

HERBİSİT DİRENÇLİ TRANSGENİK TÜTÜN BİTKİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Hüseyin Avni ÖKTEM Yalım SOYER Fahriye SETENCİ Meral YÜCEL

**Biyolojik Bilimler Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi,
06531 Ankara - TURKEY**

ÖZ: Bu çalışmada aktif maddesi glufosinat amonyum olan herbisitlere dirençli transgenik tütün bitkilerinin geliştirilmesi amacı ile yapılan araştırmaların ilk sonuçları sunulmaktadır. İzlenen strateji, herbisitinin aktif maddesi olan glufosinat amonyum'un detoksifikasyonunu olası kılan bir enzim olan fosfonitrisin asetil transferaz'ın (PAT) sentezinden sorumlu BAR geninin tütün bitkilerine transferi şeklindedir. Gen transferi *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşları kullanılarak, "binary" vektör stratejisi ile gerçekleştirilmiştir. Gen transferi sonrası, kontrol bitkiler için letal olan 4 mg/litre derişimde glufosinat amonyum varlığında yaprak disklerinde kallus ve gövde oluşumu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Tütün, herbisit direnci, glufosinat amonyum, PPT, BAR, *Agrobacterium*

DEVELOPMENT OF HERBICIDE RESISTANT TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

ABSTRACT: This work describes the preliminary results of our research towards development of transgenic tobacco plants resistant against herbicides with glufosinate ammonium as the active ingredient. The strategy was to transfer BAR gene to tobacco plants, which codes for phosphinotricin acetyl transferase (PAT), an enzyme enabling the detoxification of the herbicide's active ingredient glufosinate ammonium. Gen transfer was performed by using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strains according to binary vector strategy. After gene transfer, callus and shoot generation was observed in the presence of 4 mg/liter concentration of glufosinate ammonium, which was lethal to control plants.

Keywords: Tobacco, herbicide resistance, glufosinate ammonium, PPT, BAR, *Agrobacterium*

GİRİŞ

Günümüzde gen mühendisliği ve moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanması ile bitkilere gen transferine yönelik araştırmalar oldukça yaygınlaşmıştır. Bu araştırmalar kapsamında kültür bitkilerine aktarılan yeni genler sayesinde herbisit direnci kazandırılması yönünde yapılan araştırmalara da sıkça rastlanmaktadır (Botterman ve Leemans 1988, Mazur ve Falco 1989, Holt 1993).

Bu yönde yapılan çalışmalarda başlıca üç değişik strateji izlenmektedir. Bunlardan ilki, herbisitinin aktif maddesinin etkilediği hedef proteinin modifikasyonudur. Bu amaçla hedef proteinin sentezinden sorumlu gen modifiye edilmekte ve bitkilere normal hücrel işlevini görebilen fakat herbisitinin aktif maddesine duyarsız yeni bir molekül sentezlettirilmektedir. İkinci stratejide bitkilerdeki hedef molekül bazı genetik manipülasyonlar sonucu daha fazla üretilmekte, böylece herbisit aktif maddesinin varlığında bile hedef molekülün sorumlu olduğu hücrel fonksiyonlar yerine getirilebilmektedir. Üçüncü ve son stratejide ise, bitkiye herbisitinin aktif maddesini detoksifiye eden yeni bir enzim sentezlettirilmektedir. Bu amaçla detoksifikasyon yapan enzimin sentezinden sorumlu gen bitkilere aktarılmakta, bu sayede de herbisitinin aktif maddesi hedef molekülü etkileyemeyen bir bileşiğe çevrilmekte dolayısıyla hedef molekül de herbisitinin varlığında dahi normal hücrel işlevini yürütebilmektedir.

Yukarıda bahsi geçen stratejiler uygulanarak değişik etki mekanizmaları ve aktif madde içeren herbisitlere dirençli transgenik bitkiler elde edilmiş (Haughn ve ark., 1988; De Block ve ark., 1989; Fromm ve ark., 1990; Brandle ve Miki 1993; Smeda ve ark., 1993; Chamberline ve ark., 1994; Downs ve ark., 1994) ve yapılan tarla denemelerinden de olumlu sonuçlar alınmıştır (Greef ve ark., 1989; Beck ve Ulrich 1993; Hoyle 1993).

Laboratuvarlarımızda, yukarıda belirtilen üçüncü strateji izlenerek aktif maddesi glufosinat amonyum olan (®BASTA , Hoechst) herbisitlere dirençli transgenik tütün bitkilerinin eldesi yönünde araştırmalar yürütölmektedir. Total bir herbisit olan ®BASTA aktif madde olarak fosfotricin (PPT) molekülünün kimyasal olarak sentezlenmiş amonyum tuzunu içermektedir (Glufosinat amonyum). Bu bileşik bitkilerde amonyum asimilasyonundan sorumlu anahtar enzim olan glutamin sentetaz (EC: 6.3.1.1) (Li 1993) enzimini inhibe etmektedir. Enzim aktivitesi durduğunda bitki hücrelerinde amonyum birikimi olmakta bu da sonuçta bitki hücresi üstünde ölümcül bir etki yaratmaktadır.

Fosfotricinin asetil transferaz (PAT) enzimi PPT'yi asetilasyon yolu ile detoksifiye edebilen bir enzimdir. Bu enzim BAR geni tarafından sentezlenmektedir ve bu gen ilk olarak 1987 senesinde *Streptomyces hygroscopicus* bakterilerden izole edilmiştir. (Thompson ve ark., 1987). PAT enzimi PPT'yi asetil-PPT şekline çevirmektedir ve molekül bu hali ile glutamin sentetaz enzimi üzerinde etkisizdir. Başka bir deyişle, PAT enzimi PPT'yi detoksifiye etmekte bu sayede de bu enzimi sentezleyebilen bir bitki herbisitinin varlığında dahi canlılığını sürdürebilmektedir.

Sunulan çalışmanın amacı, BAR geninin tütün bitkilerine *Agrobacterium tumefaciens* yolu ile aktarılması ve herbisit direnci gösteren bitkilerin eldesidir.

MATERYAL VE METOT

Deneyleerde bitki materyali olarak *Nicotiana tabacum* Samsun çeşidi kullanılmıştır. Gen transferi çalışmaları pDHB321.1 binary vektörünü taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşları ile yürütülmüştür. Bu suş makalenin bundan sonraki bölümlerinde LBA:pDHB olarak ifade edilecektir. pDHB321.1 vektörü, T-DNA bölgesinde 35S promotör ve nos terminatörü kontrolunda BAR genini içeren bir transformasyon vektörüdür. Vektör, Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA-Centre de Versailles, Fransa'dan Dr. David Bouchez'den elde edilmiştir.

pDHB321.1 vektörü *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşların "triparental mating" yöntemi ile mobilize edilmiştir (van Haute ve arkadaşları 1983). Gen transferi yaprak diski transformasyonu yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Horch , 1985). Deneyleerde kullanılan tüm ortam ve malzemeler otoklavlanarak steril edilmiştir. Ortamlarda kullanılan antibiyotik ve glufosinat amonyum 0.2 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra otoklavlanmış ortamlara eklenmiştir. Tüm deneysel metotların detayları daha önce verilmiştir. (Öktem ve Yücel 1993; Öktem ve ark., 1994).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızın ilk bölümünde, kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak parçacıklarının (disklerin) deneyleerde kullanılan ortamlardaki rejenerasyon kapasitelerinin tayinine yönelik araştırmalar yapılmıştır. Deneyleerde besiyeri olarak değişik derişimlerde bitki hormonları , antibiyotik ve herbisit aktif maddesi olan glufosinat amonyum içeren Muashige-Skoog (1962) ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlardan MSA, 1mg/litre BA ve 0.1mg/litre NAA içermektedir. Normal büyüme koşullarında (25±2°C, 16 saat ışık) kontrol bitkilerden hazırlanan steril diskler bu ortamlarda kallus ve gövde oluşumunu gerçekleştirebilmektedirler (Şekil 1).

Deneyleerimizde gen aktarımı sonrası herbisit direnci kazanan bitkilerin seçimi amacıyla MSB ortamları kullanılmıştır. MSB ortamları MSA ortamına ek olarak lethal dozda glufosinat amonyum ve *Agrobacterium* hücrelerinin eleminasyonu için 400mg/litre derişimde karbenisilin antibiyotiği içermektedir. Şekil 2, kontrol bitkilerden hazırlanan yaprak disklerinin glufosinat amonyum varlığındaki gelişimlerini göstermektedir. Görüldüğü gibi ortamda bulunan herbisit aktif maddesi kullanılan derişimlerde diskler üzerinde letal etki göstermektedir.

Şekil 1. Kontrol yaprak disklerinin MSA ortamındaki gelişimi.
Figure 1. Development of control leaf disks in MSA media.

Yaklaşık 3 aylık tütün bitkilerinden alınan yapraklar %1'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde yüzeysel sterilizasyona tabii tutulmuştur. Steril yapraklardan hazırlanan parçacıklar (diskler) MSA ortamına alınmış ve 25±2°C, 16 saat işık koşullarında gelişimleri gözlenmiştir. Diskler her 15 günde bir taze olarak hazırlanmış MSA ortamlarına aktarılmıştır. Fotoğraf rnek bir yaprak diskinin 2 aylık gelişimini göstermektedir.

Şekil 1'in alt yazısında açıklandığı gibi hazırlanan yaprak diskleri belirtilen derişimde glufosinat amonyum (GluAm.) içeren MSA ortamlarına alınmış ve gelişimleri gözlenmiştir. Fotoğraf disklerin 15 günlük gelişimini göstermektedir.

Şekil 2. Kontrol yaprak disklerinin değişik derişimlerde glufosinat amonyum içeren MSA ortamlarındaki gelişimi

Figure 2. Development of control leaf disks in MSA medium with concentration of glufosinate amonium.

LBA:pDHB ile yapılan transformasyon deneyi sonucunda elde edilen diskler, 4mg/litre glufosinat amonyum içeren MSB ortamında callus ve gövde oluşumlarına başlayabilmektedirler (Şekil 3). Başka bir deyişle, rejenere etmekte olan bu bitkiler glufosinat amonyuma dirençli hale gelmişler ve normalde lethal olan herbisit dozunu tolere edebilmektedirler.

Sunulan çalışma, herbisit dirençli transgenik tütün bitkilerinin eldesini amaçlayan araştırmalarımızdan elde edilen ilk deneysel sonuçları göstermektedir. Şekil 1 ve 2 incelendiğinde, herbisit aktif maddesi olan glufosinat amonyumun kullanılan derişimlerde bitkilerin gelişimini durdurup lethal bir etki yarattığı açıkça gözlenmektedir. Gen transferi yapılan diskler ise lethal olan herbisit derişimlerinde gelişim gösterebilmektedirler (Şekil 3).

Şekil 3. Kontrol ve LBA:pDHB ile muamele edilmiş yaprak disklerinin MSA ve MSB ortamlarındaki gelişimi.

Figure 3. Development of control and LBA : pDHB treated leaf disks in MSA and MSB medium.

Bu deneyde aynı tütün bitkisinden hazırlanan steril yaprak diskleri kullanılmıştır. Disklerin bir bölümü direkt olarak MSA ortamlarına alınmışlardır. Diğer diskler 5 dakika süre ile *Agrobacterium tumefaciens* LBA:pDHB suşları ile muamele edildikten sonra MSA ortamına alınmışlardır. Tüm diskler 3 gün süre ile MSA ortamında tutulduktan sonra, *Agrobacterium* ile muamele edilmemiş setlerden biriyle *Agrobacterium* ile 5 dakika muamele edilmiş diskler MSB ortamlarına alınmışlardır. Bu petri resimin alt kısmında sırası ile “-” kontrol ve LBA:pDHB (5 min) olarak görülmektedir. Diğer yaprak diskleri ise MSA ortamında bırakılmışlardır (“+” kontrol). Tüm diskler her 7 günde bir taze olarak hazırlanmış ortamlara aktarılmıştır. Fotoğraf disklerin MSB ortamına alındıktan sonraki 25 günlük gelişimini göstermektedir.

Bu sonuç, gen aktarımı yapılan bitkilerde BAR geninin bitki hücrelerine aktarıldığını, genoma integre olduğunu ve fonksiyonel olarak ifade edildiğini gösteren öncül bir bulgudur. Şekil 3’ de gösterilen bitkiler halen rejenerasyonlarını devam ettirmektedirler.

Sunulan çalışmanın, kesin olarak başarıyla sonuçlandığının, başka bir deyişle herbisit dirençli transgenik tütün bitkilerinin elde edildiğinin söylenebilmesi için, rejenerasyon sonucunda elde edilen bitkilerin analiz edilmesi gerekmektedir. Yürütmeyi planladığımız analiz yöntemleri hem transgenik bitkilerden elde edilecek genomik DNA örneklerinin “Southern Blot” tekniği ile analizini hem de herbisit uygulaması sonrası bitkilerin morfolojik tepkilerinin incelenmesini içermektedir. Bu çalışmalar için gerekli teknikler optimize edilmiş ve halen çalışır durumdadır. Laboratuvarımızda LBA:pDHB suşuyla yapılan diğer denemelerden de ilk aşamada olumlu sonuçlar alınmıştır. Araştırmalarımız, BAR genini içeren farklı binary vektörler ve *Agrobacterium tumefaciens* suşları ile de devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK-TBAG1262 Nolu proje tarafından desteklenmektedir. Deneylede kullanılan pDHB321.1 plasmidini ve *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşunu sağlayan Dr.David Bouchez ve Texas Tech Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden Dr.Randy Allen’ a içtenlikle teşekkür etmekteyiz. Fotoğraf çekimlerini titizlikle gerçekleştiren, O.D.T.Ü. Fizik Bölümü Fotoğraf Laboratuvarı’ ndan Doğan Yaşar ve Hasan Yılmaz’ a teşekkür ederiz. Deneysel olarak kullanılmak amacıyla @BASTA herbisitini sağlayan AgrEvo Ltd. Şirketi’nden Sayın Ali Farsak’ a teşekkür ederiz.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Brandle, E.J., and B.L. Miki. 1993. Agronomic performance of sulfonylurea-resistant transgenic flue-cured tobacco grown under field conditions. *Crop Sci.* 33: 847-852.
- Beck, C.I., and T.H. Ulrich. 1993. Environmental release permits. *Bio/Technology* 1: 1524-1528.
- Botterman, J., and J. Leemans. 1988. Engineering herbicide resistance in plants. *TIG* 4: 219-222.
- Chamberline, D.A., R.I.S. Brettell, D.I. Last, B. Witzens, D. McErloy, R. Dolferus, and E.S. Dennis. 1994. The use of Emu promoter with antibiotics and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 95-112.

Downs, C.G., M.C. Christey, K.M. Davies, G.A. King, J.F. Seelye, B.K. Sinclair, and D.G. Stevenson. 1994. Hairy roots of *Brassica napus*: II. Glutamine synthetase overexpression alters ammonia assimilation and the response to phosphinotricin. *Plant Cell Reports* 14: 41-46.

De Block, M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gosselé, N.R. Movva, C.J. Thompson, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518.

Fromm, M.E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Tomas, and T.M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833-839.

Greef, W.D., R. Delon, M. DeBlock, J. Leemans, and J. Botterman. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Bio/Technology* 7: 61-64.

Haughn, G.W., J. Smith, B. Mazur, and C. Somerville. 1988. Transformation with a mutant acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Mol. Gen. Genet* 211: 266-271.

Holt, J.S. 1993. Mechanism and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 203-229.

Horch, R.B. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Hoyle R. 1993. Herbicide resistant crops are no conspiracy. *Bio/Technology* 11: 783-784.

Li, M-G., R. Villemur, P.J. Hussey, C.D. Silflow, J.S. Gantt, and D.S. Snustad. 1993. Differential expression of glutamine synthase genes in *Zea mays*. *Plant Mol.Biol.* 23: 401-407.

Mazur, B.J., and C. Falco. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 441-470.

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

Öktem, H.A., ve M. Yücel. 1993. Tütün bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla gen transferi. *Anadolu* 3: 1-10.

Öktem, H.A., F. Özkan, V.C. Özalp ve M. Yücel. 1994. *Agrobacterium* mediated gene transfer in tobacco. Doğa Botanik Dergisi 18: 397-405.

Smeda, R.J., P.M. Hasegawa, P.B. Goldsbrough, N.K. Singh, and S.C. Weller. 1993. A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. Plant Physiol. 103: 911-917.

Thompson, C.J., M. De Block, J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gosselé, N.R. Movva, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. Characterization of the herbicide resistant gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. EMBO J. 6: 2519-2523.

Van Haute, E., H. Joss, M. Maes, G. Warren, M. Van Montagu, and J. Schell. 1983. Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for reverse genetics of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 2: 411-417.