



Onkogenik *Agrobacterium tumefaciens* A281 Hattı ile Çivit Otu (*Isatis constricta* Davis) Bitkisinde Tümör Oluşumu

Çiğdem Alev ÖZEL¹

Geliş Tarihi: 24.07.2007

Öz: Bu çalışmada, *Isatis constricta* (çivit otu) bitkisinden çimlendirme sonucu elde edilen *in vitro* gelişen yaprak ve yaprak sapı eksplantları *Agrobacterium tumefaciens*'in onkogenik A281 hattıyla inoküle edilmiştir. Tümör oluşumu, eksplantlar inoküle edildikten 15 gün sonra başlamış olup, 4 hafta sonra GUS analizi yapılmıştır. En fazla tümör oluşumu yaprak sapı eksplantında 50 mg/l kanamisin içeren aydınlık (16 saat ışık fotoperiyodunda) denemesinden elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler *Isatis constricta* (çivit otu), *Agrobacterium tumefaciens*, GUS analizi, tümör oluşumu.

Tumor Formation in *Isatis constricta* Davis (woad) Using Oncogenic A281 Strain of *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract: Leaf and petiole explants obtained from *in vitro* grown seedlings of *Isatis constricta* (woad) were treated with oncogenic A281 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. Tumour formation started on explants after 15 days and continued until 4 weeks when gus test was performed. The highest gus positive results were recorded from petiole explants selected on medium containing 50 mg/l kanamycin under 16 h light photoperiod.

Key Words: *Isatis constricta* (woad), *Agrobacterium tumefaciens*, GUS analysis, tumour formation,

Giriş

Isatis constricta Davis (Brassicaceae) çok yıllık bir bitkidir. Türkiye için endemik olan bu bitki Adana, Elazığ ve İçel yörelerinde doğal olarak bulunmaktadır (Tubives 2007). Bu bitkinin ilk yıl oluşan yapraklarından elde edilen boya değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Geçmişte, yapraklarından elde edilen çivit renkli boyasıyla, çok yaygın olarak halıcılıkta kullanılmıştır. Günümüzde, çevreye zarar vermeden tehlikesizce kullanılabilmesi ve doğada parçalanma özelliğine sahip olması nedeniyle Almanya' da ahşapların bozulmasının önlenmesinde, İngiltere' de yazıcı mürekkeplerinin imalatında kullanılmaktadır. *Isatis* yapraklarında bulunan glucobrassicin maddesi Çin'de kanser önleyici olarak kullanılmaktadır (Anonim 2007). Ayrıca güçlü kök sistemi sayesinde de toprak erozyonu önlemektedir. Günümüzde de *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* bakterileri ile özellikle çift çenekli bitki türlerine; herbisitlere, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi özelliklerin bitkilere aktarımı yaygın olarak yapılmaktadır. Ancak, bu yöntemde gen aktarım oranı bitki türlerine göre değişmekle birlikte oldukça düşüktür. Bu yüzden arzu edilen genin çalışılan kültür

bitkisine aktarılabilmesi, etkin bir gen aktarma sisteminin geliştirilmesine bağlıdır. Bu çalışmanın amacı; *I. constricta* bitkisinde değişik eksplantlar kullanarak *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ile *in vitro* koşullarda gen aktarım çalışmalarına uygun olup olmadığını araştırmaktır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali: Çalışmada kullanılan bitki materyali *I. constricta* Elazığ Maden İlçesinden 2006 yılında ve *A. tumefaciens*'in A281 pB1211 hattı (Hood ve ark. 1986) G.Ü Gazi Eğitim Fakültesi'nden temin edilmiştir. pB1211 plazmidi T-DNA bölgesinde GUS ve NPT-II genleri taşımaktadır.

Büyüme ortamları ve kültür koşulları: Çalışmada MS besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) % 3'lük sukroz ilave edilerek kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, otoklavlanmadan önce 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6 - 5.8'e ayarlanmıştır.

¹Gazi Üniv. Gazi Eğitim Fak. Biyoloji Eğitimi ABD- Ankara

Ortama agar %0.7 g/l (Type A, Sigma) ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır. Sterilizasyonu otoklavda 1.2 atmosfer basınç ve 120 °C'de 20 dk. tutularak sağlanmıştır. *I. constricta* tohumları %25 çamaşır suyunda (Ace) +Tween 20 1/100 (v/v) 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez 5'er dakika steril distile su ile durulanmıştır. Steril petri kapları içerisinde, uygun aşamada uygun eksplant almak amacıyla MS temel besin ortamında çimlendirilmiştir. Tüm kültürler Philips beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight - 42 µmol photons m⁻² s⁻¹) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24 ± 2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır. *In vitro* gelişen 4 aylık bitkilerden yaprak sapı ve yaprak eksplantları izole edilerek *A. tumefaciens*'in A281 pBI1211 hattı (Hood ve ark. 1986) ile 1:50 oranda MS sıvı ortamda ½ saat muamele edilmiştir. Daha sonra buradan alınan eksplantlar 24 saat süreyle MSO içeren ortamda kokültüvasyona alınmıştır. Tüm eksplantlar 500 mg/l Cefotoksin ve farklı konsantrasyonlarda Kanamisin (0-25-50 mg/l) içeren MS seleksiyon ortamına her petride 4'er eksplant olacak şekilde, 3 tekerrür hem karanlık (24 saat karanlık) hem de aydınlık (16 saat ışık) fotoperiyoduna kültüre alınmıştır. Eksplantlar da 4 hafta sonunda GUS pozitif testi gen aktarımının yapıp yapılmadığına bakılmıştır.

Histokimyasal GUS Analizi: Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'in protokollerine göre 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 glucoronide (X-gluc) içeren solüsyonda 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular % 100'lük alkolde yıkanarak mavi bölgeler belirlenmiştir.

İstatistiksel Değerlendirmeler: Denemede elde edilen verilerin ortalamaları "SPSS 13 for Windows" programı yardımıyla ONE WAY ANOVA'ya tabi tutulmuştur. Muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan testi yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Eksplantlarda tümör oluşumu, inokülasyondan 15 n eksplantların mavi renk vermesi *gus* geninin başarı ile bitki genomuna entegre olduğunu kanıtlamıştır. Bu eksplantların GUS pozitif yüzdesine bakılmış ve Duncan analizi yapılmıştır (Çizelge 1).

Bu çalışmada yaprak sapı eksplantlarında aydınlıkta gün sonra başlamıştır. Tümör oluşumu başlangıcından 4 hafta sonra GUS analizi yapılmıştır. X-gluc ile yapılan muamele sonucunda, 24 saat sonra GUS pozitif ola25-50 mg/l Kanamisin içeren seleksiyon

ortamında en iyi sonuçlar (%58,3-66,6) (Şekil 1) elde edilirken; Aynı ortamlarda yaprak eksplantlarında ise sonuç alınamamıştır. Karanlık ortamda seleksiyona bırakılan eksplantlarda ise genel olarak yaprak sapı eksplantının daha iyi sonuç verdiği ancak her iki eksplanta da aydınlığa göre belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

Rejenerasyon ve gen aktarım çalışmaları birbiri ile çok yakından ilgilidir (Evrett ve ark. 1987, Alibert ve ark. 1999). Eksplantın yaşı (Schrammeijer ve ark.1990), eksplanta yapılan işlemler (Bidney ve ark. 1992; Knittel ve ark.1994; Grayburn and Vick, 1995), *Agrobacterium* hattı ve vektör kombinasyonu (Bidney ve ark. 1992), ko-kültivasyon süresi, kültür ortamının hormonal kompozisyonu (Schrammeijer ve ark.1992, Escandon ve Hahne 1991; Pugliesi ve ark. 1993) seleksiyon ortamının özellikleri ile konsantrasyon (Moyne ve ark. 1989; Laparra ve ark. 1995) *Agrobacterium* ile gen aktarım çalışmalarını etkilemektedir. Bu çalışmada da farklı eksplant tipi ve seleksiyon ortamının özellikleri etkili olmuştur. Ayrıca, GUS geninin bitki kromozomlarındaki pozisyon etkisine bağlı olarak, aynı deneme içinde farklı eksplantların mavilik tonu ve yüzeyindeki alanında da da değişiklik görülmüştür.

Khawar ve ark. (2004) tarafından *Trigonella foenum-graecum*'da seleksiyon ortamında 50 mg/l kanamisin içeren besin ortamında yapılan *Agrobacterium tumefaciens* A281 hattıyla yaptıkları çalışmada da farklı eksplant kullanımı farklı oranlarda tümör oluşumuna neden olmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızı desteklemektedir.



Şekil 1. *In vitro* koşullarda *A. tumefaciens* 'in onkogenik A281 pBI1211 hattı ile 16 saat ışık fotoperiyoduna muamele edilmiş *I. constricta* yaprak sapı eksplantlarının 50 mg/l Kanamisin içeren seleksiyon ortamlardan gelişen örneklerin GUS negatif ve pozitif görüntüleri.

Çizelge 1. *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 pBI1211 hattının *I.constricta* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında GUS pozitif oluşumuna ait Duncan testi sonuçları

| Muamele | Kanamisin (mg/l) | Eksplant başına GUS pozitif % | |
|--------------------------|------------------|-------------------------------|-------------|
| | | Yaprak | Yaprak sapı |
| 16 saat ışık fotoperiyod | 0 | 33,3b | 0,00c |
| | 25 | 00,0c | 58,3ab |
| | 50 | 00,0c | 66,6a* |
| Karanlık | 0 | 41,6ab | 50,0ab |
| | 25 | 00,0c | 33,3b |
| | 50 | 25,0b | 25,0b |

*Aynı sütunda farklı harfle gösteren ortamlar arasında fark 0.05 düzeyinde önemlidir

Mercuri ve ark. (2000) Afrika menekşesinde *Agrobacterium* A281 ile yaptığı çalışma da en iyi sonuçlar yaprak sapı eksplantında elde edilmiştir. Bu açıdan çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Bhatnagar ve Khurana (2003) *Morus indica*'da yaptıkları çalışmada, hipokotil, kotiledon, yaprak, eksplantlarını kullanarak, 50–75 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamına almışlardır ve 7 gün sonra yapılan GUS analizinde yaprak eksplantlarının %50'si GUS pozitif çıkmıştır. Bu sonuçlar bizim kullandığımız eksplant (yaprak) ve kanamisin oranı ile benzerlik göstermektedir.

I. constricta bitkisinin yaprak sapı eksplantlarına, X- Gluc muamelesi sonucunda GUS pozitif sonuçlar elde edilmesi *in vitro* koşullarda *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarılabileceğini göstermektedir. Yapılan bu çalışma ile *I. constricta* bitkisine ileride herbisitlere, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin aktarılabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışmada; Prof. Dr. Orhan Arslan, Prof. Dr. Sebahattin Özcan'a bilimsel katkılarından ve laboratuvar aşamasında Proje Öğrencileri Funda Özdemir, M. Alev Ateş ve Dilek Çam'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Kaynaklar

Alibert, B., O. Lucas, V. Gall, J. Kallerhoff, B. Alibert. and V. Gall. 1999. Pectolytic enzyme treatment of sunflower prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient beta glucuronidase expression, *Phylogia Plantarum* 106:2, 232-237.

Anonim <http://en.wikipedia.org/wiki/woad>. (12/06/2007)

Bhatnagar, S. and P. Khurana. 2003 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated of Indian mulberry, *Morus indica* cv. a time-phased screening strategy *Plant Cell Rep*21:669–675.

Bidney, D., C.Scelonge, J. Martich, M. Burrus, L. Sims and G. Hoffman. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18: 301-313.

Escandon, A.S. and G. Hahne. 1991. Genotype and composition of culture medium are factors important for transformed sunflower (*Helianthus annuus* L) callus. *Physiol. Plant.*, 81: 367-376.

Evrett, N. P., K.E.P. Robinson and D. Mascarenhas. 1987. Genetic Engineering of Sunflower (*Helianthus annuus*) ., *Bio/Technology*, 5; 1201-1204 .

Grayburn, W.S. and B.A. Vick. 1995. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Rep.*, 14: 285-289.

Hood, E.E. , G.L. Helmer, R.T. Fraley and M.D. Chilton. 1986. The hyper virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of p Ti Bo542 outside of T- DNA." *J. Bacteriol.*, 168; 1291-1301.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5; 387-405.

Knittel, N., V. Gruger, G. Hahne and P. Lénéé. 1994. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol. *Plant Cell Rep.*, 14: 81-86.

Khawar K.M., S. Gulbitti-Onarıcı, S. Çöçü, S. Erişen, C. Sancak and S. Özcan. 2004. *In vitro* crown galls induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 (pTiBo542) in *Trigonella foenum- graecum*. *Biologia Plantarum*. 48(3): 441-444.

Laparra, H., M. Burrus, R. Huonold, B. Damm, A. M. Bravo- Angel, R. Bronner and G. Hahne. 1995. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) evaluation of three gene transfer methods. *Euphytica*, 85: 63-74.

Mercuri A., L. De. Benedetti, g. Burchi and T. Schiva. (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of African violet *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*60: 39–46, 2000.

Moyne, A.L., D. Tagu, V. Thor, C. Bergounioux, G. Freyssinet and P. Gadal. 1989. Transformation calli obtained by direct gene transfer into sunflower protoplast. *Plant Cell Rep.*, 8: 97-100.

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

Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation. (Ph.D. Thesis), University of Leicester, U.K.

Pugliesi, C., P. Megale, F. Cecconi and S. Baroncelli. 1993. Organogenesis and embryogenesis IN *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33: 187-193.

Schrammeijer, B., P.C. Sijmons, P.J.M. Van den Elzen and A. Hoekema. 1990. Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*. *Plant Cell rep.* 9: 55-60.

Tubives 2007. [http:// www.tubitak.gov.tr/tubives](http://www.tubitak.gov.tr/tubives)

İletişim adresi:

Çiğdem Alev ÖZEL

Gazi Üniv. Gazi Eğitim Fak. Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı
Dekanlık Binası Z-18 Teknikokullar-Ankara