden 5 tanesi normal iklim şartlarında yaşamayı başarmıştır. Gelişen 5 adet transgenik adayı bitki 30 gün boyunca toprakta büyütülmüş, daha sonra numune alınarak DNA izolasyonu yapılmış ve hem gen aktarımının doğrulanması amacıyla PCR reaksiyonlarına tabii tutulmuştur (Şekil 4).

Yapılan PCR analizleri sonucunda transgenik adayı 5 adet bitkide gen aktarımının başarısız olduğu tespit edilmiştir.



1946

M.M.F



Şekil 4. Transgenik adayı bitkilerde yapılan PCR

V. Sonuç ve Öneriler

Yapılan demeler sonucunda buğday bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının zor olduğu görülmüştür. Tüm uygulanan yöntemler de başarı sağlanamamıştır. Buğday bitkisine gen aktarımının partikül bombardımanı ve *Agrobacterium tumefaciens* yöntemlerinin birlikte uygulandığı bir yöntem ile buğdaya gen aktarımı mümkün olabilir.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Buğday bitkisine gen aktarımının partikül bombardımanı ve *Agrobacterium tumefaciens* yöntemlerinin birlikte uygulandığı bir yöntem ile buğdaya gen aktarımı mümkün olabilir.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Gerçekleştirilen Projeler

Yıldız, M., Aycan, M. ve Kayan, M. Bazı Tarla Bitkilerinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarım Frekansının Artırılmasında Gama Radyasyonu, Manyetik Alan ve Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyundan Yararlanma Olanakları, TÜBİTAK.

Yıldız, M., Darçın, E.S., Onarıcı, S., Birsen, C.K. ve Aycan, M. Ülkemiz Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşitlerinde Tuza Tolerans/Dayanıklılık Göstergesi Olarak Evrensel SSR Markörlerin Kullanılabilirliğinin Araştırılması ve Tuz Stresi Koşullarında Gen İfade Profillerinin İncelenmesi, TAGEM.

CH. Y

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Sağlanan alt yapı olanakları ile çok sayıda farklı proje çıkartılmış ve hepsi başarı ile sonuçlandırılmıştır. Özellikle TÜBİTAK destekli projemizde yeni yöntemler geliştirilmiştir. TAGEM tarafından desteklenen projemizde ise Tuz stresine toleranslı 2 yeni çeşit adayı buğday geliştirilmiş, tuz stresine toleransla alakalı çok sayıda gen, markör ve tekrar bölgesi geliştirilmiştir.

Sağlanan alt yapı ile lisans ve yüksek lisans eğitiminde verilmekte olan derslerde uygulama yaptırılmaktadır. Öğrencilerin sağlanan alt yapı ile kurulan son teknoloji sistemleri tanımı, görmesi, öğrenmesi ve uygulaması sağlanmaktadır.

IX. Kaynaklar

- De Block M, Boterman J, Vandewiele MJ, Thoen C, Gosselé V, Thompson C, Van Montagu M, and Leemans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.*, 6: 2513-2518.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4: 9–21.
- MacKenzie S.A., Lamb I., Schmidt J., Dege L., Morrisey M.J., Harper M., Layton R.J., Prochaska L.M., Sanders C., Locke M., Mattsson J.L., Fuentes A. and Delaney B. 2007. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-1507 in Sprague-Dawley rats. *Food and Chem. Toxicol.*, 45: 551-562.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Öktem H.A. 2004. Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi. Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, s. 190-207.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S. and Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, 118: 331-335.
- Philips, R.L. and Eberhart, S.A. 1993. Novel methodology in plant breeding. In Proc. of the Int. Crop Sci. Cong. Ames, USA. Crop Sci. Soc. of America, pp. 647-648.
- Salamini F. and Motto M. 1994. The role of gene technology in plant breeding. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds), *Plant Breeding: Principles and Prospects*, pp. 138-159, Chapman & Hall, Cambridge.
- 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. and Fraley R.T. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, 233: 478-481.
- Simmonds, N.W. 1983. Plant Breeding: The state of the art. In *Genetic Engineering of Plants*. Plenum press, New York, London, pp. 5-25.
- Snedecor G.W. and Cochran W.G. 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

Ch. 45

Scheideler S.E., Rice D., Smith B., Dana G. and Sauber T. 2008. Evaluation of Nutritional Equivalency of Corn Grain from DAS1570-1 (Herculex® I) in the Diets of Layding Hens. J. Appl. Poult. Res, 17: 383-389.

Uygur F.N., Koch W. and Walter H. 1984 Yabancı Ot Bilimine Giriş. PLITS, 1984/2(1), Verlog J. Margraf, Stuttgart, Germany, 114s.

Vasil I.K. 1998. Biotechnology and food security for 21st century: A real-world perspective, Nature Biotechnology 16, 399-400.

Zoschke A. 1994. Toward Reduced Herbicide Rates and Adapted Weed Management, Weed Technology, 8: 376-386.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamalar

Büt çe Yılı	Bü tç e Açıklama Ko du	Detaylar										
		Öncek i Yıldan Devir	Başlan gış Öden eği	Eklene n Aktar ma	Düşül en Aktar ma	Eklene n Öden ek	Düşül en Öden ek	Net Öden ek	Harca nan	Bloke Edilen (Avan s)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
201 4	03 .2 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	70,80	0,00	0,00	0,00	0,00	70,80	0,00	0,00	0,00	70,80
	03 .7 MENKUL MAL,GAYRİMADDİ HAK ALIM,BAKIM VE ONARIM GİD.	0,00	27,23 2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,23 2,00	26,55 0,00	0,00	0,00	682,0 0
	06 .1 MAMUL MAL ALIMLARI	0,00	32,40 0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	32,40 0,00	31,32 0,00	0,00	0,00	1.080, 00
	06 .2 MENKUL SERMAYE ÜRETİM GİDERLERİ	0,00	10,29 7,20	0,00	0,00	0,00	0,00	10,29 7,20	10,29 7,00	0,00	0,00	0,20
	Toplam	0,00	70,00 0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	70,00 0,00	68,16 7,00	0,00	0,00	1.833, 00
201 5	03 .2 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	70,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	70,80	0,00	0,00	0,00	70,80
	03 .7 MENKUL MAL,GAYRİMADDİ HAK ALIM,BAKIM VE ONARIM GİD.	682,0 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	682,0 0	0,00	0,00	0,00	682,0 0
	06 .1 MAMUL MAL ALIMLARI	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00
	06 .2 MENKUL SERMAYE ÜRETİM GİDERLERİ	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20
	Toplam	1.833, 00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.833, 00	0,00	0,00	0,00	1.833, 00

66/15

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

Bü tç e Ko du	Açıklama	Önceki Yıldan Devir	Başlan ğıç Ödene n	Eklene n Aktar ma	Düşüle n Aktar ma	Eklene n Ödene k	Düşüle n Ödene k	Net Ödene k	Harca nan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
201 6	03. 2 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	70,80	0,00	0,00	0,00	20.000 ,00	0,00	20.070 ,80	18.290 ,00	0,00	0,00	1.780, 80
	03. 7 MENKUL MAL,GAYRİMADDİ HAK ALIM,BAKIM VE ONARIM GİD.	682,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	682,00	0,00	0,00	0,00	682,00
	06. 1 MAMUL MAL ALIMLARI	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00
	06. 2 MENKUL SERMAYE ÜRETİM GİDERLERİ	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20
	Toplam	1.833, 00	0,00	0,00	0,00	20.00 0,00	0,00	21.83 3,00	18.29 0,00	0,00	0,00	3.543 00
Bü tç e Ko du	Açıklama	Önceki Yıldan Devir	Başlan ğıç Ödene n	Eklene n Aktar ma	Düşül en Aktar ma	Eklene n Ödene k	Düşül en Ödene k	Net Ödene k	Harca nan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
201 7	03. 2 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	1.780, 80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.780, 80	0,00	0,00	0,00	1.780, 80
	03. 7 MENKUL MAL,GAYRİMADDİ HAK ALIM,BAKIM VE ONARIM GİD.	682,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	682,00	0,00	0,00	0,00	682,00
	06. 1 MAMUL MAL ALIMLARI	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00	0,00	0,00	0,00	1.080, 00
	06. 2 MENKUL SERMAYE ÜRETİM GİDERLERİ	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20
	Toplam	3.543, 00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3.543, 00

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Mevcut cihazlar Biyoteknoloji Enstitüsünde bulunmakta olup yapılacak bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır.

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**