

## KORUNGAYA (*Onobrychis viciifolia* Scop.) PARTİKÜL BOMBARDIMANI İLE GEN AKTARIMINDA FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELERİN ETKİSİ

Melahat AVCI BİRSİN<sup>1</sup> Sertaç ÖNDE<sup>2</sup> Murat ÖZGEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>ODTÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06531 Ankara, Türkiye

Sorumlu yazarın E-posta adresi: mozgen@tr.net

### Özet

Bu çalışma partikül bombardımanı sistemi kullanılarak korunga bitkisine (*Onobrychis viciifolia* Scop) gen aktarımında uygun parametrelerin belirlenmesi amacıyla Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada, eksplant olarak kotiledonlar, mikrotaşıyıcı olarak 1.0 µm çapındaki altın parçacıkları ve belirleyici (markör) gen olarak ise “pB1221.23” plazmidinde bulunan  $\beta$ -glucuronidase (GUS) geni kullanılmıştır. Bombardıman, üç ayrı yöntemle hazırlanan altın partikülleri ile, farklı iki fırlatılma basıncı (1100 ve 1350 psi) ve 6 cm uzaklıktan Bio-Rad®/PDS-1000/He gen transformasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, korunga kotiledonlarına partikül bombardımanı ile gen aktarımında, doğrudan gliserol ile hazırlanan mikrotaşıyıcıların 1350 psi’lik basınçta fırlatılması ile en iyi sonucu verdiği saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Korunga, Partikül Bombardımanı, Gen Aktarımı, GUS

### Effect of Physical and Chemical Parameters on Transient Gene Expression via Particle Bombardment in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.)

This study was carried out at the biotechnology laboratories of Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ankara University to determine suitable transformation parameters and investigate marker gene transfer possibilities to sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) using the particle bombardment technique. Sainfoin plant cotyledons were used as plant material; 1.0 µm diameter gold particles as microprojectiles; the plasmid “pB1221.23” containing the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) as marker gene were used in this study. Microprojectiles were prepared in three different methods (directly glycerol, alcohol + water, 3 alcohol + water) Bio-Rad®/PDS-1000 /He gene transfer system was used for bombardment in 1100 and 1350 psi pressures and 6 cm distance. The statistical analysis of results revealed that microprojectiles directly prepared with glycerol and 1350 psi pressure were suitable for particle bombardment delivery marker gene transfer to sainfoin cotyledons.

**Keywords:** *Onobrychis viciifolia* Scop., Particle Bombardment, Transformation, GUS

### 1. Giriş

Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) toprağın verimliliğini artırması yanında yeşil yem, kuru yem ve arı bitkisi olarak yetiştirilen çok yıllık bir yem bitkisidir. Yurdumuzun özellikle, Orta ve Doğu Anadolu ile Geçit Bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilir. Soğuğa ve kurağa karşı oldukça dayanıklı bir bitki olan korunga diğer bitkilerin yetişmediği kıraç, kireçli, kalkerli ve sulanamayan topraklarda yoncadan daha verimlidir. Derin kök sistemi ile toprağın alt katmanlarını işleyen ve toprak derinliklerindeki besin maddelerini üst katmanlara taşıyan ve yarayışlı duruma getiren korunga, yüksek bir katyon değişim kapasitesine de sahiptir. Bu özelliği ile toprakta bulunan fosforu serbest hale

getirmesi nedeniyle fakir toprakların iyileştirilmesinde vazgeçilmez bir bitkidir. Ayrıca köklerinde bulunan azot yumrucukları ile, atmosferdeki nitrojeni toprağa fikse ederek toprağı azotça zenginleştirir (Özgen ve ark., 1998).

Korunganın bazı tarımsal karakterleri klasik ıslah yöntemleriyle iyileştirilebilirken, bitki hala birçok hastalık ve zararlının tehdidi altındadır. Klasik bitki ıslahında özellikle melez çeşitlerden yararlanılarak elde edilen ürün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmakla birlikte; hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere bitkilerin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli sınırlamalarla karşılaşmaktadır. Kısırlık ve uyumsuzluk

nedeniyle türlerarası melezlemenin yapıldığı bitki sayısının azlığı, istenen karakterlerle istenmeyen özelliklerin de birlikte geçmesi, önemli genetik karakterlerin seçiminin uzun zaman gerektirmesi gibi sorunlar bitki genetik mühendisliği çalışmaları ile çözülebilmekte ve geleneksel ıslah süreci kısaltılmaktadır (Lindsey, 1992).

Baklagil yem bitkilerinde genetik mühendisliği ile ilgili ilk çalışmalar *Lotus corniculatus* (Stougaard ve ark., 1986), *Medicago sativa* (Spano ve ark., 1987) ve *Stylosanthes humilis* (Manners ve Way, 1989) yapılmıştır. Golds ve ark. (1991) korungada *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla gen aktarımı yaptıkları çalışmada transgenik bitki elde etmede başarı sağlayamamışlardır.

Partikül bombardımanı yöntemiyle bitkilerde ilk gen aktarımı çalışmaları çeltik ve buğdayda (Wang ve ark., 1988), mısırda (Klein ve ark., 1988) ve yulafta (Somers ve ark., 1992) gerçekleştirilmiştir. Partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımında başarı; kullanılan bitkinin türüne, seçilen eksplant tipine ve eksplantın rejenerasyon yeteneği gibi biyolojik, fiziksel ve kimyasal parametrelerin birbiriyle etkileşimine bağlıdır.

Bu çalışmanın amacı; önemli bir gen aktarım tekniği olan partikül bombardımanı sistemi ile korungaya gen aktarımında uygun parametrelerin belirlenmesidir.

## 2. Materyal ve Yöntem

Türkiye’de üretimi yaygın olan korunganın Orta Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilen ekotipinin tohumlarına % 70’lik etanolde 5 dakika, sodyum hipoklorit (% 5’lik) 30 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmış, tohumlar bol steril suyla yıkanmıştır. Tohumlar, 30 g/l sukroz, 7 g/l agar içeren ve pH’sı 5.8 olan MS ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) çimlendirilmiştir. Çimlenmeden 10 gün sonra kotiledonlar kesilerek 10’arlı gruplar halinde, yaprak yüzeyi yukarı gelecek şekilde MS0 besin ortamı içeren petrilerin ortasına yerleştirilmiş ve bombardımandan önce 26 °C karanlıkta 24 saat bekletilmiştir. Toplam 18 bombardımanın yapıldığı

denemede, 1 alkol + su, 3 alkol + su ve doğrudan gliserol ile hazırlanan 1.0 µm’lik mikrotaşıyıcıların 5 µg pBI 1221.23 DNA ile kaplanması Bio-Rad Biolistic® PDS 1000/He gen aktarma sisteminin protokolünden yararlanılmıştır (Lonsdale ve ark, 1990). Atışlar 25" Hg basınç altında altılı gruplar şeklinde yapılmıştır.

Etanolde steril edilen metal disklerin üzerine makroprojektiler yerleştirilerek mikroprojektileri taşımaya hazır hale getirilmiştir. Mikroprojektil/DNA süspansiyonu sürekli karıştırılarak mikro pipet yardımıyla 6 µl alınarak her bir makroprojektilin ortasına eşit olarak dağıtılmıştır. Petri kabına alınan makroprojektiler birkaç dakika vakum altında tutularak hızlı kurumaları sağlanmıştır. Öte yandan cihazın içi % 70’lik etanol ile temizlenerek ve fırlatma atışları 1100 ve 1350 psi basınç ve 6 cm. uzaklıktan 3 tekrarlamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bombardımana tabi tutulan kotiledonlar 26 °C’de inkübatörde 48 saat karanlıkta bekletildikten sonra gen geçişinin belirlenmesi için Lonsdale ve ark (1990)’dan yararlanarak hazırlanan X-Gluc (5-bromo 4chloro 3-indolyl β-D-glukuronik asit) solüsyonuna alınmıştır. Tüplere konulan kotiledonlar X-Gluc solüsyonunda 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüplerdeki X-Gluc solüsyonu mikropipet yardımıyla alınarak, kotiledonlar steril suyla yıkamış ve %100’lük etanolde depolanmıştır.

Kotiledonlar mikroskop altında incelenerek GUS aktivasyonunu belirlemek için mavi nokta sayıları kaydedilmiştir. Üç ayrı yöntemle hazırlanan mikro taşıyıcılar ve farklı atış basınçları arasındaki farklılıkları belirlemek için varyans analizinden yararlanılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1987).

## 3. Bulgular ve Tartışma

Bombardımandan 48 saat sonra X-Gluc solüsyonunda 24 saat 37 °C’de inkübatörde bekletilen korunga kotiledonları alkolde depolanıp, mikroskop altında incelendiğinde tüm yapraklarda geçici gen ifadesini gösteren mavi noktalar gözlenmiştir (Şekil 1). Petri başına ortalama

mavi nokta sayısı (804) 1350 psi basınçta, 1100 psi'den daha yüksek bulunmuştur. Ingram ve ark. (1999)'da buğdayda, hedef doku olarak microsporları kullandıkları çalışmada en yüksek GUS aktivitesinin 1350 psi basınçta ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Rasco-Gaunt ve ark. (1999) yüksek atış basıncının hedef dokuda partikül geçişi ve dağılımının derinliğini önemli ölçüde etkilediğini bildirmişlerdir. Buna karşın Romano ve ark. (2001), gen geçişlerinde minimum atış basıncının daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Üç farklı yöntemle hazırlanan mikrotarıyıcıların korunga kotiledonlarında oluşturduğu mavi nokta sayısına ilişkin ortalama değerler Çizelge 1'de verilmiştir. Üç farklı yöntemle hazırlanan mikrotarıyıcıların petri ve kotiledon başına oluşturduğu ortalama mavi nokta sayısı her iki atış basıncında da farklı bulunmuştur. Her iki atış basıncı ortalaması alındığında petri başına ortalama en yüksek mavi nokta sayısı (765) direkt gliserolde hazırlanan mikro taşıyıcılardan elde edilmiştir.

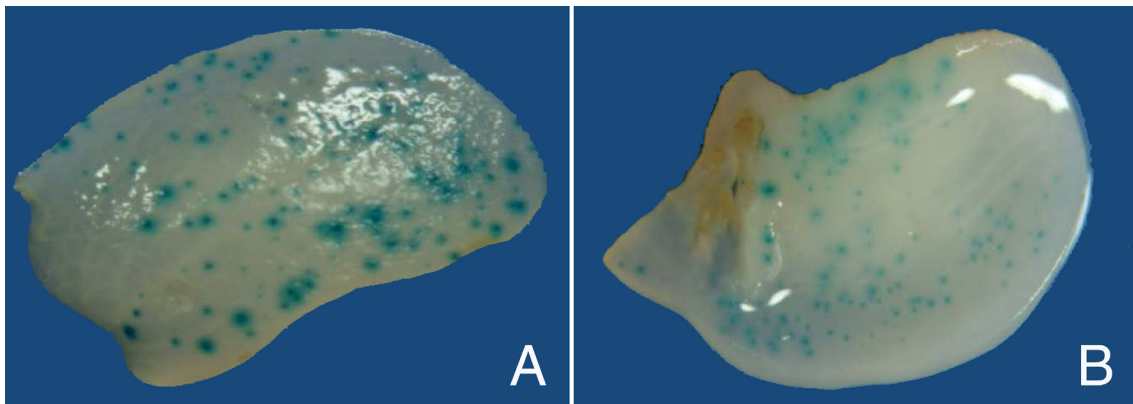
Direkt gliserolde hazırlanan mikrotarıyıcılar 1100 ve 1350 psi basınçta; sırasıyla petri başına ortalama 529.7 ve 1000.7 mavi nokta oluşturmuştur. Kotiledon başına mavi nokta sayısı da 1350 psi basınçta; direkt gliserolde 30-400, 1 alkol + su'da 4-200, 3 alkol + su'da 19-221 arasında değişmiştir.

Partikül bombardımanı ile bitki dokularına kalıcı gen aktarımını amaçlayan çalışmalarda optimizasyonların yapılması zorunludur (Schopke ve ark., 1997). Tadesse ve ark. (2003) farklı doku ve genotipler için farklı bombardıman koşullarının gerektiğini bildirmişlerdir. Mikro taşıyıcı çapının GUS geni geçişini etkilediğini; 1.0 µm'lik altın partiküllerinin korungada (Önde ve ark., 2001) ve orkidede (Tee ve Maziah, 2005) 1.6 µm'lik altın partiküllerinden daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Buna karşın Folling ve Olesen (2002) buğdayda yaptıkları çalışmada mikrotarıyıcı çapının gen geçişine önemli bir etkisinin olmadığını, büyük partikül çapının buğday mikrosporlarında daha fazla zarar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 1. Farklı hazırlanan mikrotarıyıcıların koliledonlarda oluşturduğu mavi nokta sayısına ilişkin ortalamalar\*

Basınç/Uzaklık (psi/cm)	Gliserol	1 Alkol + Su	3 Alkol + Su
1100/6	529.7 b ± 32.7 (89.1±14.9)	451.7 b ± 29.4 (71.3±8.39)	485.0 b ± 11.6 (80.8±11.6)
1350/6	1000.7 a ± 160.5 (158.0±24.1)	855.7 a ± 36.6 (111.6±19.2)	555.7 b ± 9.83 (101.1±12.6)

\* petri başına ortalama ve standart hata, parantez içindeki değerler ise kotiledon başına ortalama ve standart hata.



Şekil 1. Korungada direkt gliserolde hazırlanan mikrotarıyıcıların 1350 psi (A) ve 1100 psi (B) basınçta oluşturduğu mavi noktalar (GUS aktivasyonu).

#### 4. Sonuç

Bu araştırma, mikrotayıyıcıların farklı yöntemle hazırlanması ile ilgili ilk çalışmadır. Üç farklı yöntemle hazırlanan mikro taşıyıcı ve iki farklı atış basıncını kullandığımız araştırmada; en yüksek geçici gen transferinin 1350 psi basınçta ve direkt gliserol ile hazırlanan mikro taşıyıcılardan elde edilmiştir. Bu sonuçta plasmid

DNA'nın korunga kotiledonlarına geçebildiğini ve kotiledonların korungaya gen aktarımında eksplant olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Korunga kotiledonları için rejenerasyon protokolünün varlığı (Özcan ve ark., 1996) ve partikül bombardımanı tekniğini içeren gelecekteki uygulamalar ile transgenik korunga bitkilerinin elde edilmesinin olanaklı olacağını göstermektedir.

#### Kaynaklar

- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metodları. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yay. 1021, Ankara.
- Folling, L. and Olesen, A. 2002. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived calluse and microspores by particle bombardment. P. Cell Rep., 20: 1098–1105.
- Golds, T. J., Lee, J. Y., Husnain, T., Ghose, T. K. and Daver, M. R. 1991. *Agrobacterium rhizogenesis* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. J. Exp. Bot., 42: 1147–1157.
- Ingram, H. M., Power, J. B., Lowe, K. C. and Davey, M. R. 1999. Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryos in wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56: 207-210.
- Klein, T. M., Fromm, M. E., Wessinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sleeten, M. and Sanford, J. C. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells using high velocity microprojectiles. PNAS, 85: 4305–4309.
- Lindsey, K. 1992. Genetic manipulations of crop plants. J. Biotech., 26: 1–28.
- Lonsdale, D., Önde, S. and Cuming, A. 1990. Transit expression of exogenous DNA in intact viable wheat embryos following particle bombardment. J. Exp. Bot., 14: 1161–1165.
- Manners, J. M. and Way, H. 1989. Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenesis* and a *Ti* plasmid binary vector system. P. Cell Rep., 8: 39–51.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473–497.
- Önde, S., Sancak, C., Altınok, S., Birsin, M. and Özgen, M. 2001. Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cotyledons via microprojectile bombardment. Tr. J. Biol., 25: 171-176
- Özcan, S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996. Adventitious shoot regeneration in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Tr. J. of Bot., 20: 497-501.
- Özgen, M., Özcan, S., Sevimay, C. S., Sancak, C. and Yıldız, M. 1998. High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 52: 205-208.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P.A. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. P. Cell Rep., 19: 118–127.
- Romano, A., Raemarkers, K., Visser, R. and Mooibroek, H. 2001. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. P. Cell Rep., 20: 198–204.
- Schopke, C., Taylor, N. J., Carcamo, R., Beachy, R. N. and Fauquet, C. 1997. Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. P. Cell Rep., 16: 526-530.
- Somers, D. A., Rines, H. V., Gu, W., Kaeppler, H. F. and Bushnell, W. R. 1992. Fertile transgenic oat plants. Bio-Technology, 10: 1598–1594.
- Spano, L., Mariotte, D., Pezzotti, M., Damiana, F. and Arcioni, S. 1987. Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Theor. App. Genet., 73: 523–530.
- Stougaard, J., Marcker, K. A., Otten, L. and Schell, J. 1986. Nodule specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus* plant. Nature, 321: 669–674.
- Tadesse, Y., Sagi, L., Swennen, R. and Jacobs, M. 2003. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. Pl. Cell Tiss. Org. Culture, 75: 1-18.
- Tee, C. S. and Maziah, M. 2005. Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium sonia* 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system. Plant Cell Tissue Organ Culture, 80: 77–89.
- Wang, Y. C., Klein, T. M., Fromm, M., Cao, J., Sanford, J. C. and Wu, R. 1988. Transformation of rice, wheat and soybean by the particle bombardment method. Plant. Mol. Bio., 11: 433-439.