



## Yabani *Agrobacterium tumefaciens* A281 Hattıyla Ayçiçeğinde Tümör Oluşumu

Ülkü BİNBOĞA-MERAL<sup>1</sup>

Geliş Tarihi: 04.10.2006

**Öz:** Bu çalışmada ayçiçeğinin Ekiz genotipinden seçilen 9 farklı hatta ait *in vitro* gelişen bir haftalık bitkicikler kullanılmıştır. Her hattan yaprak, yaprak sapı ve olgunlaşmış kotiledon eksplantları bitkiciklerden izole edilerek *Agrobacterium tumefaciens*'in onkogenik A281 hattıyla inokule edilmişlerdir. Tümör oluşumu eksplantlar inoküle edildikten 6-7 gün sonra başlamış olup, 4 hafta sonra denen ayçiçeği hatlarına ait bütün eksplantlarda tümör oluşumu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Helianthus annuus* L., *Agrobacterium tumefaciens*, onkogenik, tümör oluşumu

### Tumor Formation in Sunflower Using A281 Strain of *Agrobacterium tumefaciens*

**Abstract** One week old *in vitro* plantlets of nine lines selected from genotype Ekiz of sunflower were used in this study. Leaf, petiole and immature cotyledon explants from each line were treated with oncogenic A281 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. Tumors induction started on all explants with in 6-7 days of culture and 100% tumor formation was observed on all explants after 4 weeks of culture.

**Key Words:** *Helianthus annuus* L. *Agrobacterium tumefaciens*, oncogenic, tumor formation.

#### Giriş

Dünya nüfusunun hızla artması tarımsal açıdan işlenebilir alanların sabit kalması veya giderek azalması nedeniyle, bazı yıllarda ve bazı bölgelerde beslenme sorunuyla karşı karşıya kalınmaktadır. Bu sorunun her geçen gün önemi daha da artmaktadır. Açlık ve dengesiz beslenme sorununun çözümü için ise enerji, protein, vitamin ve mineral maddeler yönünden zengin besinlerin üretimi ve tüketimini yaygınlaştırmak gerekmektedir. Uygun teknolojinin geliştirilmesine, ıslah edilmiş çeşitlerin kullanılmasına rağmen dünyada birçok monokültür tarım yapılan alanlarda verim azalmaktadır.

Günümüzde *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* bakterileri ile özellikle çift çenekli bitki türlerine gen aktarımı yaygın olarak yapılmaktadır. Ancak, bu yöntemde gen aktarım oranı bitki türlerine göre değişmekle birlikte oldukça düşük olup, arzu edilen genin çalışılan kültür bitkisine aktarılabilmesi, öncelikle etkin bir gen aktarma sisteminin geliştirilerek uygulamaya konulmasına bağlıdır. Rejenerasyon ve

gen aktarım çalışmaları birbiri ile çok yakından ilgilidir. Ayçiçeğine ilk gen aktarım çalışmalarında hipokotil eksplantı kullanılmıştır (Evrett ve ark. 1987, Alibert ve ark. 1999) Bu çalışmalarda ayçiçeğinde transformasyon çalışmalarının oldukça zor olduğunu bildirmiştir.

Eksplantın yaşı (Schrammeijer ve ark.1990), eksplanta yapılan işlemler (Bidney ve ark. 1992; Knittel ve ark.1994; Grayburn ve 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 (Moyné ve ark. 1989, Laparra ve ark. 1995) *Agrobacterium*'ile ayçiçeğinde gen aktarım çalışmalarını etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı; ayçiçeğinin Ekiz genotipine ait değişik eksplantlar kullanarak *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı aracılığıyla *in vitro* koşullarda gen aktarım çalışmalarına uygun olup olmadığı araştırılmaktadır.

<sup>1</sup>Doktora tezinden hazırlanmıştır.  
Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü-Ankara

### Materyal ve Yöntem

**Bitki Materyali:** Çalışmada kullanılan bitki materyali Ekiz genotipinden seçilen 12/15, 15/12, 24/19, 28/29, 48/33, 13/34, 34/26, 25/33, 5/6 numaralı hatlar ve *A.tumefaciens*'in A281 pBI1211 hattı (Hood ve ark. 1986) A.Ü Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.pBI1211 plazmid T-DNA bölgesinde GUS ve NPT-II genleri taşımaktadır.

**Büyüme ortamları ve kültür koşulları:** Çalışmada MS besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) % 2'lik sukroz ilave edilerek kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, otoklavlanmadan önce 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6 - 5.8'e ayarlanarak ortama agar (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. Tüm kültürler Philips beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight - 42 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24 ± 2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır. Sterilizasyon uygulanan Ekiz genotipinin 9 hattına ait tohumlar (Çizelge 1) yine steril petri kapları içerisinde, uygun aşamada uygun eksplant almak amacıyla MS temel besin ortamında çimlendirilmiştir. *In vitro* gelişen bir haftalık bitkiciklerden yaprak, yaprak sapı ve olgunlaşmış kotiledon eksplantları izole edilerek *A.tumefaciens*'in A281 hattı (Hood ve ark. 1986) ile 1:50 oranda MS sıvı ortamda ½ saat bekletilmiştir.

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

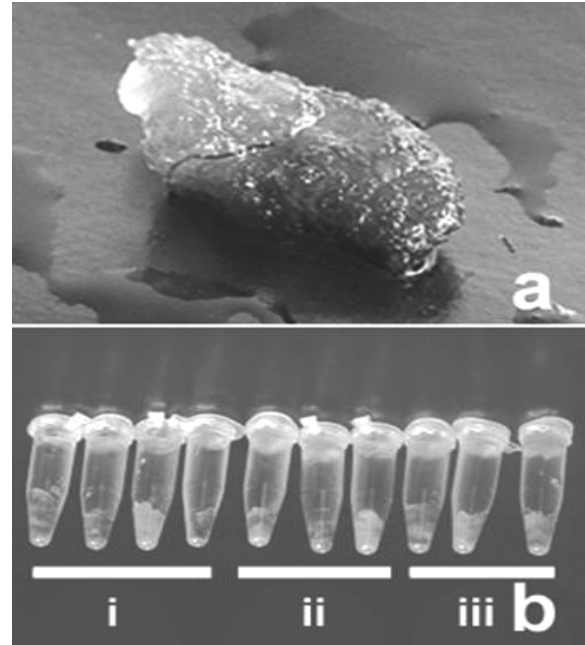
**İstatistiksel Değerlendirmeler:** Denemede elde edilen verilerin ortalamaları "SPSS for Windows" programı yardımıyla ONE WAY ANOVA'ya tabi tutulmuştur. Muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan testi yapılmıştır.

### Bulgular ve Tartışma

*Agrobacterium tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ve ayçiçeğinin Ekiz genotipinin 9 hattı ile yapılan gen aktarımı çalışmalarında *in vitro* gelişen bitkiciklerden yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantları izole edilerek kullanılmıştır. Tümör oluşumu inoküle edildikten 6-7 gün sonra başlamıştır. Tümör oluşumu başlangıcından 4 hafta sonra *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ile tüm ayçiçeği

hatlarında %100 tümör oluşumu görülmüştür. 13/34 numaralı hatta hem yaprak sapı hemde kotiledon eksplantında sırası ile en büyük tümör çapı 2,52 cm ve 2,74 cm olarak belirlenmiştir. Yaprak eksplantında en büyük tümör çapı (2,18 cm) 28/29 hattında tespit edilmiştir. Eksplantın büyük bir kısmında çok koyu bir mavi renk oluşumu görülürken diğer kısmında mavi renk oluşumu gerçekleşmemiştir. Bu durum GUS geninin bitki kromozomlarındaki pozisyon etkisine bağlı olmaktadır. A281 ile yapılan bu çalışmada GUS ekspresyonunu çok yüksek olarak gerçekleştirmiştir. X-gluc ile yapılan muamele sonucunda renk oluşumu ilk yarım saat içinde meydana gelmiştir.

Tümör ağırlığı değerleri yaprak sapı eksplantında 0,41-1,99 g arasında, yaprak eksplantında 0,42 - 2,56 g arasında ve kotiledon eksplantında 0,69 - 2,88 g arasında değişmiştir. En ağır tümör 2,88 g ile kotiledon eksplantının 13/34 hattında ve en küçük değer yaprak sapı eksplantının 28/29 hattında 0,41 g ile görülmüştür (Çizelge 1). Gaponenko ve ark. (1991), *A. tumefaciens*'in A281, pBI121 hattları ile Enesw-ei, Peredovik, Rzhaksinskii, Ultraskorospelyl ve inbred hat 36-29 ile inokule edilmiştir. Rzhaksinskii çeşidinde her iki *Agrobacterium* hattı ile transgenik kallus elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda transgenik tümörler elde edilmiştir. Bu yönüyle çalışmalarda benzerlik görülmüştür.



Şekil 1. *In vitro* koşullarda onkogenik *A. tumefaciens* 'in A281 hattı ile ayçiçeğine gen aktarımı (a) ayçiçeğinin 12/15 hattına ait yaprak sapı eksplantı ile tümör oluşumu ve GUS pozitif görüntüsü (b-i) yaprak (b-ii) yaprak sapı (b-iii) kotiledon eksplantlarına ait GUS pozitif testi.

Çizelge 1. *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattının Ayçiçeğinin Ekiz genotipine ait 9 hattın yaprak, yaprak sapı, kotiledon eksplantlarında tümör oluşumuna ait Duncan testi sonuçları

Hat	Tümör Çapı (cm)			Tümör Ağırlığı (g)		
	Yaprak sapı	Yaprak	Kotiledon	Yaprak sapı	Yaprak	Kotiledon
12/15	0,51 c*	1,18 b	1,23 d	1,99 a	2,56 a	2,41 a
15/12	0,47 c	0,94 c	1,51 cd	1,53 ab	2,32 a	2,04 a
24/19	2,01 ab	1,28 b	1,70 c	0,51 c	0,56 c	1,55 b
28/29	1,40 b	2,18 a	2,28 ab	0,41 c	1,53 b	0,69 c
48/33	2,07 ab	1,32 b	1,72 c	1,51 ab	0,49 c	0,69 c
13/34	2,52 a	1,22 b	2,74 a	1,77 a	0,42 c	2,88 a
34/26	1,43 b	1,92 a	1,64 cd	0,63 c	1,70 b	0,85 c
25/33	2,49 a	2,14 a	2,54 a	1,65 a	1,18 b	1,25 bc
5/6	1,98 ab	1,80 ab	2,55 a	1,09 b	0,94 bc	1,68 b

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

*A. tumefaciens*'in A281 hattı ile aşılması ile oluşan tümörler ve bu tümörlerin X- Gluc ile muamelesiyle tüm tümörlerde GUS pozitif sonuçlar elde edilmesi *in vitro* koşullarda ayçiçeğine *Agrobacterium*'la gen aktarılabilirliğini göstermektedir. *A. tumefaciens*'in onkogenik hattı A281 ile muamele sonucunda eksplantlarda oluşan tümörler ve çalışma sonucunda elde edilen veriler herbisitlere, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinde ayçiçeği bitkisine aktararak, transgenik bitkilerin elde edilebileceğini göstermektedir.

#### Kaynaklar

- Alibert, B., O. Lucas, V. Gall and J. Kallerhoff, (1999). Pectolytic enzyme treatment of sunflower prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient beta glucuronidase expression, *Physiologia Plantarum* 106:2, 232-237.
- 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 .
- Gaponenko, AK., IP.Voronina, Yu, D. Beletskii, AS. Konov and K.Skryabin, 1991.Effectiveness of the transformation of immature embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.)1 Vsesoyuznyi simpozium Novey metody bioteknologii rastenii, Pushchino, 123: 13-14.
- 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., GL. 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.
- 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.
- 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 İN *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

#### İletişim Adresi:

ÜİKÜ BİNBOĞA-MERAL

Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü-Ankara

E-posta: ubmeral@yahoo.com