

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE**

Proje Türü : HIZLANDIRILMIŞ PROJE
Proje No : 13H4347003
Proje Yöneticisi : PROF.DR. MUSTAFA YILDIZ
Proje Konusu : **MAKARNALIK BUĞDAYDA (*TRITICUM DURUM* DESF.)
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ARACILIĞIYLA GEN
AKTARIM FREKANSININ ARTIRILMASINDA GAMA
RADYASYONUNDAN YARARLANMA OLANAKLARI**

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

27.04.2015

PROF.DR. MUSTAFA YILDIZ

İmza

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

**MAKARNALIK BUĞDAYDA (*TRITICUM DURUM* DESF.) *AGROBACTERIUM*
TUMEFACIENS ARACILIĞIYLA GEN AKTARIM FREKANSININ ARTIRILMASINDA
GAMA RADYASYONDAN YARARLANMA OLANAKLARI**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ : PROF.DR. MUSTAFA YILDIZ

YARDIMCI ARAŞTIRICILAR : ARAŞ.GÖR. CANSU TELCİ KAHRAMANOĞULLARI
BİLİM UZM. MURAT AYCAN

PROJE NUMARASI : 13H4347003

BAŞLAMA TARİHİ : 12.12.2013

BİTİŞ TARİHİ : 12.12.2014

RAPOR TARİHİ : 27.04.2015

PROJENİN TÜRKÇE ADI

MAKARNALIK BUĞDAYDA (*Triticum durum* Desf.) *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIM FREKANSININ ARTIRILMASINDA GAMA RADYASYONDAN YARARLANMA OLANAKLARI

ÖZET

Moleküler teknikler kullanılarak herhangi bir organizmadan izole edilen bir gen biyoteknolojik yöntemler aracılığıyla istenen bir organizmaya aktarılabilir. Biyoteknolojik çalışmalarda bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium tumefaciens*, mikroenjeksiyon ve partikül tabancası gibi çok sayıda gen aktarım yöntemi kullanılmasına karşın, *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının çok önemli üstünlükleri bulunmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının en önemli üstünlüğü, yalnızca istenilen genlerin bitkilere düşük kopya sayısı ile aktarılmasıdır. Ayrıca, *Agrobacterium tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımı oldukça ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bütün bu olumlu yönlerinden dolayı *Agrobacterium tumefaciens* "bitkilerin doğal genetik mühendisi" olarak adlandırılmaktadır. Bu bakteriyle bitkilere gen aktarımının önemli üstünlükleri bulunurken, bazı sınırlamalarla da karşılaşmaktadır. Bunlardan en önemlisi ise konukçu sınırlamasıdır. Tütün, patates ve patlıcan gibi *Solanaceae* familyasına ait türlere çok kolaylıkla gen aktarımı yapılırken; buğdaygiller, baklagiller ve ağaç türlerine gen aktarımı oldukça zordur. Bu bitkilere *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı son derece düşük frekanslarda gerçekleşirken, gen aktarımı yapılan hücrelerden bitki rejenerasyonu da oldukça düşük oranlarda olmaktadır. Bu nedenle, bitkilerde gen aktarımı frekansını artıracak yeni yöntemlerin bulunması izole edilen genlerin bitkilere kolaylıkla aktarılarak transgenik bitki elde edilmesini kolaylaştıracaktır. *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının zor olduğu bitki türlerinde, gen aktarım oranını artırmak için farklı uygulamalar yapılabilmektedir. Bunlardan bakteri yoğunluğu, inokülasyon ve ko-kültivasyon süresinin optimize edilmesi, farklı bitki organ ve hücrelerinin kullanılması rutin uygulamalardır. Bu uygulamalara ilave olarak asetosiyringon gibi bitki fenolik bileşiklerinin inokülasyon ve ko-kültivasyon ortamlarına ilave edilmesi de bazı bitki türlerine gen aktarımını önemli oranda artırabilmektedir.

Buğday, insan beslenmesinde kullanılan bitkiler arasında ekiliş ve üretim bakımından dünyada ilk sırada yer almaktadır. Buğday tanesi yüksek 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 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. Bu projede, gama radyasyonu kullanılarak buğdaya *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımından yüksek transgenik sürgün frekansı elde edilmeye çalışılmıştır.

PROJENİN İNGİLİZCE ADI

UTILIZING POSSIBILITIES OF GAMMA RADIATION IN INCREASING GENE TRANSFER FREQUENCY VIA *Agrobacterium tumefaciens* IN DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.)

ABSTRACT

A gene isolated from any organism using molecular techniques can be transported to ant organism through biotechnological methods. Although many transformation techniques are used for gene transformation to plants such as *Agrobacterium tumefaciens*, microinjection and partical gun, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer has many superiorities. The most important of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer is that only genes of interest are transferred to plants with low copy number. In addition, gene transfer to plants via *Agrobacterium tumefaciens* is fairly cheap and easy method. Because of all these postive aspects, *Agrobacterium tumefaciens* is called as "natural genetic engineer of plants". While gene transfer to plants via bacteria has important superiorities, some limitations also occurs. The most important of these is host limitation. While gene transfer to species from *Solanaceae* family such as tobacco, potato and eggplants is easy, gene transfer to cereals, legumes and tree species is quite difficult. Gene transfer to these plants via *Agrobacterium tumefaciens* takes place with extremely low frequencies and plant regeneration from transferred cells occurs at pretty low proportions. Therefore, finding new methods for high frequency gene transformation in plants will facilitate in obtaining transgenic plants via easy transformation of isolated genes. Different applications can be made to increase the transformation rate in plants in which *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer is difficult. Increasing the bacterial density, optimization of inoculation and co-cultivation periods, using different organs and cells are the routine applications. In addition to these applications, adding plant phenolic compounds to inoculation and co-cultivation mediums like asetosyringon, gene transformation frequency can be increased significantly in some plant species.

Wheat is the first order in the world among the plants used for nutrition with respect to area sown and production. Since wheat grain with high feeding value, easiness in storage and processing, is the basic nutrient of about 50 countries. Wheat, is used in many food, particularly in bakery products and in industry sectors. Therefore, improving new wheat cultivars and presenting to the use of people by both conventional and modern biotechnological techniques is extremely important and valuable. The success rate in gene transfer of wheat using biotechnological techniques is between 0.1-0.01%. In other words, probability of obtaining a transgenic wheat from gene transfer studies varies between 1/1000 and 1/ 10 000. This shows that how hard to integrate a foreign gene into wheat genome. When the place of wheat in human nutrition is considered, the importance of any study conducted for inserting an agronomic gene into plant genome to increase against biotic (diseases and pests) and abiotic (high and low temperature, drought, salinity) stress factors which decreases yield of unit area is understood. In this project, it was studied to get high transgenic shoot frequency in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to wheat.

Amaç ve Kapsam

Dünya nüfusunun yıllık %1.5'lik artışla 2020 yılında 8 milyar, 2050 yılında da 11 milyar olacağı tahmin edilmektedir (Vasil 1998). Günümüzde tarım yapılan alanlar dünya yüzeyinin %3'ünü oluşturmaktadır. Ancak, işlenen alanlar erozyon, tuzlulaşma, asitleşme, yoğun tarım ve aşırı otlatma gibi nedenlerle hızla daralmaktadır. Tüm bu faktörler artan nüfusun da etkisiyle 2050 yılına kadar 0.26 hektar olan kişi başına işlenen alanın 0.15 hektara düşmesine neden olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, modern tarım için gerekli su kaynaklarının bulunması; artan su tüketimi ve suların giderek kirlenmesi nedeniyle zorlaşacaktır (Vasil 1998). Bir yandan dünya nüfusunun her geçen gün arttığı, öte yandan tarımda kullanılan alanların son sınırına dayandığı düşünüldüğünde, verim artışının gelecekte de devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. İstenen verim düzeyine ulaşabilmek için bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi bir zorunluluktur. Aralarında melezleme yapılabilen tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen özelliklerin de birlikte geçişinin engellenememesi, istenmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elimine edilmesinin çok uzun zaman alması klasik bitki ıslahının önemli olumsuzlukları arasındadır (Özcan ve Özgen 1996). Bu yüzden, gelecekte verim artışının devamını sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen çevreyle dost biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile izole edilmiş bir genin istenen organizmaya doğrudan aktarılması mümkündür. Bu yeni tekniklerde gen aktarım sistemlerinin temelini; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi oluşturmaktadır.

Bilindiği gibi, mutasyona uğrayan birçok gen, hücre bölünmesi ve gelişmesini etkilemektedir. Yüksek dozda gama radyasyonu kullanılarak tahıllardaki hücre bölünmesi durdurulduğunda, morfolojik olarak normal yaprakların oluşması artan hücre genişlemesi ile sağlanabilmektedir. Bu yapraklar az sayıda ancak büyük hücreleri içermektedir. Hücre bölünmesi ve genişlemesindeki olumsuzluklar, dokudaki diğer değişikliklerle telafi edilmektedir (Doonan, 2000). İyonlaştırıcı radyasyon biyolojik materyaller tarafından absorbe edildiğinde, hücredeki kritik noktaları etkilemektedir. Radyasyon, hücredeki diğer atom ve moleküllerle ve özellikle de su ile karşılıklı etkileşime girerek önemli elemanlara ulaşarak zarar verecek olan serbest radikalleri oluşturabilmektedir. Radyasyonun bu dolaylı etkisi vejetatif hücrelerde ve %80'nini suyun oluşturduğu sitoplazmada önemlidir. Morfolojik değişimler, farklı doku ve hücrelerin biyolojik ve kimyasal değişimlerinden kaynaklanmaktadır. Radyasyon, pektinlerin önemli derecede bozulmasına neden olmaktadır. Dokulardaki yumuşama ve hücreler arasındaki bağın kırılması, suda çözünebilir pektinlerin artışına dayanmaktadır. Kalsiyum, hücre duvarında bulunan pektik asitlerle kalsiyum pektat oluşturmak amacıyla etkileşerek hücre duvarı yapısının korunmasında özel bir rol oynamaktadır. Kalsiyum iyonları, hücreler arası bağın korunarak hücre duvarı yapısındaki değişikliklerin önlenmesinde etkilidir (Kovacs ve Keresztes, 2002).

İyonlaştırıcı radyasyonun yüksek dozları bitkilerde solunumda artış, etilen üretiminde yükselme, enzim aktivitesinin başlatılması ve bazı protein türlerinin birikimi gibi fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Hücre duvarları, membranlar ve DNA gibi hücresel makromoleküller iyonlaştırıcı radyasyondan fiziksel ve biyokimyasal olarak önemli derecede etkilenmektedir (Nagata vd., 1999). İyonlaştırıcı radyasyon, dokularda yumuşama ve kararmaya neden olmakta, özellikle gama radyasyonu membran fosfolipidlerinin bozulmasını hızlandırmaktadır. Membran bozulması, radyasyon süresince oluşan serbest radikaller tarafından fosfolipidlerin esterleşmemesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Voisine vd., 1993). Radyasyon, bitki hormonlarını ve bunların sentezini olumsuz yönde etkilemekte, ışınlanan hücrelerin büyümeyi uyarıcı maddelere olan duyarlılığı azalmaktadır. Yüksek iyonlaştırıcı radyasyon, bitki doku kültürlerinin gelişimini

engellenebilmektedir. Işınlanan dokular, kontrollere oranla daha az yaş ağırlık artışı göstermektedir. Radyasyona duyarlılık eksplantların kültüre alındığı ortamın büyüme düzenleyicileri konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Kerbauy ve Hell, 1979). İyonlaştırıcı radyasyonun tüm bu olumsuzluklarına rağmen, düşük dozlarının *in vivo* ve *in vitro* bitki gelişimini teşvik ettiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Düşük radyasyonun teşvik edici etkileri arasında, meyvelerde erken olgunlaşma, meyve ağırlığında artış ve yüksek tohum çimlenmesi sayılabilir. Düşük gama radyasyonunun teşvik edici etkisi doku kültüründe de gözlenmektedir. Düşük gama radyasyonunun fasulyede doku kültürü gelişimini artırdığı, tütün doku kültüründe hücre farklılaşmasını teşvik ettiği, havuçta bitki rejenerasyonunu hızlandırdığı ve patatesten mikro yumru oluşumu artırdığı bildirilmektedir (Al-Safadi vd., 2000).

Bu projede, 'Çakmak 79' makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşidinde, Kobalt 60 (Co-60) kaynaklı gama radyasyonundan yararlanılarak hücre ve dokularda fiziksel/biyolojik değişikliklerin oluşturulması yoluyla biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılığı sağlayan genlerin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla buğday genomuna yerleştirilebilmesi için yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Projede 'Çakmak 79' makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşidi kullanılmıştır.

Eksplant Materyali

Denemelerde olgun buğday embriyoları kullanılmıştır

Işınlama Materyali

Araştırmada, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (SANAEM)'nde bulunan Kobalt 60 (Co-60) gama radyasyon kaynağı kullanılmıştır.

Bakteri Materyali

Bakteri materyali olarak p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 hattı kullanılmıştır. Plazmidin T-DNA bölgesinde karnabahar mozaik virüsüne ait NOS promotörü tarafından kontrol edilen ve gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin kanamisin içeren besin ortamında seçilebilmesini sağlayan neomisin fosfotransferaz II (*npt II*) geni bulunmaktadır. β -glukuronidaz (GUS) geni, plazmitte 35S promotörü tarafından kontrol edilmektedir.

Yöntem

Gama Radyasyon Dozları

Araştırmada, Kobalt 60 gama kaynağı aracılığıyla eksplanta yapılan ışınlamalarda 0 (kontrol), 20, 40, 60 ve 80 Gy (Gray) dozlar kullanılmıştır.

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) kullanılacaktır. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılacak, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilâve edilecektir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e

ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanacaktır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulacaktır.

Agrobacterium Kültürlerinin Büyütülmesi

Gen aktarım çalışmalarında kullanılacak *A. tumefaciens* "GV2260 p35S GUS-INT" hattı -80°C 'deki muhafaza edilen gliserol stoklardan alınarak 50 ml'lik steril tüplerde seçici antibiyotikleri içeren sıvı NB (Nutrient Broth) 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 kullanılacak katı besin ortamından gelişen bakteri kültürlerinden alınan örnekler 50 ml'lik steril tüplere, yalnızca seçici antibiyotikleri bulunduran sıvı NB besin ortamına konularak 28°C 'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca tekrar büyütülerek gen aktarımında kullanılmıştır. Tüm bakteri büyütme ortamlarına seçici antibiyotik olarak 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin eklenmiştir. Seçici antibiyotikler steril stok solüsyonlardan alınarak kullanılmıştır.

Buğdayda Tohum Yüzey Sterilizasyonu, Embriyo İzolasyonu ve Kallus Oluşumu

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 p35S GUS-INT" bakteri hattı, 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin içeren 10 ml NB besin ortamında bir gece boyunca büyütülmüştür.
- İnokülasyon için sıvı, ko-kültivasyon ve/veya seleksiyon için de katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Seleksiyon ortamına 100 mg/l kanamisin ve 500 mg/l duocid ilave edilmiştir. Duocid seleksiyon ortamında *Agrobacterium tumefaciens*'in gelişimini engellerken, kanamisin gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin seçimi için kullanılmıştır.
- NB besin ortamında büyüyen bakteri kültürlerinden alınan örnekler inokülasyon ortamlarında 1/50 oranında seyreltilmiştir.
- Eksplantlar bu inokülasyon ortamlarında farklı sürelerle inoküle edilmiştir.

Inokule Edilen Embriyolardan Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonu

İnokule edilmiş embriyolar, 2 gün boyunca ko-kültivasyona tabi tutulmuş ve daha sonra seleksiyon ortamına aktarılmıştır. 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 yerleştirilmiş, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığa sahip karanlık inkübatörde 14 gün kültüre alınmıştır. Bu süre sonunda oluşan kalluslar, 20 g/l sukroz içeren 2,4-D'siz seleksiyon ortamına aktarılmış, iklim dolabında 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 4 hafta süreyle tutulmuştur.

Gen aktarımı çalışmalarından sonra sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, seleksiyon ortamında gelişen sürgün sayısı ve GUS (+) sürgün yüzdesi karakterlerinde ölçümler yapılmıştır.

Transgenik Adayı Rejenere Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler, 100 mg/l kanamisin bulunduran ve büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamında 4-6 hafta süreyle köklendirmeye konulmuştur. Köklenen bitkicikler, sıcaklık ve nemi kontrollü 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 uygulanarak dış ortam şartlarına alıştırmış, daha sonra saksılar seraya aktararak bitkilerin büyümesi sağlanmıştır. Toprakta gelişen bitkilerin yapraklarında Histokimyasal GUS analizi yapılmıştır.

Histokimyasal GUS Analizi

Histokimyasal gen analizi Jefferson (1987)'in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37°C'de gece boyu inkübe edilmiş, daha sonra dokular %70'lik alkolde yıkanarak mavi boyanan bölgeler belirlenmiştir.

Aktarılan Genlerin 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 numuneleri doku kültüründe gelişmiş bitkiciklerin saksılarda büyütülmesiyle elde edilen bitkilerden alınarak bakteri kaynaklı bulaşma riski azaltılmıştır. Daha sonra aktarılan genlere özgü primerler kullanılarak aktarılan genler uygun PCR koşullarında çoğaltılmıştır. PCR işleminden sonra reaksiyonlar agaroz jele yüklenerek analiz edilmiştir.

Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, 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).

Analiz ve Bulgular

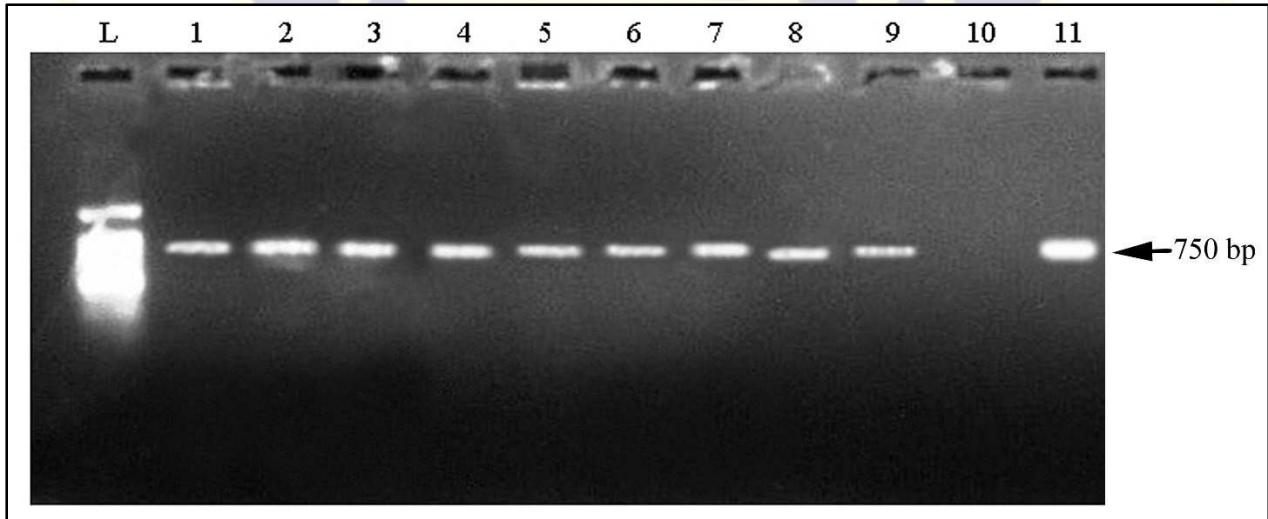
Buğday tohumlarının yüzey sterilizasyonundan sonra tüm gama dozlarında (0-kontrol, 20, 40, 60 ve 80 Gy) 200'er adet embriyoya *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla inokulasyon yapılmıştır. İnokule edilen embriyolar içerisinde antibiyotikleri içeren MS ortamlarında Magenta kapları içerisinde çimlendirmeye alınmıştır. Gama radyasyonunun uygulanmadığı kontrol dozunda seleksiyon ortamında çimlendirmeye alınan 200 embriyodan yalnızca 24 adeti (%12.00) gelişerek bitki oluşturmuştur. Bu bitkilerin yapraklarında yapılan GUS analizi sonucunda yalnızca 2 tanesinde pozitif sonuç elde edilmiş, ancak yapılan PCR analizi sonucu bu 2 bitkinin hiçbirisinde *npt-II* genine ait banda rastlanmamıştır (Çizelge 1, Şekil 1).

Artan gama radyasyon dozlarında, seleksiyon ortamında çimlenerek gelişen bitki sayısı, GUS (+) bitki sayısı ve PCR pozitif bitki sayısında artışlar gözlenmiştir (Şekil 2). İncelenen tüm karakterlerde en yüksek sonuçlar 80 Gy gama dozu uygulanan embriyolardan elde edilmiştir. Seksen Gy gama dozunda, inokule edilen 200 embriyodan 64 adeti (%32.00) seleksiyon ortamında bitki oluşturmuştur. Bu 64 bitkinin 16 tanesi yapılan GUS analizi sonucu pozitif çıkmıştır. Onaltı bitkiden 9 tanesinde ise, yapılan PCR analizi sonucu *npt-II* genine ait banda rastlanmıştır (Çizelge 1, Şekil 1).

Çizelge 1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla inokule edilen farklı gama dozları ile ışınlanan 'Çakmak 79' makarnalık buğday çeşidine ait embriyoların seleksiyon ortamında kültüre alınması sonucu gelişen fidelerde GUS ve PCR analizi sonuçları

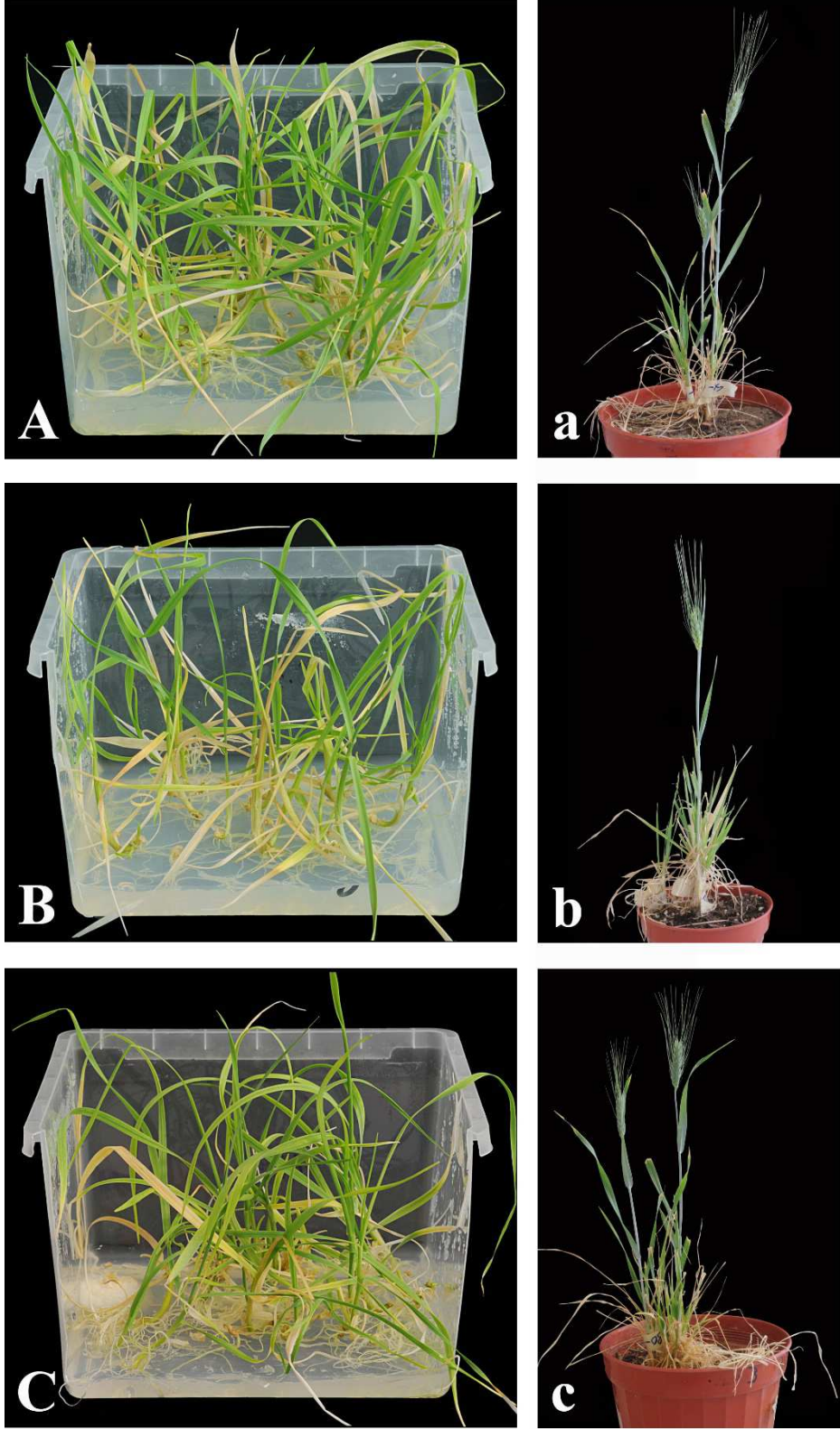
Gama Dozu (Gy)	Seleksiyon Ortamında Çimlendirmeye Alınan İnokule Edilmiş Embriyo Sayısı	İnokule Edilmiş Embriyolardan Seleksiyon Ortamında Gelişen Bitki		GUS (+) Bitki		PCR Pozitif Bitki	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
0	200	24 d	12.00 c	2 d	8.33 c	0 d	0.00 d
20	200	25 d	12.50 c	6 d	24.00 a	0 d	0.00 d
40	200	42 c	21.00 b	9 c	21.43 b	1 c	2.38 c
60	200	55 b	27.50 ab	12 b	21.82 b	4 b	7.27 b
80	200	64 a	32.00 a	16 a	25.00 a	9 a	14.06 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 1. 80 Gy gama dozu ile ışınlanan 'Çakmak 79' makarnalık buğday çeşidine ait embriyolardan seleksiyon ortamında gelişen fidelerinden PCR analizi sonucu *npt-II* genini taşıdığı tespit edilen 9 adet bitkiye ait band görüntüsü. L – DNA ladder, 1-9 – 80 Gy gama ile ışınlanan embriyolardan gelişen transgenik bitkiler, 10 – negatif kontrol, 11 – pozitif kontrol (plasmid DNA)





Şekil 2. Farklı dozlarda gama ile ışınlanan 'Çakmak 79' makarnalık buğday çeşidine ait embriyolardan seleksiyon ortamında gelişen fideler ve PCR analizi sonucu transgenik oldukları teyid edilen bitkilerin toprak içeren saksılarda gelişimi. A-a. 40 Gy gama, B-b. 60 Gy gama ve C-c. 80 Gy gama

Sonuç ve Öneriler

Tek çenekli bitkilere *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak gen aktarımının yapıldığı ve başarılı sonuçlar elde edilen pek çok çalışma vardır. Buğdaya *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarılabildiğini gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (Khanna ve Daggard 2003, Qi-man vd. 2005, Supartana vd. 2006, Wu vd. 2008, Wang vd. 2009, Zale vd. 2009, He vd. 2010, Li-Li vd. 2011, Binka vd. 2012). Ancak, buğdaya gen aktarımının gerçekleştirildiği bu araştırmalarda gen aktarım frekansı oldukça düşüktür.

Bir patojen olan *Agrobacterium tumefaciens*, bir saldırı gerçekleştirdiğinde, bitki savunma mekanizmasını çalıştırarak bu saldırıya karşı koymaya ve bu saldırıyı en az zararla atlattırma çalışmaktadır. Bitki savunma mekanizması nedeniyle *Agrobacterium tumefaciens* enfeksiyonundan sonra bitki dokusunun rejenerasyon yeteneği önemli derecede düşmektedir. Bu durum, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı önündeki en önemli sorundur. Bu nedenle, gen aktarılmış sürgün frekansının %1 oranında bile olsa artırılması, çok büyük bir başarıdır. Gen aktarılmış sürgün frekansının artırılabilmesi için bakteri yoğunluğu ve inokulasyon süresi gibi parametrelerde değişiklikler yapılmaktadır. Vakum infiltrasyonu, transgenik sürgün frekansının artırılmasında uygulanan bir yöntem olup, dokuda oluşturulan negatif atmosferik basınç sayesinde daha fazla hücreye bakterinin ulaşması sağlanmakta, bu yolla gen aktarılmış hücre ve sürgün frekansının artırılması hedeflenmektedir. İnokulasyon yöntemindeki farklı uygulamalar da gen aktarım ve transgenik sürgün frekansını önemli derecede artırabilmektedir.

İyonlaştırıcı radyasyon, popülasyondaki varyasyonu artırması nedeniyle, istenilen genotiplerin elde edilmesinde gerek klâsik ve gerekse modern ıslahta kullanılan bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, geçtiği ortamlarda iyonlar oluşturan radyasyon olarak tanımlanır. İyonlaştırıcı radyasyon biyolojik materyaller ile etkileştiğinde, hücredeki kritik noktaları etkilemektedir. Radyasyon, hücredeki diğer atom ve moleküllerle ve özellikle de su ile karşılıklı etkileşime girerek önemli elemanlara ulaşarak zarar verecek olan serbest radikalleri oluşturur. Radyasyon, pektinlerin önemli derecede bozulmasına neden olmaktadır. Dokulardaki yumuşama ve hücreler arasındaki bağın kırılması, suda çözünebilir pektinlerin artışına dayanmaktadır. Membran bozulması, radyasyon etkisiyle oluşan serbest radikaller tarafından fosfolipidlerin esterleşmemesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Voisine vd. 1993). Kalsiyum, hücre duvarında bulunan pektik asitlerle kalsiyum pektat oluşturmak amacıyla etkileşerek hücre duvarı yapısının korunmasında özel bir rol oynar. Kalsiyum iyonları, hücreler arası bağın korunarak hücre duvarı yapısındaki değişikliklerin önlenmesinde etkilidir (Kovaks ve Keresztes 2002).

Sitoplazmada radyasyona duyarlılığı en yüksek olan organel mitokondridir. Bir organizmanın farklı dokuları, radyasyona farklı derecede duyarlılık gösterir. Yüksek dozdaki radyasyonun hücre düzeyindeki en belirgin etkilerinden biri hücre büyümesini baskılamasıdır. Özellikle hücre bölünmesi sırasında radyasyona maruz kalan hücrelerde büyüme kesintiye uğrar. Hücreyi oluşturan yapılardan çekirdek ve özellikle de bölünme halindeki kromozomlar, radyasyona oldukça fazla duyarlıdır. Radyasyon kromozomların kırılmasına, birbirine yapışmasına, kenetlenmesine ve kıvrılmasına yol açabilir. Kromozom kırıkları yeniden organize olabilir, aynı kalabilir veya bir başka kromozomla birleşebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı mutasyon ortaya çıkabilir veya hücre ölümü gerçekleşebilir (Görpe ve Cantez 1992).

İyonlaştırıcı radyasyonun yüksek dozları bitkilerde solunumda artış, etilen üretiminde yükselme, enzim aktivitesinin başlatılması ve bazı protein türlerinin birikimi gibi fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Hücre duvarları, membranlar ve DNA gibi hücrel makromoleküller iyonlaştırıcı radyasyondan fiziksel ve biyokimyasal olarak önemli derecede etkilenmektedir (Nagata vd. 1999). Yüksek dozdaki radyasyon, bitki hormonlarını ve bunların sentezini olumsuz yönde etkilemekte, ışınlanan hücrelerin büyümeyi uyarıcı maddelere olan duyarlılığı azaltmaktadır (Lage vd. 2002).

Yüksek dozların aksine, düşük dozdaki gama radyasyonun *in vivo* ve *in vitro* bitki gelişimini teşvik ettiği birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir. Düşük dozdaki radyasyonun teşvik edici etkileri arasında, meyvelerde erken olgunlaşma, meyve ağırlığında ve tohum çimlenmesinde artış sayılabilir.

Düşük dozdaki gama radyasyonunun teşvik edici etkisi doku kültüründe de gözlenmektedir. Düşük dozlu gama radyasyonunun fasulyede doku kültürü gelişimini artırdığı, tütün doku kültüründe hücre farklılaşmasını teşvik ettiği, havuçta bitki rejenerasyonunu hızlandırdığı ve patatesten mikroyumru oluşumu artırdığı bildirilmektedir (Al-Safadi vd. 2000).

Mutasyon oluşturmayacak düşük dozlardaki gama radyasyonunun buğdayda (*Triticum* sp.) bitki rejenerasyonu ve partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımı üzerine etkisinin incelendiği araştırmada, öncelikle farklı gama kaynaklarının (Kobalt-60 ve Sezyum-137) ve bunlara ilişkin dozların bitki rejenerasyonuna olan etkisini belirlemiş; uygun kaynak ve dozlar belirlendikten sonra bu kaynaktan yararlanılarak partikül bombardımanı ve bitki rejenerasyonu çalışmalarına başlamıştır (Yıldız 2009). Araştırmada, olgun embriyolardan kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan her iki buğday çeşidinde ('Çakmak 79' ve 'Bezostaja-1') de incelenen tüm karakterlerde en yüksek sonuçlar kontrol (0 Gy) uygulamasından alınmış, bunu 15 Gy'lik gama dozu uygulaması izlemiştir. Gama radyasyon dozlarındaki artışa paralel olarak elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'in üzerindeki gama dozlarında sürgün rejenerasyonu görülse de herhangi bir bitkicik gelişimi olmamıştır. Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de en yüksek sonuçların Kobalt 60 gama kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir. Sezyum 137 kaynağı kullanıldığında, incelenen tüm karakterlerden önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'lik gama ışını uygulamasında kallus ve embriyo eksplantları karşılaştırıldığında, tüm karakterlerde en yüksek sonuçların kallustan alındığı belirlenmiştir. Eksplantlar arasındaki fark özellikle rejenere olan sürgün sayısı ve gelişen bitkicik sayılarında açıkça ortaya çıkmıştır. 'Bezostaja-1' ekmeklik buğday çeşidinde Kobalt 60 kaynağı kullanıldığında, rejenere olan sürgün sayısı kallusta 15.0 iken, embriyoda 3.0 olarak gerçekleşmiştir. Gelişen bitkicik sayısı kallusta 8.3 bulunurken, embriyoda bu sayı 3.0'a gerilemiştir. Aynı çeşitte gama kaynağı Sezyum 137 olduğunda, kallusta rejenere olan sürgün sayısı 13.3 ve gelişen bitkicik sayısı da 5.0 olarak elde edilirken, embriyoda bu sayıların 3.0 ve 2.0 olarak gerçekleştiği görülmüştür. Benzer durumlar 'Çakmak 79' makarnalık çeşidi için de geçerli olup, tüm karakterlerden elde edilen sonuçların kallus eksplantında embriyo eksplantından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bitki rejenerasyonunun aksine, partikül bombardımanı aracılığıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında, kullanılan her iki çeşitte ('Çakmak 79' ve 'Bezostaja-1') ve eksplantta (embriyo ve kallus) Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gama dozu ile yapılan işlemlerde, kontrol (0 Gy) uygulamasına göre incelenen bütün karakterlerde daha yüksek sonuçlar alınmıştır. Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de petri başına gelişen en yüksek mavi nokta sayısının 15 Gy'lik gama dozu ve embriyo eksplantından elde edilmiştir. 'Bezostaja-1' çeşidinde, gen aktarılmış eksplant sayısı kallus eksplantının 15 Gy'lik dozunda 1.0, 0 Gy dozunda ise 0.7 olarak gerçekleşmiş, bu durumda petride gelişen mavi nokta sayısı 15 Gy'lik dozda 10.30 ve 0 Gy'lik dozda 3.01 olmuştur. Aynı şekilde, embriyo eksplantında gen aktarılmış eksplant sayısı 15 Gy'lik dozda 6.3 ve 0 Gy'lik dozda ise 3.7 olmuş, petride gelişen mavi nokta sayısı 15 Gy dozunda 56.70 iken, 0 Gy'lik dozda 14.06 olarak gerçekleşmiştir. Benzer durumlar 'Çakmak 79' çeşidi için de geçerli bulunmuştur. Sonuç olarak, buğdaya partikül bombardımanı yöntemi ile yapılan gen aktarım çalışmalarında embriyo eksplantına uygulanan Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gama dozu gen aktarım frekansını önemli derecede artırmıştır.

Bilindiği gibi, mutasyona uğrayan birçok gen, hücre bölünmesi ve gelişmesini etkilemektedir. Yüksek dozda gama radyasyonu kullanılarak tahıllardaki hücre bölünmesi durdurulduğunda, morfolojik olarak normal yaprakların oluşması artan hücre genişlemesi ile sağlanabilmektedir. Bu yapraklar az sayıda ancak büyük hücreleri içermektedir. Hücre bölünmesi ve genişlemesindeki olumsuzluklar, dokudaki diğer değişikliklerle giderilebilmektedir (Doonan 2000). Buğdayda *in vitro* mutagenesis tekniği kullanılarak, tuza toleranslı çeşit geliştirmede başlangıç materyali ya da gen kaynağı olarak kullanılacak rejenerantların elde edilebileceği Özgen vd. (2007) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar yürüttükleri araştırmada bitki materyali olarak Bezostaja 1 (Ekmeklik, *Triticum aestivum* L.) ve Çakmak 79 (Makarnalık, *Triticum durum* Desf.) buğday çeşitlerini kullanmışlar, 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 g/l olmak üzere toplam 6 NaCl dozunda tepkiler belirlemişlerdir. Gama radyasyonu kullanılarak yapılan muamelelerde ise dozlar, embriyolar için 100, 200, 300, 400

ve 500 Gy; kalluslar için 30, 60, 90, 120 ve 150 Gy olarak kullanılmıştır. Çalışma sonunda 12, 16 ve 20 g/l'lik tuz dozları arasında her iki çeşitte de rejenere olan bitki sayısı bakımından en yüksek değerler 12 g/l tuz dozundan elde edilmiştir. Radyasyon dozlarında ise, en yüksek rejenere olan bitki sayısı Bezostaja 1 çeşidinde, tohuma 100 Gy ve kallusa 30 Gy radyasyon dozu uygulamasından alınırken; Çakmak 79 çeşidinde tohuma 400 Gy ve kallusa 30 Gy radyasyon dozu uygulamasından elde edilmiştir.

Bu çalışmada, mutasyon oluşturmeyen düşük gama dozları kullanılarak hücre ve dokularda oluşturulan fiziksel ve biyolojik değişiklik sonucu *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı ile transgenik bitki frekansının artırılması amaçlanmıştır.

Araştırma sonuçlarından, buğdaya *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımında 80 Gy'lik gama dozunun transgenik bitki frekansını, gama kullanılmayan kontrol uygulamasına göre önemli derecede artırdığı görülmüştür.

Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla buğdaya gen aktarımında, transgenik bitki frekansının yükseltilebilmesi için daha yoğun araştırmalara ihtiyaç vardır. Zira, aynı türde kurulan farklı gen aktarımı denemeleri arasında bile gen aktarım başarısı bakımından farklılıklar görülebilmektedir. Bunun nedenlerinin araştırılması, buğdaya yapılacak gen aktarım çalışmalarının başarı oranını artıracak ve çalışmalar arasındaki farkı da ortadan kaldıracaktır.

Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Kaynaklar

Al-Safadi, B., Ayyoubi, Z. and Jawdat, D. 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 183-187.

Binka A., Orczyk W. and Nadolska- Orczyk A. 2012. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of binary vector system and selection cassette. Journal of Applied Genetics 53: 1-8.

Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 4: 9-21.

Doonan J. 2000. Social controls on cell proliferation in plants. Current Opinion in Plant Biotechnology 3: 482-487.

Görpe, A., Cantez, S. 1992. Pratik Nükleer Tıp. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.

He Y., Jones H.D., Chen S., Chen X.M., Wang D.W., Li K.X., Wang D.S. and Xia L.Q. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. Journal of Experimental Botany 61(6): 1567-1581.

Jefferson R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system, Plant Molecular Biology Reporter 5: 387-405.

Kerbauy, G.B. and Hell, K.G. 1979. Effect of gamma radiation on the *in vitro* growth of excised

pith cells of *Nicotiana tabacum* L. cv IAC-70. Int. J. Radiat. Biol. 35: 273-276.

Khanna H.K. and Daggard G.E. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine—supplemented regeneration medium. Plant Cell Reports 21: 429-436.

Kovacs E. and Keresztes, A. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. Micron 33: 199-240.

Lage C.L.S., Vasconcellos A.G., Silva N.C.B. and Esquibel, M.A. 2002. Changes in electrophoretic profiles of *Ipomoea batatas* (Sweet Potato) induced by gamma irradiation. Brazilian Archives of Biology and Technology 45: 177-182.

Li-li T., Gui-xiang Y., Li-pu D., Zheng-yuan S., Mao-yun S., Hui-jun X. and Xing-guo Y. 2011. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. Agricultural Sciences in China 10(3): 317-326.

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

Nagata, T., Todoriki, S., Hayashi, T., Shibata, Y., Mori, M., Kanegae, H. And Kikuchi, S. 1999. γ -Radiation induces leaf trichome formation in Arabidopsis. Plant Physiology 120: 113-119.

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.

Özgen M., Yıldız M. ve Yıldız Ç. 2007. Kışlık Buğdayda (*Triticum* sp.) *In vitro* Mutagenesis Aracılığıyla Tuza Toleranslı Rejenerantların Seçimi, Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK, Proje No: 104O494.

Özcan S. 1997. Effect of marker gene location in T-DNA on gene transfer from *Agrobacterium* to plant cells. Turkish Journal of Botany, 21: 189-195.

Özcan S. ve Özgen M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. Kükem Dergisi, 1: 69-95.

Qi-Man H., Wei-Hua L., Hui S., Xin D. And Jin S. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic wheat plants with glutamine synthetases confer tolerance to herbicide. Acta Phytoecologica Sinica 29(2): 338-344.

Snedecor G.W. and Cochran W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M. and Kojima M. 2006. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bioscience and Bioengineering 102(3): 162-170.

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

Voisine R., Vezina L.P. and Willemot C. 1993. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of γ -irradiated cauliflower (*Brassica oleraceae* L.). Plant Physiology 102: 213-218.

Wang Y.L., Xu M.X., Yin G.X., Tao L.L., Wang D.W. and Ye X.G. 2009. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues. Cereal Research Communications 37(1): 1-12.

Wu H., Doherty A. and Jones H.D. 2008. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes.

Transgenic Research 17: 425-436.

Voisine, R., Vezina, L.P. and Willemot, C. 1993. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of γ -irradiated cauliflower (*Brassica oleraceae* L.). Plant Physiol. 102: 213-218.

Yıldız Ç. 2009. Gama radyasyonunun buğdayda (*Triticum* sp.) partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımına ve bitki rejenerasyonuna etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

Zale J.M., Agarwal S. and Loar S. 2009. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 28: 903-913.



Ekler

Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje mali bütçesi ile aşağıdaki sarf malzemeleri satın alınmış, araştırma süresince kurulan

denemelerde kullanılmıştır.

GeneJET Plant Genomic DNA Purif. Mini Kit	Çalışma süresince elde edilecek bitkilere ait taze ve dondurulmuş örneklerden yüksek saflıkta DNA izolasyonu
Taq DNA Polymerase, 500 Units, 10X Buffer ve MgCl ₂	DNA örneklerine uygulanacak PCR analizleri
DreamTaq DNA Polymerase	DNA örneklerine uygulanacak PCR analizleri
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	PCR reaksiyonu sunucunda elde edilecek materyallerin jel analizlerinde boyut tayini yapılması
Biomax Agaroz	PCR reaksiyonu sonucunda elde edilecek materyallerin agaroz jel elektroforezi
Water, Molecular Biology Grade, Dnase, Rnase, Protease free	PCR, DNA izolasyonu ve diğer moleküler çalışmalar
dNTP Mix, 10 mM each	DNA örneklerine uygulanacak PCR analizleri

Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

Yayımlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

T: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında

ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

