

OLGUNLAŞMIŞ ARPA (*Hordeum vulgare* L.) EMBRİYOLARINA PARTİKÜL BOMBARDIMANI TEKNİĞİ İLE MARKÖR GEN AKTARIMI

Nur KOYUNCU Murat ÖZGEN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara, Türkiye
Sorumlu yazarın E-posta adresi: mozgen@tr.net

Özet

Tahıllarda son yıllarda büyük aşama kaydeden partikül bombardımanı tekniğinin arpaya (*H. vulgare* L.) uygulanarak markör gen aktarımı olanaklarının araştırılması ve olgun embriyo bombardımanı için en uygun fiziksel parametrelerin (bombardıman basıncı ve mesafesi) belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma 2000 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırmada bitki materyali olarak Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen “Tokak 157/37” çeşidinin olgun embriyoları, partikül olarak 1.6 µm’lik altın parçacıkları ve markör gen olarak “pB1221.23” plazmidine bağlanan “GUS” geni kullanılmıştır. Bombardıman, “Bio-Rad Biolistic®/ PDS-1000/He Gen Aktarma Sistemi” ile yapılmıştır. Atışlar öncelikle mümkün olan tüm basınç (650, 1100, 1350, 1550 ve 1800 psi) ve mesafelerde (6, 9, 12 ve 15 cm) bir kez yapıldıktan sonra, en iyi sonucu veren basınç ve mesafenin bulunmasına yönelik tekrarlamalı denemelerin yapılması ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak incelenen verilerden, olgun arpa embriyolarına biyolistik yöntemle markör gen aktarımı için 650, 900 ve 1100 psi’lik basınçların ve 6-9 cm’lik mesafelerin uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arpa, Partikül Bombardımanı, Biyolistik, Gen Aktarımı, GUS

Marker Gene Transfer into Mature Embryos of Barley (*Hordeum vulgare* L.) through Microprojectile Bombardment

Abstract

This study was carried out at the biotechnology laboratory of Field Crops Department, Faculty of Agriculture, Ankara University, in 2000, to investigate marker gene transfer possibilities to barley (*H. vulgare* L.) using the particle bombardment technique and to determine suitable physical parameters (bombardment pressure and distance) for mature embryo transformation. Study used mature embryos of the cultivar “Tokak 157/37” which has been grown extensively in Turkey, as plant material; 1.6 µm diameter gold particles as microprojectiles; the plasmid “pBI221.23” containing the “GUS” gene as marker gene. “Bio-Rad Biolistic®/PDS-1000/He Gene Transfer System” was used for bombardment, and the bombardments were carried out by repeating experiments aiming to find the pressure and distance that gives the best results. Analyses indicated that 650, 900 and 1100 psi pressures and 6-9 cm distances were suitable for biolistic delivery marker gene transfer to mature barley embryos.

Keywords: Barley, Particle Bombardment, Biolistic, Transformation, GUS

1. Giriş

Günümüzde ekonomi ve beslenme açısından önemli bir yere sahip olan buğdaygillere klasik ıslah çalışmalarının yanında biyoteknolojik yöntemler ile gen aktarılabilirliği; bu bitkilerin kalite ve verimlerinin artırılmasında yeni olanaklar sağlamaktadır. Bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium* türleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem ile buğdaygilleri de kapsayan tek çeneklilere gen aktarımında istenilen sonucun alınamaması (Potrykus, 1990; Raineri ve ark., 1990) bu bitkilerde kullanılacak doğrudan gen aktarım yöntemlerinin önemini artırmaktadır. Bunlardan biri olan partikül bombardımanı

tekniklerinin geliştirilmesi ve sorunlarının giderilmesi ile bitki genetik mühendisliği tekniklerinin gelecekte bitki ıslahında önemli bir yer alması ve çalışmalara yeni boyutlar kazandırması beklenmektedir.

Tahıllarda son yıllarda büyük aşama kaydetmiş olan partikül bombardımanı tekniği ile buğdayda pek çok önemli çalışma yapılmasına karşın; dünyada 134 milyon tonluk üretimle (Anonim, 2000) dördüncü sırada yer alan arpada çalışmalar daha az sayıda olup, eksplant olarak olgunlaşmamış embriyolar üzerinde yoğunlaşmıştır. Türkiye’de ise, 9 milyon tonluk üretimle (Anonim, 2000) buğdaydan sonra ikinci

sırada yer alan arpada, partikül bombardımanı (biyolistik) tekniği ile gen aktarımı ve olgun embriyoların kullanımı, bu çalışma ile ilk kez gerçekleştirilmiştir. Amacı, biyolistik yöntemin arpaya uygulanabilmesi olanaklarının araştırılması ve olgun embriyo bombardımanı için en uygun bombardıman mesafesi ve basıncın belirlenmesi olan çalışma ile ileride arpada stabil gen aktarılmış bitkilerin elde edilmesinde temel oluşturacak verilerin alınması planlanmıştır.

Partikül bombardımanı ile yapılan gen aktarımı çalışmalarında başarı oranı uygun kalibrasyon ile kullanılan bitki türü, seçilen eksplant cinsi ve bu eksplantın kallus oluşturma ve rejenerasyon yeteneğine bağlıdır. Bombardıman eksplantlara, kalluslara ve kallus süspansiyon kültürlerine uygulanabilmektedir. Monokotiledonlarda kallus oluşturmak için eksplant kaynağı olarak olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış çiçek ve apikal meristemler kullanılmaktadır. Tahıllarda yapılan birçok optimizasyon çalışmasında hücre süspansiyon kültürleri (Kartha ve ark., 1989; Ritala ve ark., 1993) ve olgunlaşmamış embriyolar (Wan ve Lemaux, 1994) hedef hücre olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada ise her zaman kolaylıkla elde edilebilen olgun embriyolar kullanılarak arpa ıslahı çalışmalarında biyolistik yöntemle önemli gelişmelerin sağlanması ve yeni çeşit geliştirmede özellikle yabancı genitörlerden yararlanma olanaklarının artırılması amaçlanmaktadır.

2. Materyal ve Yöntem

Bitki materyali olarak Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen “Tokak 157/37” çeşidinin olgun embriyoları kullanılmıştır. Atışlarda partikül olarak 1.6 µm’lik altın parçacıkları, markör gen olarak “pBI1221.23” plazmidinde bulunan GUS geni kullanılmıştır (Lonsdale ve ark., 1990). Altın partiküllerinin (1.6 µm) plazmid DNA ile kaplanması PDS-1000/He partikül bombardımanı cihaz protokolüne göre yapılmıştır. Altın/DNA süspansiyonunda makroprojektilere 6 ml dağıtılıp vakum altında kurutulmuştur.

Islatılıp bekletilen tohumların kavuzları uzaklaştırılarak yüzey sterilizasyonu için etil alkolde (% 70) 5 dakika bekletilip 3 kez steril saf suda yıkanıp, 25 dakika % 5 sodyum hipokloritde çalkalandıktan sonra 7 kez steril su ile durulanarak 2 saat steril suda (33 °C) şişmeleri sağlanmıştır (Özgen ve ark., 1998). Steril kabinde bistüri ve pens yardımıyla ayrılan embriyolar 2,4-D (2 g/l), MS (Murashige ve Skoog, 1962), sukroz (20 g/l) ve agardan (7 g/l) oluşan ortamlara (pH 5.8 ve 121 °C, 15 psi basınçta steril edilmiş) yerleştirilmiştir. Her petrinin merkezine skutellum yüzeyleri ortama geçecek şekilde 50 embriyo konulmuştur. İnkübatörde (26 °C) 24 saat karanlıkta bekletilen embriyolar daha sonra bombardıman edilmiştir. Çalışmada basınç olarak 650, 900, 1100, 1350, 1550 ve 1800 psi ve mesafe olarak 6, 9, 12 ve 15 cm olarak toplam 1200 embriyoya 24 atış gerçekleştirilmiştir. Bombardımandan sonra dokular karanlıkta 26 °C 48 saat inkübe edilmiştir. Embriyolar daha sonra gen geçişlerinin belirlenmesi için Jefferson (1987) göre hazırlanan X-Gluc solüsyonuna alınmıştır. 24 saat süre ile 37 °C ve karanlıkta bekletilen embriyolar etil alkolle yıkanarak mikroskopta incelenmiş elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi Khi-kare (χ^2) bağımsızlık testi ile yapılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

50 embriyo başına yapılan atışlardan elde edilen sonuçlara göre, bombardıman başarısı, mavi noktalı embriyo sayısı ve bundan hesaplanan mavi noktalı embriyo yüzdesi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 1). Denemede kullanılan tüm atış basınçları ve mesafelerden elde edilen mavi noktalı embriyo yüzdeleri incelendiğinde 6 ve 9 cm mesafelerinin diğer mesafeler olan 12 ve 15 cm den, 650, 900, 1100 basınçlarında 1350, 1550 ve 1800 psi’lik basınçlardan daha etkili olduğu (P<0.01) belirlenmiştir. Bu atışlar ve basınçlarda mavi nokta sayılarının 0-7, embriyo başına mavi nokta sayılarının tüm kültüre alınan embriyolarda 0-0.1, mavi noktalı embriyolarda 0-3.5 arasında değiştiği görülmüştür. Elde edilen sonuçların bir kez

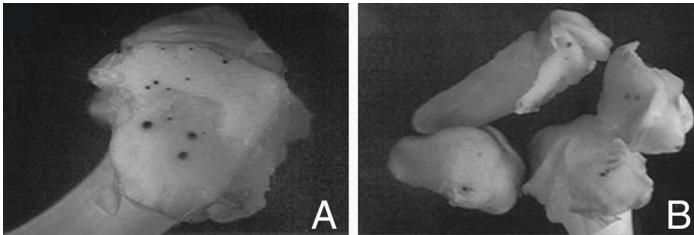
daha gözlemlenmesi amacıyla atışlar 2 tekrarlamalı olarak yenilenmiş ve 600 embriyoya 12 atış yapılarak 87 mavi nokta elde edilmiş 38 embriyoda % 8 oranında mavi nokta belirlenmiştir (Çizelge 1).

Tüm denemelerde atışlarımızdan en iyi sonucu veren 3 basınç (650, 900 ve 1100 psi) ve 2 mesafeye (6 ve 9 cm) ilişkin değerler toplu olarak irdelendiğinde, görüldüğü gibi, ortalama değerlere göre en yüksek mavi noktalı embriyo sayısı ve yüzdesi ile en yüksek mavi nokta sayısı 1100-9 atışlarından; mavi nokta/embriyo oranı bakımından en yüksek değerler tüm kültüre alınan embriyolarda 1100-9, mavi noktalı embriyolarda ise 650-9 atışlarından sağlanmıştır. Çizelgede incelenen atış basınç ve mesafeleri arasında yapılan Ki-kare analizine göre önemli bir farklılık olmadığı ($\chi^2 = 3.8$; $P > 0.05$) belirlenmiştir.

Ritala ve ark. (1994) olgunlaşmamış arpa embriyolarına 6 cm mesafeden yaptıkları atışlarda ve Becker ve ark. (1994) olgunlaşmamış kışlık buğday embriyolarına 900, 1100, 1350 ve 1550 psi basınçlarından ve 6 cm mesafeden yaptıkları atışlarda başarılı sonuçlar almışlardır. Bommineni ve ark. (1997) makarnalık buğdayda olgunlaşmamış embriyolara 1100 psi ve 9 cm ile başarılı gen aktarımları yapmışlardır. Rasco-Gaunt ve ark. (1999) üç kışlık buğday çeşitinde olgunlaşmamış embriyolara 650, 900, 1100, 1350 ve 1550 psi basınçlarından atışlar yapmışlar ve 650, 900, 1100 psi ile 5.5 cm mesafede, 1350, 1550 psi fırlatma basınçlarına göre daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyo ile ilgili benzer çalışmalar yapan diğer araştırmacılar genellikle 1100 psi'lik basıncın en uygun olduğunu (Wan ve Lemaux, 1994; Hagio ve ark., 1995; Harwood, 2000) mesafe olarak ise genellikle 12 cm'den en iyi sonuçların alındığı belirtilmektedir (Wan ve Lemaux, 1994; Hagio ve ark., 1995).

Çizelge 1. Olgunlaşmış arpa embriyolarına en iyi sonuçları veren farklı 3 basınç ve 2 mesafeden yapılan atışlardan elde edilen mavi nokta değerleri sonuçları

Basınç ve mesafesi (psi- cm)	Mavi Noktalı Embriyo (%)	Mavi Nokta Sayısı (adet)	Mavi Nokta/Embriyo	
			Tüm Kültüre Alınan Embriyolarda	Mavi Noktalı Embriyolarda
650-6/I	28	37	0.7	2.6
II	4	2	0.04	1.0
III	0	0	0	0
IV	6	4	0.1	1.3
V	6	3	0.1	1.0
Ortalama	8.8	9.2	0.2	1.2
650-9/I	38	73	1.5	3.8
II	2	1	0.02	1.0
III	0	0	0	0
IV	10	24	0.5	4.8
V	4	8	0.2	4.0
Ortalama	10.8	21.2	0.4	2.7
900-6/I	34	66	1.3	3.9
II	2	2	0.04	2.0
III	0	0	0	0
IV	16	22	0.4	2.8
V	8	11	0.2	2.8
Ortalama	12	20.2	0.4	2.3
900-9/I	20	26	0.5	2.6
II	0	0	0	0
III	0	0	0	0
IV	12	7	0.1	1.2
V	12	2	0.04	0.3
Ortalama	8.8	6.8	0.1	0.8
1100-6/I	28	52	1.0	3.7
II	6	4	0.1	1.3
III	4	7	0.1	3.5
IV	0	0	0	0
V	0	0	0	0
Ortalama	7.6	12.6	0.2	1.7
1100-9/I	48	100	2.0	4.1
II	2	1	0.02	1.0
III	4	2	0.04	1.0
IV	10	6	0.1	1.2
V	10	6	0.1	1.2
Ortalama	14.8	23	0.5	0.9
Ki-kare	3.8			



Şekil 1. 650 (panel A) ve 1100 (panel B) psi basınçlarında 6 cm mesafeden yapılan atışlarda gözlenen mavi noktalar.

Basınç olarak bulgularımız daha önce yapılmış olan bu araştırmaların sonuçlarına kısmen benzerlik göstermekle birlikte mesafe olarak oldukça farklıdır. Bu farklılığın nedenlerinden biri, araştırmalarda kullanılan dokulardaki kalınlık farkları ile açıklanabilir. Bu nedenle, olgunlaşmamış embriyolarda en uygun mesafe 12 cm, olgunlaşmışlarda ise 6-9 cm olarak bulunmuş olabilir.

4. Sonuç

Arpada partikül bombardmanı tekniği ile gen aktarılmasına ilişkin literatür incelendiğinde, rejenerasyon gücünü nedeniyle, olgun embriyoların fazla

kullanılmadığı görülmektedir. Önceki çalışmalarda, olgunlaşmamış embriyolar için 12 cm mesafenin gen aktarmada en iyi sonucu verdiğinin bildirilmesine karşın; araştırmamızda olgunlaşmış embriyolarda en uygun mesafelerin 6-9 cm olduğu belirlenmiştir. Bu durum, dokuları ince ve yumuşak olan olgunlaşmamış embriyolarda, partikülün delip geçmemesi için, atışların daha uzak mesafeden; dokuları kalın ve sert yapılı olan olgunlaşmış embriyolarda ise, partiküllerin yüzeyde kalmaması için, daha yakın mesafeden atış yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, olgun arpa embriyolarına biyolistik yöntemle 650, 900 ya da 1100 psi'lik basınç altında 6-9 cm mesafelerden başarıyla gen aktarılabilceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, 2000. FAO Production Year Book.
- Becker, D., Brettschneider, R. and Lörz, H. 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.*, 5: 299-307.
- Bommineni, V. R., Jauhar, P. P. and Peterson, T. S. 1997. Transgenic durum wheat by microprojectile bombardment of isolated scutella. *J. Heredity*, 88: 475-481.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5: 387-405.
- Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H. and Tomotsune, H. 1995. Production of fertile barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports*, 14: 329-334.
- Harwood, W. A., Ross, S. M., Cilento, P. and Snape, J. W. 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*, 111: 67-76.
- Kartha, K. K., Chibbar, R. N., Georges, F., Leung, N., Caswell, K., Kendall, E. and Qureshi, J. 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 8: 429-432.
- Lonsdale, D., Önde, S. and Cuming, A. 1990. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *J. Experimental Botany*, 41: 1161-1165.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- 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.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology*, 8: 535-542.
- Raineri, D. N., Bottino, P., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology*, 8: 33-38.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports*, 19: 118-127.
- Ritala, A., Mannonen, L., Aspegren, K., Salmenkallio-Marttila, M., Kurten, U., Hannus, R., Mendez Lozano, J., Teeri, T. H. and Kauppinen, V. 1993. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 12: 435-440.
- Ritala, A., Aspegren K., Kurten, U., Salmenkallio-Marttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T. H. and Enari, T. M. 1994. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Molecular Biology*, 24: 317-325.
- Wan, Y. and Lemaux, P. G. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*, 104: 37-48.