



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE MISIR**

**(*Zea mays* L.) BİTKİSİNE GEN AKTARIMI**

**Deniz KÖM**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Botanik Programı**

**Danışman**

**Yard. Doç. Dr. Serap SAĞLAM ÇAĞ**

**II. Danışman**

**Doç. Dr. Selma ONARICI**

**Ocak, 2013**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 14.02.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Yard.Doç.Dr. Serap Sağlam-Çağ (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül Cevahir-Öz  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Muammer Ünal  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Orhan Küçükler  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Şener Akıncı  
Marmara Üniversitesi  
Fen – Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin BAP 17430 ve TÜBİTAK TOVAG 109O664 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Yüksek lisans öğrenimin süresince benden desteğini esirgemeyen, tüm sıkıntılarında yardımcı olmak için elinden geleni yapan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Serap SAĞLAM-ÇAĞ' a içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Beni projesine kabul ederek tutkunu olduğum konuda çalışmama imkan sağlayan, bana bildiğim her şeyi öğreten, tez çalışmam boyunca ve tezimin yazımı konusunda yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Doç. Dr. Selma ONARICI'ya ne kadar teşekkür etsem azdır.

Çalışmalarım sırasında uzun deney saatleri boyunca yardımlarını esirgemeyen araştırmacı arkadaşlarım Ms. Yasemin YILDIZHAN'a ve Ayşe Gül ÇELENK'e, çalışmalarımın yoğun olduğu dönemlerde yardımını esirgemeyen arkadaşım Ms. Hüseyin DEMİRCİ'ye, deneylerim sırasında ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Yavuz ÖZTÜRK'e ve Dr. Oktay KÜLEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda kullandığım mısır bitkilerini bana temin eden Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü' den Yüksek Ziraat Mühendisi Rahime CENGİZ ve Dr. Mehmet Cavit SEZER'e çok teşekkür ederim.

Tüm proje süreci boyunca bana manevi destek olan arkadaşlarım Emel AKGÜN, Canan ULUSOY, Mine DORUK, Ani KİÇİK, Tülin TAŞÇIOĞLU hepimize çok teşekkür ederim.

Her alanda tercihlerime güvenip, bana sonsuz destek veren aileme minnettarlığımı sunarım.

**Ocak , 2013**

**Deniz KÖM**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ.....	Vİİ
ÖZET.....	Vİİİ
PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE MISIR ( <i>ZEА MAYS L.</i> ) BİTKİSİNE GEN AKTARIMI.....	Vİİİ
SUMMARY.....	İX
GENE TRANSFER INTO MAIZE ( <i>ZEА MAYS L.</i> ) VIA PARTICLE BOMBARDMENT METHOD.....	İX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1 MISIR BİTKİSİ.....	3
2.1.1 Genel Botanik Bilgileri.....	3
2.1.2 Mısır Tanesinin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı.....	3
2.1.3 Mısırın Türkiye’de ve Dünyadaki Önemi.....	4
2.1.4 Türkiye’de Mısır Tarımını Kısıtlayıcı Faktörler.....	8
2.2 BİYOTEKNOLOJİK BİTKİLER.....	9
2.2.1 Biyoteknoloji ve Mısır.....	12
2.3 BİTKİLERE GEN TRANSFERİ.....	15
2.3.1 Partikül Bombardımanı (Biyolistik) Yöntemi İle Mısıra Gen Aktarımı.....	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1 BİTKİ MATERYALİ.....	25
3.1.1 Bitki Materyalinin Belirlenmesi, Temini ve Hazırlanması.....	25
3.1.2 Partikül Bombardımanı İçin Olgunlaşmamış Embriyoların Çıkarılması ve Tip II Kallus Oluşumunun Başlatılması.....	28
3.2 BESİ ORTAMI VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI.....	29
3.3 GEN AKTARIMINDA KULLANILAN PLAZMİTLER.....	33

3.3.1 Plazmitlerin Tanıtılması.....	33
3.3.2 Plazmitlerin Gen Aktarımı Uygulaması İçin Eldesi .....	35
3.4 PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE GEN AKTARIMI .....	36
3.4.1 Partikül Bombardımanı Uygulaması Öncesi Altın Partiküllerinin Hazırlanması .....	36
3.4.2 Altın Partiküllerinin DNA İle Kaplanması Ve Sistemin Uygulamaya Hazır Hale Getirilmesi .....	38
3.4.3 Partikül Bombardımanı Uygulamasında Cihazın ve Kullanılacak Materyallerin Sterilizasyonu .....	38
3.4.4 Partikül Bombardımanı Uygulaması .....	40
3.4.4.1 Tip II Kalluslara Yapılan Partikül Bombardımanı Uygulama Basamakları .....	41
3.4.4.1 Olgunlaşmamış embriyolara Partikül Bombardımanı Uygulama Basamakları .....	43
3.4.5 Partikül Bombardımanı Uygulaması Sonrası Seçilim Süreci .....	44
3.4.6 Partikül Bombardımanında Seçilim Sonrası Rejenerasyon Süreci.....	44
3.5 BİTKİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) KONTROLLERİ .....	45
3.5.1 Doku Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu .....	45
3.5.2 Örneklere PZR uygulanması.....	47
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1 DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI.....	49
4.1.1. Embriyo Çıkarılması.....	49
4.1.2 Kullanılan Hatların Doku Kültürü ve Tip II Kallus Üretimini Etkileyen Faktörler .	49
4.1.2.1 Besi Ortamları .....	50
4.1.2.2 Kalluslar Arası Mesafe ve Petri Başına Örnek Sayısı .....	50
4.1.2.3 Mısır Genotipi.....	50
4.1.3 Embriyonik Kallus Oluşturma Yetenekleri .....	51
4.1.3.1 Tip II Embriyonik Kallus Oluşturma Yetenekleri .....	52
4.2 PARTİKÜL BOMBARDIMANI İLE GEN AKTARIMI ÇALIŞMALARI.....	55
4.2.1 GUS Deneyi.....	55
4.2.2 Partikül Bombardımanı Denemeleri ve Fiziksel Değişkenler .....	56
4.2.2.1 Atış mesafesi .....	56
4.2.2.2. Atış Tekrarı .....	57

4.2.2.3 Partikül Bombardımanı Sonrası Ozmotik Muamele .....	57
4.2.3 Seçilimde Kullanılan Herbisitler .....	58
4.2.4. Partikül Bombardımanı Sonrası Seçilim Süreci .....	58
4.2.4. Rejenerasyon .....	61
4.2.5. Partikül Bombardımanı Denemelerinden Sonra Elde Edilen Mısır Fidelerinin Transgenik Olup Olmadıklarını Anlayabilmek İçin Yapılan PZR Analizleri: .....	66
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>EK .....</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>83</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1- Mısır tanesinin enine kesiti.....	4
Şekil 2.2 - Dünya mısır üretiminin ülkelere göre dağılımı. ....	5
Şekil 2.3 - Dünya mısır tüketiminin ülkelere göre dağılımı .....	6
Şekil 2.4- Biyoteknolojik ekinlerin dünyadaki yayılışı .....	13
Şekil 2.5- Biyoteknolojik olarak geliştirilen bitkilerin tercih oranları.....	15
Şekil 2.6- Biyolistik sisteminin şematik gösterimi .....	20
Şekil 2.7- Partikül bombardımanı sisteminde kullanılan değişken bileşenler .....	20
Şekil 2.8- Partikül bombardımanı sisteminin çalışma prensibinin şematik gösterimi .....	21
Şekil 2.9- A-Rejenerasyon yeteneğine sahip embriyonik kallus B- Rejenerasyon yeteneğini kaybetmiş embriyonik olmayan kallus.....	23
Şekil 3.1- Kendi poleniyle tozlaştırılacak mısır hattında tepe püsküllerinden polen toplayıcı kağıt torbaların görüntüsü .....	27
Şekil 3.2- Mısır hattının tepe püsküllerinden polenlerin toplayıcı kağıt ile toplanması .....	27
Şekil 3.3- Tepe püskülünden toplanan polen ile bitkinin kendi koçanının tozlaştırılması işlemi .....	27
Şekil 3.4- Tozlaşması gerçekleşmiş mısır koçanları, gerekli olgunluğa ulaşana kadar başka bitkilerin polenleri ile enfekte olmamaları için kâğıt zarf ile kapatıldı.....	28
Şekil 3.5- Mısır tanelerinin hazırlanması .....	29
Şekil 3.6- Mısır embriyosu görüntüleri, ölçek 2mm.....	29
Şekil 3.7- pGreenII 0229 plazmit haritası .....	33
Şekil 3.8- pTF101.1 plazmit haritası.....	34
Şekil 3.9- PPT ve Bialaphos'un kimyasal formüllerini gösterir tablo.....	35
Şekil 3.10- pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitlerinin jelde görünümü. 1: 1Kb Plus ladder, 2: pGreenII 0029 plazmiti, 3: pTF101.1 plazmiti. Örneklerden 3'er µl yüklenmiştir. ....	36
Şekil 3.11- Ultrasonikatör ile altın partiküllerinin homojen olarak dağılması sağlandı .....	37
Şekil 3.12- Makro taşıyıcı filmlerin %70 alkol ile sterilizasyonu .....	39
Şekil 3.13- Makro taşıyıcıların ve makro taşıyıcı tutucuların hazırlanması .....	39
Şekil 3.14- pAHC25 plazmitinin haritası.....	41
Şekil 3.15- Uygulamaya hazır halde bir partikül bombardımanı sistemi .....	42
Şekil 3.16- pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitlerine uygulanan PZR sonucunun jel görüntüsü. pGreenII 0229 için 1: 1 Kb Plus ladder, 2: bar negatif kontrol, 3: pGreenII 0229 plazmitinin <i>bar</i> geni primerleri ile uygulanan PZR sonucu. pTF101.1 için 1: 1 Kb Plus ladder, 2: 35S negatif kontrol, 3: pTF101.1 plazmitinin 35S promotörü primerleri ile uygulanan PZR sonucu.....	47
Şekil 4.1- Kallus oluşturma ortamına alınan mısır embriyoları.....	49
Şekil 4.2- Embriyodan ilk gelişen kalluslar. ....	51
Şekil 4.3- Organogenez aşamasına geçen kallus görüntüsü. ....	52
Şekil 4.4- ADK 310 hattına ait tip II kalluslar .....	53
Şekil 4.5- ADK 455 hattına ait tip II kalluslar .....	53
Şekil 4.6- ADK 451 hattına ait kallusların büyük kısmı tip II formuna geçirilemeden kaybedilmiştir.....	54



<b>Şekil 4.7-</b> ADK 599 hattına ait tip II kalluslar .....	54
<b>Şekil 4.8-</b> ADK 737 hattına ait tip II kalluslar .....	55
<b>Şekil 4.9-</b> pAHC25 plazmiti ile partikül bombardımandan sonra X-Gluc çözeltisinde GUS histokimyasal reaksiyonu gösteren kalluslar .....	56
<b>Şekil 4.10-</b> ADK 310 hattına ait iki defa atış yapılan bütün kalluslar ölmüştür .....	57
<b>Şekil 4.11-</b> Partikül bombardımanı öncesi ve sonrası ozmotik muamele uygulanan kalluslar	58
<b>Şekil 4.12-</b> Partikül bombardımanından sonra hiç gelişim gösteremeyen ADK 694 hattına ait embriyolar .....	59
<b>Şekil 4.13-</b> Fosfonötrisin içeren seçici besi ortamındaki ADK 310 hattına ait kalluslar.....	59
<b>Şekil 4.14-</b> Fosfonötrisin içeren seçici besi ortamındaki ADK 455 hattına ait kalluslar.....	60
<b>Şekil 4.15-</b> ADK 455 hattının fosfonötrisin içeren besi ortamında kahverengileşip kuruyan kallusları.....	60
<b>Şekil 4.16-</b> Seçilim sürecinin sonunda canlı kalan kallusların görüntüsü.....	61
<b>Şekil 4.17-</b> Rejenerasyon I besi ortamında somatik embriyo gelişimi .....	62
<b>Şekil 4.18-</b> Rejenerasyon-II besi ortamında gelişen somatik embriyolar .....	62
<b>Şekil 4.19-</b> Somatik embriyo geliştiren kalluslar rejenerasyon III besi ortamına alındıktan sonra magenta kültür kapları hava geçiren bant ile sarılmıştır.....	63
<b>Şekil 4.20-</b> Rejenerasyon III ortamında gelişen mısır fideleri .....	64
<b>Şekil 4.21-</b> Toprağa alınmak üzere köklerindeki besi ortamı temizlenen mısır fidesi.....	65
<b>Şekil 4.22-</b> Rejenerasyon III ortamından alınan mısır fideleri toprağa aktarıldıklarında sera etkisi oluşturmak amacıyla üstleri ışık geçiren naylon torbalarla kapatılmıştır. Ortalama 10 gün sonra üzerlerindeki torbalar kaldırılmış ve fidelerin bulunduğu saksılar kademeli olarak büyütülmüştür.....	66
<b>Şekil 4.23-</b> Cornell yöntemi ile izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 1 kb Ladder, 2-23: Transgenik olduğu düşünülen mısır hatlarına ait genomik DNA'lar.....	67
<b>Şekil 4.24-</b> DNA izolasyon kiti ile izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 12 numaralı kuyucuklar 1 kb Ladder içerirken; 2-11 ve 13-23 numaralı kuyucuklar transgenik olduğu düşünülen mısır hatlarına ait genomik DNA'ları içermektedir. ....	67
<b>Şekil 4.25-</b> ADK 310 hattına ait bireylerde <i>bar</i> genine özgü primerlerle yapılan PZR analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 15: 1 Kb Plus Ladder; 2: bar pozitif kontrol, 3: bar negatif kontrol, 4-14 ve 16-25: ADK 310 hattına ait bireylerin PZR sonuçları. ....	68
<b>Şekil 4.26-</b> ADK 737 hattına ait bireylerde 35S promotörüne özgü primerlerle yapılan PZR analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 1 Kb Plus Ladder; 2: 35S pozitif kontrol; 3-20: ADK 737 hattına ait bireylerin PZR sonuçları. ....	68
Tez çalışması süresinde kullanılan markır ladderler. Her iki markır ladder da invitrogen markadır. ....	82

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1- Mısır tanesinin kimyasal bileşimi (Özcan, 2009). .....	4
Tablo 2.2- 2002 ile 2008 yılları arasında dünya piyasasında mısır ortalama fiyatları (\$/ton) (TMO, 2011a).....	6
Tablo 2.3- 2001 ile 2010 yılları arasında Türkiye’de mısır ekim alanı, üretim ve verimlilik bilgisini gösteren çizelge (TMO, 2011a).....	7
Tablo 2.4- Ticari olarak ekimine izin verilen transgenik varyetelerden bazıları (Birch, 1997)10	
Tablo 2.5- GD bitkilerin küresel ekim alanları (ISAAA, 2012a).....	11
Tablo 2.7- Mısır kalluslarına partikül bombardımanında ozmotik muamelenin başarıya etkisini gösteren tablo (Vain ve diğ., 1993). .....	24
Tablo 3.1- Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri. ....	31
Tablo 3.2- Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri. ....	32
Tablo 3.3- PZR karışımı. ....	48
Tablo 3.4- PZR döngüleri.....	48
Tablo 5.1- Partikül bombardımanı denemelerinde kullanılan tip II kallusların rejenerasyon yüzdesi.....	72

## ÖZET

### **PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE MISIR (*ZEA MAYS L.*) BİTKİSİNE GEN AKTARIMI**

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye’de üretilen yerli mısır (*Zea mays L.*) ırklarına partikül bombardımanı (biyolistik) yöntemi ile gen aktarımı (transformasyon) ve doku kültüründe rejenerasyon şartlarının optimize edilmesidir.

Doku kültürü şartlarının optimizasyonu bitkilerde gen aktarımının başarısı için gereklidir. Monokotil bir bitki olan mısırın doku kültürünün ve fertil rejenerant bitkileri elde etmenin zor olduğu bilinmektedir. Doku kültürü çalışmalarında Chu N6 ve MS besi ortamları kullanılmıştır. Uygulamada duyulan ihtiyaca göre kullanılan besi ortamlarının optimizasyonu yapılmıştır.

Bu çalışma kapsamında en uygun kültüvarı tespit etmek için Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü (STAE) tarafından geliştirilen ve ikinci ürün potansiyeli yüksek olan ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694, ADK 737 yerel mısır hatları kullanılmıştır. ADK 737 bu çalışmalar için en uygun hat olarak belirlenmiştir.

Partikül bombardımanı ile gen aktarımı, mısır bitkisinin transformasyonu çalışmalarında kullanılan en etkili yöntemlerden birisidir. En iyi metodu bulabilmek için partikül bombardımanında atış tekrarı (bir defa ve iki defa), atış mesafesi (6 cm ve 9 cm), helyum gazı basıncı (650 psi ve 1100 psi) ve ozmotik muamele süresi (1 saat, 4 saat ve 20 saat) parametreleri denenmiştir ve optimum parametreler tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan gen kasetleri Doç. Dr. Selma Onarıcı’nın yürütücülüğündeki TOVAG 1090664 numaralı TÜBİTAK projesinden temin edilmiştir. Plazmitler, seçimde kullanılan bar selektif genini içermektedir. Gen aktarımı ve rejenerasyon çalışmaları sonrasında elde edilen bitkilerden yapılan PZR analizleri ile geni alan bitkiler tespit edilmiştir.

## **SUMMARY**

### **GENE TRANSFER INTO MAIZE (*ZEA MAYS L.*) VIA PARTICLE BOMBARDMENT METHOD**

The main objective of this study was to optimize the conditions for the tissue culture and gene transfer into Turkish local maize (*Zea mays L.*) cultivars via particle bombardment.

Optimization of the tissue culture conditions is necessary for the successful plant transformation. It is known that (commonly accepted that) tissue culturing and regenerating fertile plantlets are difficult in maize since it is a monocot plant. Murashige and Skoog (MS) and Chu (N6) tissue culture mediums were used in this study. All mediums were arranged for the optimum plant growth (and plant morphogenesis).

Several maize cultivars were tested to determine the best local maize lines for the alternate crop in the field, and ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694 and ADK 737 lines were selected. These lines were developed by Sakarya Agricultural Research Institute (STAE). ADK 737 was determined the most suitable line for transformation studies.

Gene transfer via particle bombardment is one of the most efficient methods for maize transformation. In order to optimize particle bombardment method, some parameters were tested such as once and twice shooting repetition, 6 cm and 9 cm shooting distance, 650 psi and 1100 psi pressure for helium gas, and 1, 4 and 20 hours osmotic treatment. Optimum parameters for maize transformation via particle bombardment were described.

Gene cassettes used in this study were provided from the TUBITAK , grant number TOVAG-1090664 that is directed by Assoc. Prof. Dr. Selma ONARICI. Plasmids with bar selective gene were used. Transformant plants produced from transformation and regeneration were detected with PCR analysis.

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu avcı-toplayıcı yaşamdan yerleşik düzene geçtiği yani tarım devrimini başlattığı gündən beri doğaya müdahale etmektedir. Bu müdahalenin temelinde başlıca gıda ve diğer amaçlar için ihtiyaç duyulan bitkilerin üretilmesi ve istenilen özellikler doğrultusunda ıslahlarının yapılması yer almaktadır.

Günümüzde insanlar hayatta kalabilmek için bitkilere ihtiyaç duymaktadır. Bitkilerin doğrudan ya da dolaylı yollarla besin kaynağı olarak kullanılması, duyulan ihtiyacın başlıca sebebidir.

Dünya üzerindeki nüfusun hızlı artışı ve kullanılabilir tarım alanlarının gün geçtikçe azalışı nedeniyle bitkilerin yeterlilik oranı giderek düşmektedir. Malthus'un 1798 yılında belirttiği, insanların yeterli gıda maddesi bulamayarak büyük bir fekaletle uğrayacakları öngörüsü (Malthus, 1798) tarımsal tekniklerin gelişmesi ve üretimdeki hızlı artış nedeniyle henüz gerçekleşmemiştir (Çetiner, 2010).

Buğdaygiller (Poaceae) familyasının bir üyesi olan mısır (*Zea mays* L.), günümüzde tüm dünyanın vazgeçilmez bitkilerindendir ve önemi her geçen gün artmaktadır. Mısırın çok sayıda kullanım alanı vardır ve bitkinin her parçası ayrı ekonomik değere sahiptir. Tahmini olarak dünya mısır üretiminin %60'ı hayvan yemi, %20'si insan gıdası, %10'u işlenmiş gıda ve %10'u diğer tüketimler ile tohumluk olarak kullanılmaktadır (Özcan, 2009). Türkiye'de giderek artan mısır ihtiyacıyla doğru orantılı olarak üretim miktarı da artmaktadır. 2000 yılında toplam mısır üretimi 2.3 milyon ton iken, 2010 yılında bu rakamın 4.2 milyon tona ulaştığı görülmektedir (TMO, 2011a).

2012/13 döneminde dünya mısır üretiminin öngörülen miktarı 833 milyon ton olarak hesaplanmıştır ve geçmiş yıla göre %4.8 oranında gerilemiştir. 170 milyon hektar olarak hesaplanan toplam küresel ekim alanı tüm zamanların en yüksek seviyesi olarak belirtilirken, ortalama verimliliğin hektar başına 5.2 tondan, 4.9 tona gerileyeceği hesaplanmıştır (TMO, 2012).

Bugüne kadar yapılan ıslah çalışmalarında öncelikli olarak ürün kalitesi ve verimliliği arttırılmaya çalışılmış, hastalıklara ve üretimi kısıtlayan dış faktörlere karşı direnç geliştirme çalışmaları ikinci planda kalmıştır. Tarımsal verimliliği düşüren en önemli faktörler olan hastalıklar ve zararlılar nedeniyle ortaya çıkabilecek kayıpları engellemek için çok yüksek maliyetli kimyasal ilaçlar kullanılmıştır. Ancak kullanılan kimyasal maddelerin kalıntıları toprakta ve üründe parçalanmadan kalabildiğinden, bunları tüketen insan ve hayvanların sağlığını önemli oranda tehlikeye atmakla birlikte toprak yüzeyinin ve su kaynaklarının kimyasal olarak kirlenmesine de neden olmaktadır. Ekonomik önemi nedeniyle, mısır

bitkisinin kalitesini ve verimliliğini yükseltmeye, hastalıklara ve stres koşullarına karşı dirençliliğini arttırmaya yönelik genetik ıslah çalışmaları dünya genelinde sürdürülmektedir. Klasik ıslah çalışmalarıyla kıyaslandığında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması sayesinde istenilen özellikler bitkilere daha kısa bir sürede aktarılabilen ve ekonomik giderler azalmaktadır.

Dünyada 1970'li yıllarda başlayan rekombinant DNA teknolojisi ile Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) oluşturmaya yönelik çalışmalara karşın, Türkiye'de bu konuda yapılmakta olan çalışmalar henüz çok yenidir. Ülkemizdeki yasal düzenlemeler nedeniyle GD bitki çeşitlerinin üretimi yasaktır. Türkiye şu anda transgenik bitki geliştiren değil, bu çeşitleri kullanma potansiyeli olan bir ülke konumundadır. Ancak, Türkiye'nin dünyada gelişen yeni teknolojileri takip etmesi, daha da önemlisi, doğrudan kendi tarımsal sorunlarına yönelik yeni teknolojiler geliştirmesi son derece önemlidir. Bu teknolojilerin geliştirilmesi ile gelecekte oluşabilecek gelişmeler karşısında yabancı ülkelere bağımlı kalmadan kendi ürününü üretebilen bir ülke olmak hedeflenen ilkedir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1 MISIR BİTKİSİ

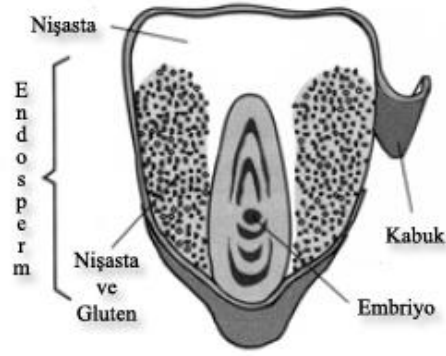
#### 2.1.1 Genel Botanik Bilgileri

Buğdaygiller (Poaceae) ailesinin bir bireyi olan mısır (*Zea mays* L.) tek yıllık, otsu ve monokotil bir bitkidir. Genellikle 1.8 ya da 2 metre uzunlukta olmakla birlikte 4 metreye erişebilen uzunluklarda olan mısır bitkisinin sap kalınlığı 2-6 cm çapında olabilmektedir. Kökü kalın ve saçaklıdır. Yaprakları paralel damarlanma gösterir ve 90 cm'ye kadar ulaşabilir hatta daha da uzayabilir. Tepe püskülü adı verilen, salkım başak şeklindeki erkek çiçek bitkinin tepesinde yer alır ve tam erişkinliğe ulaştığında yaklaşık olarak 20x30 cm boyutlarında olur. Koçanların oluştuğu dişi çiçekler ise yaprak nodlarının bulunduğu bölgeden çıkar ve stilusları, koçanı saran yapraklardan dışarı çıkık durumdadır. Dişi çiçek durumunun boyutu ortalama 20 cm; stilusları ise 4 cm gibi bir uzunluk değeriyle çok uzun kabul edilir. Türkiye'de ağırlıklı olarak A2, A6, A7, A8, A10, B7, B10, C7, C10 grid karelerinde yer alan İstanbul, Iğdır, Kars, Hakkâri, Adıyaman, Artvin, Bursa, Diyarbakır, Giresun, Ordu, Rize, Trabzon illerinde çeşitli kültürlerin ekimleri yapılmaktadır. Bitkinin yetiştirilebildiği yükseklik aralığı deniz seviyesinden 1830 metreye kadardır (Van Herbariyumu).

#### 2.1.2 Mısır Tanesinin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Mısır tanesinin fiziksel yapısı Şekil 2.1'deki enine kesitte gösterilmiştir. Tane dıştan içe kabuk (testa), endosperm, embriyo olarak gösterilmiştir. Tane ağırlığının %6'sı kabuk, %11.5'i embriyo, %82.5'i ise endospermdir.

Endosperm, proteinin yanı sıra çimlenen tohumun enerji kaynağı olarak nişasta içermektedir. Endospermin beyaz gösterilen kısmı unlu bir yapıda olup genellikle yumuşak nişasta ihtiva eder. Koyu renkte ve noktalı gösterilen kısım ise boynuz yapısındaki endospermdir. Protein ve nişasta ihtiva eder, bu kısım sanayide çok önemlidir.



Şekil 2.1- Mısır tanesinin enine kesiti (CRA, 2009)

Mısır tanesinde ortalama %16 su bulunmaktadır. Kuru madde ortalama %71.7 nişasta, %9.5 protein, %9.5 lif ve önemli miktarlarda şeker, yağ ve karoten içermektedir. Tablo 2.1’de mısır tanesinin kimyasal özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1- Mısır tanesinin kimyasal bileşimi (Özcan, 2009).

Özellikler (Kuru bazlı)	Miktarı/Değişimi (%)	Ortalama miktarı(%)
Su (tanede)	7-23	16
Nişasta	61-78	71.7
Protein	6-12	9.5
Yağ	3.1-5.7	4.3
Kül	1.1-3.9	1.4
Pentozanlar (ksiloz)	5.8-6.6	6.2
Selüloz+Lignin	3.3-4.3	3.3
Şekerler (glikoz)	1-3	2.6
Toplam Karotenler (mg/kg)	12-36	26

### 2.1.3 Mısırın Türkiye’de ve Dünyadaki Önemi

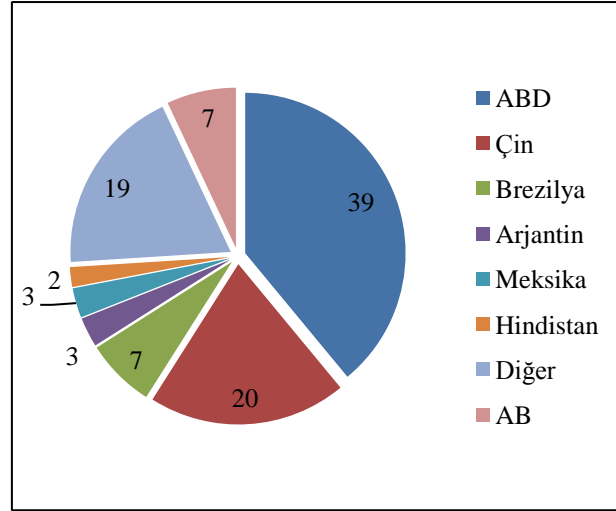
Dünyada en fazla üretilen (2009 yılı itibariyle 785 milyon ton/yıl) tahıl bitkisi mısırdır. Yıllara göre değişmekle birlikte Türkiye’de yıllık ortalama 550 bin hektar alanda 3.5 milyon ton mısır üretimi yapılmaktadır. Dünyada ve Türkiye’de insan beslenmesinde buğday ve çeltik ile birlikte en önemli 3 bitkisel kaynağı meydana getirmektedir. Birim alanda en yüksek enerji stoğuna sahip olan mısır bitkisinin verimliliğini arttırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Yaklaşık 120 günlük bir sürede 3-4 metre yüksekliğe ulaşan ve tek bir



bitkiden ortalama 600-1000 civarı tohum oluşturan mısır bitkisi, yüksek tane verimliliği ve oldukça büyük biyo-kütlesi sayesinde insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra biyo-yakıt olarak da değerlendirilmektedir (Özcan, 2009).

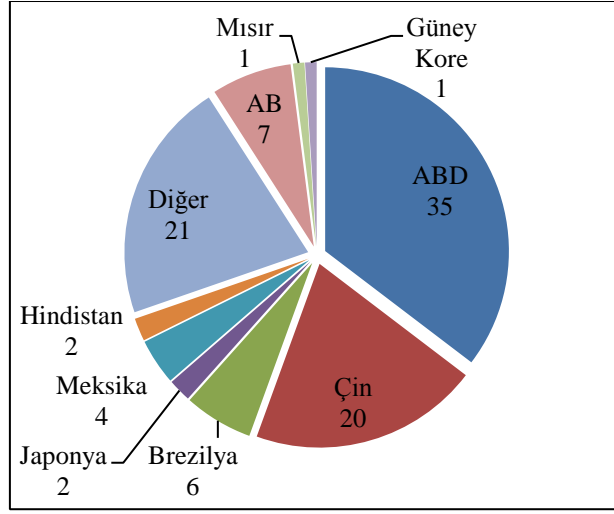
Mısırın her bir parçası ayrı bir değere sahiptir. Mısırdan doğrudan ya da dolaylı olarak 4000 civarında ürün elde edilir. Gelişmekte olan ülkelerde insan gıdası olarak kullanımı ön plana çıkarken, gelişmiş ülkelerde hayvan yemi ve sanayi ham maddesi olarak kullanılma oranı daha yüksektir (Özcan, 2009).

Mısır bitkisinin ekonomik öneminden ötürü dünya genelinde en fazla ekimi yapılan bitki olduğu bilinmektedir. Sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Avrupa Birliği, Meksika, Arjantin ve Hindistan en önemli mısır üreticilerdir. ABD ve Çin tek başlarına dünya mısır üretiminin %60'ını gerçekleştirmektedir (Şekil 2.2) (TMO, 2011a).



Şekil 2.2 - Dünya mısır üretiminin ülkelere göre dağılımı (TMO, 2011a).

2010 yılı hububat raporuna göre dünyada 2010 yılı toplam mısır tüketimi yaklaşık olarak 775 milyon ton olmuştur (Şekil 2.3). Bu tüketimin yarısından fazlası (yaklaşık 415 milyon ton) ABD ve Çin'de gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.3 - Dünya mısır tüketiminin ülkelere göre dağılımı (TMO, 2011a).

Dünyada mısır fiyatları, mısırın giderek artan önemi sebebiyle yükselmektedir. Mısır ekonomik piyasasını belirleyen 5 katılımcı ülkenin (ABD, Japonya, Arjantin, Çin, Meksika) piyasa fiyatları incelendiğinde 2002 yılında ortalama 119\$ olan ton fiyatının 2008 yılında ortalama 219\$ seviyesine ulaştığı görülmektedir (Tablo 2.2) (TMO, 2011a).

Tablo 2.2- 2002 ile 2008 yılları arasında dünya piyasasında mısır ortalama fiyatları (\$/ton) (TMO, 2011a).

Yıllar	ABD	Arjantin	Çin	Japonya	Meksika	Ortalama Fiyat (\$/ton)
2002	115	90	119	137	135	119.2
2003	117	105	118	135	133	121.6
2004	109	131	119	137	135	126.2
2005	99	90	-	-	-	94.5
2006	122	115	-	-	-	118.5
2007	200	-	-	-	-	169.3
2008	228	211	-	-	-	219.3

Türkiye’de mısır üretimi 2010 yılı verilerine göre yaklaşık olarak 594 bin hektar alanda yapılmaktadır ve 2010 yılında elde edilen ürün yaklaşık olarak 4.3 milyon tondur (TMO, 2011a). Türkiye’nin mısır üretimindeki verimlilik oranı son 10 yılda çok yüksek bir hızla artmıştır (Tablo 2.3). Bunun başlıca nedeni ıslah edilmiş tescilli tohumların kullanılmasına ağırlık verilmeye başlanmasıdır. Bu hızlı artışa ve ülkemizin mısır birim alan verimliliğinin dünya ortalamasının üzerinde olmasına karşın, ABD, Kanada, Arjantin gibi bu sektörde lider olan ülkelere göre düşüktür (TMO, 2011a).

Toprak Mahsulleri Ofisi’nin 2010 yılı hububat raporuna göre Türkiye’nin mısır yeterlilik oranı 2005 yılında %93 iken 2009 yılında %79’a gerilemiştir. Birim alandan alınan verim artmasına rağmen yeterlilik oranı %14 miktarında gerilemiştir. Sürekli olarak artan mısır üretim miktarı göz önünde bulundurulduğunda bu yeterlilik düşüşünün nedeni, ortaya çıkarılan yeni kullanım alanları ve buna bağlı sürekli olarak artan ihtiyaçlardır.

TÜİK verilerine göre 2011 yılında mısır üretimi 4.3 milyon ton iken 2012 yılında %2.6 azalışla 4.2 milyon ton olmuştur. 28 Ağustos 2012 de mısır müdahale fiyatı 595 tl/ton olarak açıklanmıştır (TMO, 2012).

Tablo 2.3- 2001 ile 2010 yılları arasında Türkiye’de mısır ekim alanı, üretim ve verimlilik bilgisini gösteren çizelge (TMO, 2011a).

Yıl	Ekim Alanı (ha)	Üretim (milyon ton)	Verim (ton/ha)
2001	550.000	2.20	4.00
2002	500.000	2.10	4.20
2003	560.000	2.80	5.00
2004	545.000	3.00	5.50
2005	600.000	4.20	7.00
2006	536.000	3.81	7.11
2007	517.500	3.53	6.83
2008	595.000	4.27	7.20
2009	592.000	4.25	7.18
2010	594.000	4.31	7.26

#### 2.1.4 Türkiye’de Mısır Tarımını Kısıtlayıcı Faktörler

Türkiye’de de diğer ülkelerdeki gibi mısır üretimini kısıtlayan bazı faktörler mevcuttur. Mısır üretiminde en büyük kayıplara yabancı otlar, hastalıklar ve mısır zararlıları neden olmaktadır. Türkiye’de her yıl ekilen mısırdaki yaşanan kayıp % 65-75’e ulaşabilmektedir. Bu kayıpların %30 kadarı yabancı otlardan, %15 kadarı hastalıklardan, yaklaşık %50 kadarı zararlı böceklerden, geriye kalan küçük yüzde de kuraklık ve depolama koşulları gibi çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır (Özcan, 2009).

Mısır tarımı yapılan alanlarda ekinin sorunsuz büyüebilmesi için mısırdan başka hiçbir bitkinin bulunmadığı rekabetsiz bir ortam sağlanmalıdır. Yabancı ot olarak nitelendirilen bu bitkiler mısır ile rekabete girerek toprakta bulunan nemi ve besin maddelerini mısır aleyhinde tüketirler. Ayrıca bu bitkiler mısıra zarar verebilecek hastalık etmenleri ve böcekleri de barındırdıkları için mısır veriminde önemli düşüşlere neden olurlar (Babaoğlu, 2005).

Uygun mücadele yapılmadığı durumlarda yabancı otlar mısır tarımında kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Gelişkin bir mısırın güçlü bir yabancı ot direnci olmasına karşın ekildikten sonraki ilk 2 aylık dönemde yabancı ot mücadelesine karşı çok hassastır.

Türkiye’de mısır üretiminde sınırlayıcı etki gösteren altmışın üzerinde hastalık vardır. Bu hastalıklardan en sık görülenleri fide solgunluğu (*Helminthosporium maydis*), tohum çürüklüğü (*Aspergillus spp.* ve *Gibberella zea*), fide yanıklığı (*Penicillium oxalicum*), sap çürüklükleri (*Gibberella zea*, *Fusarium graminearum* ve *Diplodia maydis*), mısır rastığı (*Ustilago zea*), koçan çürüklükleri (*Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Physalospora* ve *Rhizoctonia*), yaprak yanıklığı (*Helminthosporium turcicum* ve *Helminthosporium maydis*), yaprak lekesi (*Helminthosporium carbonum*), pas (*Puccinia*, *Physopella zea*), külleme (*Sclerospora*, *Sclerophthora* ve *Pronosclerospora*) ve bakteriyel solgunluk (*Erwinia stewartii*) şeklinde sıralanabilir. Bu hastalık yapan organizmaların ürettiği mikotoksinler canlı sağlığı için son derece zararlıdır. Mikotoksinlerin en az on dört tanesinin kanserojen olduğu saptanmıştır ve bir çoğu akut veya kronik hastalıklara neden olmaktadır. Mısırdaki mikotoksin üreten cinslerin en önemlileri; *Aspergillus flavus*, *A. prasticus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Ustilago maydis*’dir. Mikotoksinlerin 50 ng/kg yoğunlukta farede öldürücü olduğu görülmüştür. Mikotoksinlerin zehir etkisinin giderilmesi ile ilgili henüz bilinen bir yöntem olmadığı için ürünlerin oluşmasının engellenmesi kontrolde en önemli noktayı oluşturmaktadır (Sabuncuoğlu ve diğ., 2008; Özcan, 2009).

Türkiye’de zararlı böcekler nedeniyle yaşanan mısır kaybı çok yüksektir. Türkiye’de mısır tarımına en fazla zarar veren iki Lepidopter böcek türü mısır kurdu (*Ostrinia nubilalis* Hübner) ve mısır koçan kurdudur (*Sesamia nonagrioides* Lefebvre). Mısır kurdu ve mısır koçan kurdu ile kimyasal mücadele yapılmadığında ikinci, üçüncü ekimlerde %100’e varan ürün kayıpları görülebilmektedir. Bununla beraber böcek yaralanmaları sonucunda, mikotoksin üreten mantar enfeksiyonlarında önemli artışlar görülmüştür.

Yoğun ilaçlamalara rağmen verim kayıp oranı %15 – 20 civarındadır. Dahası, ilaçlama yapılmasına karşın başarısız sonuç elde edilebilir. Çünkü bitkinin kök, gövde ve meyvesi içinde gelişim gösteren ergin böcek ve larvalar insektisitten etkilenmezler. Öte yandan tarım ilaçları çevre, insan ve hayvan sağlığını en fazla tehdit eden grup olmalarının yanısıra geri dönüşü olmayan biyolojik ve genetik hasarlara neden olabilirler. Yoğun insektisit kullanımı toprak ve su kaynaklarında kirliliğe neden olduğu gibi, arı ve solucan gibi ekolojik olarak çok değerli canlıları da öldürmektedir (TMO, 2011b).

## **2.2 BİYOTEKNOLOJİK BİTKİLER**

Bitkilere gen aktarımı, fonksiyonel olarak belirlenmiş ve istenilen bir özelliği kodlayan doğal ya da sentetik nükleik asit dizilerinin, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak bitki hücrelerine aktarılmasıdır. Genetik transformasyon olarak adlandırılan bu işlem, gelişen teknoloji ve üretilen yeni yöntemlerle, çeyrek yüzyılı aşkın bir süredir, ihtiyaç duyulan özelliklerin bitkilere kazandırılmasında başarıyla uygulanmaktadır.

Transgenik bitkiler günümüzde ticari olarak üretilmekte ve tüketicilerin kullanımına sunulmaktadır. Bu ürünlerin bazıları Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4- Ticari olarak ekimine izin verilen transgenik varyetelerden bazıları (Birch, 1997)

Geliştirilen Özellik	Varyete	Geliştiren Şirket	Tarih
Kalite (raf ömrü)	Flavr Savr (Domates)	Calgene	1994
Yağ özelliği	Laurical (Kanola)	Zeneca	1994
Virüse dayanıklılık	Freedom 2 (Kabak)	Asgrow	1995
Böceğe dayanıklılık	Ballgard (Pamuk)	Monsanto	1996-1997
	New Leaf (Patates)		
	YieldGuard (Mısır)		
Böceğe dayanıklılık	Maximizer (Mısır)	Ciba Seeds	1996
Herbisite dayanıklılık	Roundup Ready (Soya, Kanola, Mısır)	Monsanto	1995-1996
	BXN (Pamuk)	Calgene	1995

Günümüzde biyoteknolojik ürünlerin ekim alanları 1996 yılında ekimlerinin başladığı alandan 94 kat gibi dikkat çekici bir oranda büyümüştür. Biyoteknolojik ekinler bu nedenle modern tarım tarihinin en hızlı kabul gören ekin teknolojisi olarak kabul edilmektedir (ISAAA, 2012a).

1996 yılından 2011 yılına kadar geçen süreçte dünya genelinde biyoteknolojik ürünlerin ekilme alanlarına ait veriler Tablo 2.5’de gösterilmiştir.

Tablo 2.5- GD bitkilerin küresel ekim alanları (ISAAA, 2012a)

<b>Yıl</b>	<b>Milyon Hektar</b>
1996	1.7
1997	11.0
1998	27.8
1999	39.9
2000	44.2
2001	52.6
2002	58.7
2003	67.7
2004	81.0
2005	90.0
2006	102.0
2007	114.3
2008	125.0
2009	134.0
2010	148.0
2011	160.0
<b>TOPLAM</b>	<b>1,257.0</b>

### 2.2.1 Biyoteknoloji ve Mısır

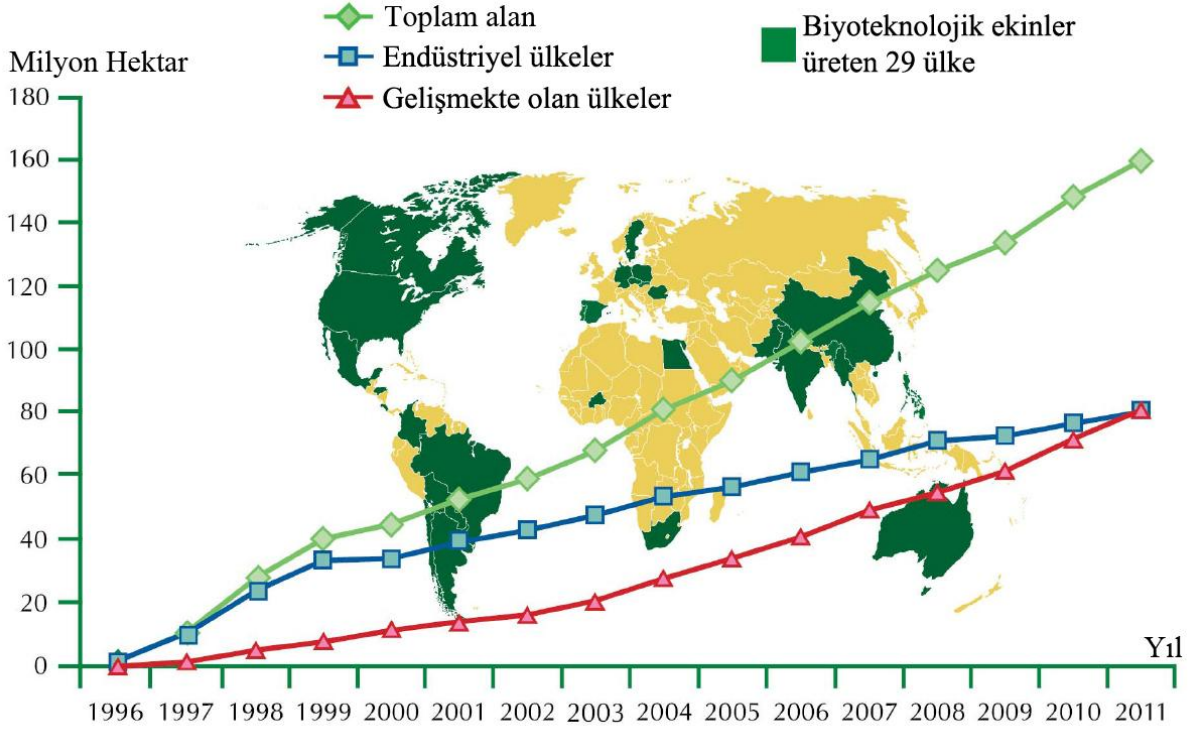
Bitkisel üretimin artırılması, üretim alanlarının genişletilmesi veya birim alandan elde edilen verimin artırılmasıyla mümkündür. Birim alanda verimin artırılması için bir yandan bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi, bir yandan da yetiştirmede kullanılan tarım tekniklerinin iyi bir şekilde uygulanması gerekir. Son yüzyılda bitkisel üretimde uygulanan gübreleme, sulama ve ilaçlama teknikleri ile verimde büyük artışlar sağlanmıştır, ancak bu uygulamaların ekolojik dengeyi olumsuz etkilediği görülmüştür. Bu durumda bitkisel üretimde verim artışlarının daha çok bitkilerin genetik yapılarının ıslahı ve kullanılan girdilerin daha bilinçli bir şekilde kullanılmasıyla sağlanabileceği ortaya çıkmaktadır (Haspolat, 2012).

Bir canlı türüne başka bir canlı türünden gen aktarılması veya mevcut genetik yapıya müdahale edilmesi yoluyla yeni genetik özellikler kazandırılmasını sağlayan bu modern biyoteknolojik tekniklere gen teknolojisi; gen teknolojisi kullanılarak doğal süreç ile edinilmesi mümkün olmayan yeni özellikler kazandırılmış organizmaya da “Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO)” denir.

İyi tarımsal karakterler gösteren bitki varyetelerini geliştirmek bitki ıslahçılarının nihai hedefidir. Klasik ıslahın doğasında mevcut olan rastgele gamet birleşmelerinin ortaya çıkartmış olduğu çoklu birey seçiliminin yarattığı zorluklar ve kısıtlamalarla birlikte istenilmeyen bir takım özellikler de bitkilere aktarılabilir (ISAAA, 2006). Geliştirilen yeni biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan farklı türler ve canlılar arasındaki uyumsuzluk sorunu ortadan kalkmıştır (Haspolat, 2012). Ayrıca bütün genetik mühendisliği yöntemleri DNA aktarmaya dayalı değildir. Bitkiler bir takım genlerinin çıkartılmasıyla veya susturulmasıyla da modifiye edilebilirler (ISAAA, 2006).

2011 yılında 29 ülkeden 16.7 milyon çiftçi 160 milyon hektar alana biyoteknolojik bitkiler ekmiştir. Haritada (Şekil 2.4) da görüldüğü gibi Kuzey ve Güney Amerika, Güneydoğu Asya, Avustralya, bazı Avrupa ve Afrika ülkeleri biyoteknolojik tarıma önem vermektedir. Bu ekim alanları 2010 yılına oranla %8 artmıştır. Endüstriyel ülkeler ve gelişmekte olan ülkelerin ekim oranları birbirini yakalamıştır (ISAAA, 2012b).





Şekil 2.4- Biyoteknolojik ekinlerin dünyadaki yayılışı (ISAAA, 2012b).

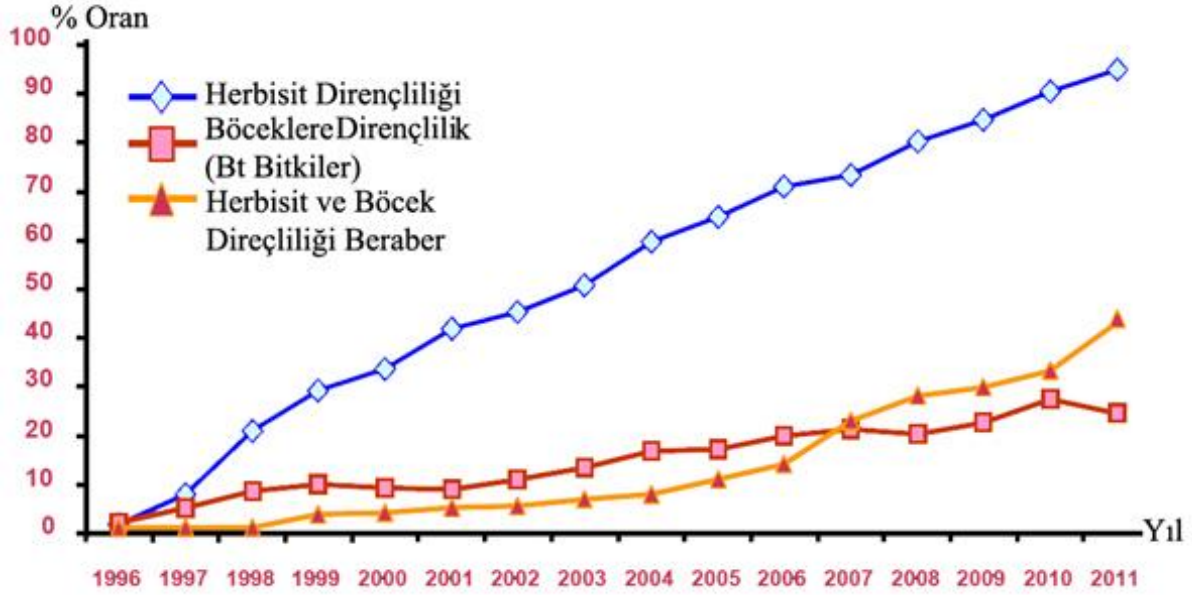
2011 senesinde biyoteknolojik bitkilerin küresel pazar değeri; 59.6 milyar dolar olan toplam küresel ekin pazarının %22 si olup 13.3 milyar dolardır. 1996'dan itibaren küresel biyoteknolojik bitki pazarı toplam olarak yaklaşık 87.4 milyar dolardır. Bu pazar oranının 2012 yılında, 2011 yılındaki miktarı yaklaşık %5 aşarak 13.3 milyar dolardan 14 milyar dolara çıkması öngörülmektedir (ISAAA, 2012a).

2010 ve 2011 senelerinde biyoteknolojik ürünleri eken ülkeler ve ekim alanları Tablo 2.6'da verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi biyoteknolojik ürünlerin ekim alanları genel olarak artış eğilimindedir.

Tablo 2.6- Biyoteknolojik ürünleri eken ülkeler ve ekim alanları (ISAAA, 2012a).

ÜLKE	2010 Yılı (Milyon Hektar)	2011 Yılı (Milyon Hektar)
A.B.D.	66.8	69
Brezilya	25.4	30.3
Arjantin	22.9	23.7
Hindistan	9.4	10.6
Kanada	8.8	10.4
Çin	3.5	3.9
Paraguay	2.6	2.8
Pakistan	2.4	2.6
Güney Afrika	2.2	2.3
Uruguay	1.1	1.3
Bolivya	0.9	0.9
Avustralya	0.7	0.7
Filipinler	0.5	0.6
Myanmar	0.3	0.3
Burkina Faso	0.3	0.3
Meksika	0.1	0.2
İspanya	0.1	0.1
Kolombiya, Şili, Honduras, Portekiz, Çek Cum., Polonya, Mısır, Slovakya, Romanya, İsveç, Kosta Rika, Almanya	<0.1	<0.1

En çok tarımı yapılan transgenik bitki soya fasulyesi olup bunu sırayla mısır, pamuk ve kanola takip etmektedir. Bu ürünlerin içerisinde en yüksek ekim oranı herbisit toleransı gösteren bitkilere aittir (Şekil 2.5). Bunu giderek artan oranla herbisit/böcek ve ardından da sadece böcek toleransı gösteren bitkiler takip etmektedir (ISAAA, 2012b). Herbisite dirençli soya fasulyesi, toplam biyoteknolojik ekin alanının %47'sini kapsayarak en çok etkilen ürün olmuştur. Bunu %23'lük oranla böceklere ve herbisite dirençli mısır takip etmektedir (ISAAA, 2012a).



Şekil 2.5- Biyoteknolojik olarak geliştirilen bitkilerin tercih oranları (ISAAA, 2012b).

Dünyada ekilen pamuğun %82'si, soyanın %75'i, mısırın %32'si ve kanolanın %26'sı biyoteknolojik ürünlerdir (ISAAA, 2012b).

Mısır bitkisi insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir protein ve enerji kaynağı olduğu için genetik manipülasyon çalışmalarında ilk hedeflerden birisi olmuştur (Petrillo et al., 2008).

### 2.3 BİTKİLERE GEN TRANSFERİ

Bir bitkiye gen transferinde faydalanılan en önemli özelliklerden birisi, *in vitro* (tüp içerisinde) koşullarda bitkinin tek bir hücrenin tam bir bitkiyi oluşturma yeteneğidir ki bu duruma totipotensi denir (Babaoğlu, 1999; Yentür, 2003). Gen transferi süreci, ilgili DNA parçasını istenilen bitki hücresine uygun yollarla transfer etmeyi, transforme olmuş hücrelerin önce çoğaltılıp (kallus evresi) sonra organogeneze götürülerek yeni bir bitkiyi oluşturmaya (rejenerasyon) ya da doğrudan bitki oluşumuna gidilmesi (somatik embriyogenesis) için uygun doku kültürü yöntemlerini içerir. Transformasyonun sadece bir hücreye uygulanması ve bu hücreden yeni bir bitki oluşturulmasındaki amaç, aktarılabilecek genin oluşturulacak

bitkinin bütün hücrelerinde stabil koşullarda bulunmasını sağlamak ve ortaya çıkabilecek kimerik organizmaların önüne geçmektir. Ayrıca transfer edilen gen, dölden döle tohumla aktarılabilmelidir (Babaoğlu, 1999).

Bitkilere gen aktarımında yabancı DNA'nın kabul edilip edilmediğinin anlaşılabilmesi ve seçilimin kolay yapılabilmesi için aktarılan DNA kalıbına istenilen gen ile birlikte markör ve raportör genler de eklenir. Markör genler antibiyotik ve herbisitlere karşı dirençlilik sağlarken, raportör genler ise yapılan basit testlerde kendisini fenotipik olarak ifade ederler ve transformasyonun başarısı hakkında görsel kanıtlar sunarlar.

Mısır bitkisine gen aktarımının optimizasyonu için beta-glukorinidaz (GUS), yeşil floresan protein (gfp) raportör genlerinden ve fosfonötrisin asetiltransferaz (PAT) markör geninden faydalanılmaktadır (Petrillo ve diğ., 2008).

Yüksek oranda başarılı bir gen aktarımı için aşağıdaki koşullar sağlanmalıdır (Birch, 1997):

1. Gen aktarımı için ihtiyaç duyulan olgunlaşmamış embriyolar, yapraklar, internodlar gibi hedef dokuların, uygun gelişme safhalarında, sürekli olarak hazır bulundurulması gerekir.
2. Farklı kùltivarlarda uygulanabilir olmalıdır. Tek tipe özel oluşturulmuş teknikler, kùltürü yapılan yüksek verimli diğerk kùltivarlarda başarıya ulaşmadıkça değeri yoktur.
3. Çok sayıda transgenik (genetiğı değıştirilmiş) bitki elde edebilmek için yöntem etkili, ekonomik ve tekrarlanabilir olmalıdır.
4. Çalışan araştırmacılar için sağık açısından yüksek sakınca oluşturabilecek (silikon karbür gibi kanserojen) uygulamalardan olabildiğince kaçınılmalıdır.
5. Uygulanabilirliğı kolay olmalıdır. Protoplast kùltürü gibi, somaklonal varyasyonla ortaya çıkabilecek varyasyonlara neden olabilen uygulamalardan kaçınılmalıdır.
6. Birden fazla gen aktarılabilmelidir. Böylece arzu edilen genlerin bir araya geldiğı bitkilerde ortaya çıkabilecek yüksek oranda raportör gen ekspresyonu sayesinde istenilen bitki hatları seçilebilecektir.
7. Etkili bir seçim süreci uygulanabilmelidir.
8. Maliyeti ve somaklonal varyasyonu en düşük seviyede tutabilmek için doku kùltürü süresi mümkün olduğunca kısaltılmalıdır.
9. Gerek tohumla, gerekse vejetatif çoğaltım için stabil ve uniform (kimerik olmayan) transgenik bitkiler elde edilmelidir.
10. Aktarılan genler, birlikte aktarıldıkları vektör dizilerinden bağımsız olarak etkinlik gösterebilir olmalıdır.

11. Transforme olmuş hatlarda ilerleyen seçim sürecinde ihtiyaç duyulmayacak raportör genlerin ve/veya dizilerin uzaklaştırılabilmesi ya da etkisizleştirilebilmesi mümkün olmalıdır. Sadece istenilen özellikleri kodlayan genler aktarılmalıdır, istenmeyen genlerin geçişi engellenmelidir.
12. Fazla kopya sayısından kaynaklanan gen inaktivasyonunun önüne geçilebilmesi için genler düşük kopya sayısında aktarılmalıdır.
13. Aktarılan genler istenilen dokularda görev almalıdır ve istenilen gen kontrol dizilerince kontrol edilmelidir.
14. Organel genomlarına gen aktarımı yapılabilecek şekilde düzenlenmelidir.
15. Aktarılan genler istenilen fizyolojik devrede ve seviyede aktivite göstermelidir.

Bitkilere gen aktarımı yöntemleri 2 ana başlık altında alt başlıklara ayrılarak incelenebilir (Babaoğlu, 1999; Özcan ve diğ., 2004):

1) Dolaylı gen aktarım yöntemleri:

- a) *Agrobacterium tumefaciens* ya da *A. rhizogenes* bakterileri kullanılarak gen aktarımı: Günümüzde en fazla kullanılan yöntemdir. Aktarılacak DNA, bakterinin Ti-plazmitine yerleştirilir ve bakterinin bitkiyi enfekte etmesiyle transformasyon süreci tamamlanmış olur. Ancak dikotil (çift çenekli) bitkilerde oldukça başarılı bir yöntem olmasına rağmen, mısır ve pirinç gibi monokotil (tek çenekli) bitkilerde istenilen oranda başarı göstermemektedir. Ancak son yıllarda kullanılmaya başlanan yeni *A. tumefaciens* suşları ile monokotil bitkilerde de başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir.

2) Doğrudan gen aktarım yöntemleri:

- a) Partikül Bombardmanı (Biyolistik) yöntemi ile gen aktarımı: Partikül hızlandırıcı bir sistem sayesinde DNA ile kaplanmış metal partiküllerinin helyum gazı aracılığıyla elde edilen basınçla canlı dokulara fırlatılmasıyla gen aktarılmasına dayanan fiziksel bir gen aktarım yöntemidir.
- b) Protoplastlara gen aktarımı (Elektroporasyon ve PEG aracılığıyla): Enzimatik yollarla çeperleri uzaklaştırılmış bitki hücreleri, protoplastlar, kimyasal maddeler (PEG-Polietilen glikol) veya elektroporasyon aracılığıyla membranlarının geçirgenlikleri değiştirilerek gen aktarımında kullanılabilirler. Ancak protoplast gerektiren yöntemler oldukça zordur ve stabil sonuçlar elde etmek güç olmaktadır.
- c) Mikroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarımı: Bitkiye aktarılması istenen genleri taşıyan DNA parçası çok ince (0,5-10 µm çapında) kılcal pipetlerle veya enjektörlerle doğrudan immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem, mikrospor vb. içerisine steril şartlarda mikroskop altında enjekte edilir. Sistem genelde zordur ve çok başarılı sonuçlar elde edilmiş değildir.

## d) Diğer yöntemler:

- i) Sonikasyon: Esası ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında boşluklar açmak ve serbest DNA parçalarının hücre içine girişini kolaylaştırmaktır.
- ii) Mikrolazer: UV lazer mikro ışınları (343 nm) ile hücrelerde mikro delikler açmak ve DNA parçalarının içeriye girmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır.
- iii) Silikon karbür fiberleri: Silikon karbür fiberlerle kaplanmış DNA, süspansiyon hücrelerine gen aktarımında kullanılmıştır. Fiberler hücrelerde çok ince delikler açmakta ve DNA içeriye kolayca girebilmektedir. Çok başarılı bir yöntem değildir.
- iv) Desikasyon: Basit bir metottur. Doku desikasyonu (soldurma) ve daha sonra transfer edilmek istenen DNA parçalarının bulunduğu bir ortamda dokunun tekrar su alımı sonucu hücre zarından içeri alınmayı sağlamak sistemin temelini oluşturur.

### 2.3.1 Partikül Bombardımanı (Biyolistik) Yöntemi İle Mısıra Gen Aktarımı

Mısıra bilinen ilk gen aktarım denemesi Coe ve Sarkar (1966) tarafından yapılmıştır. Bu deneme tarihte bitki transformasyonu konusundaki ilk deneme sayılabilir. Denemede mısır tohumunun total DNA'sı, gelişmekte olan mısır fidelerinin apikal meristemlerine doğrudan enjekte edilmiştir. Bu denemede donör bitkinin karakteristik özelliklerinin alıcı bitkiye de geçeceği varsayılmış ancak deneyin sonucu başarısız olmuştur. Deneyde kullanılan 242 bitkinin hiç birinde aktarılan karakterler gözlemlenememiştir. Bu başarısız fakat önemli denemenin ardından Coe ve Sarkar, yüksek bitkilerin transformasyonunda başarılı olabilmek için kompetensi, nükleazlar, numune sayısı, gen aktarılan bölgenin uygunluğu ve bozunma gibi faktörlerin göz önünde bulundurulması ve çözülmesi gereken problemler olduğunu belirtmiştir.

İlk başarılı transformasyona kadar mısır transformasyonunu deneyen bütün araştırmacıların ortak olarak kabul ettiği başarıyı etkileyen 3 faktör; hedef hücrelerin kompetensi özelliği, etkin ve tekrarlanabilir aktarım metodu ve güvenilir seçim sistemidir.

Coe ve Sarkar'ın deneylerinden elde ettikleri sonuçlardan yola çıkarak öne sürdükleri sorunlardan birisi de hücre duvarının yüksek bitkiler için etkili bir bariyer görevi görmesidir. Hücre duvarı engeli kimyasal ya da mekanik bir şekilde aşılmalıdır, aksi durumda aktarım engellenmektedir. Partikül bombardımanının geliştirildiği 1980'lerin sonuna kadar, mısıra gen aktarımı için etkili bir yol yoktu. O dönemde mevcut olan bütün uygulamalar (DNA alınımı, PEG füzyonu, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, *Agrobacterium* yöntemi) hücre duvarının tamamen uzaklaştırıldığı protoplastlara uygulama yapmayı gerektiriyordu. Bu metodların ortak sorunu; transforme edilmiş mısır protoplastlarından fertil bir bitki rejenerasyonunun çok zor olmasıdır. İlk stabil mısır hücresi transformasyonu 1986 yılında Framm ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde mısır protoplastlarına elektroporasyon ile gen aktarılmış ancak rejenerasyon başırlanamamıştır. Ardından 1986 yılında Rhodes ve arkadaşları

elektroporasyon yöntemi ile mısır protoplastlarına gen aktarımı yaptıktan sonra mısır hücrelerinden rejenerasyonu başarmıştır ancak gelişen bitkiler steril olmuştur (Wang ve diğ., 2003).

1987 yılında Sanford, monokotillerde hücre duvarı sorununu ortadan kaldıran bir yöntem duyurdu. Bu yöntemin en büyük avantajı; istenilen biyolojik materyali her tür hücreye sorun yaşamadan göndermesiydi. Geliştirdiği bu yöntemin adı partikül bombardımanıdır.

Biyolistik yönteminin esası; helyum gazıyla elde edilen basıncı kullanan bir ateşleme düzeneği yardımıyla, yüksek oranda hızlandırılmış ve mikro-taşıyıcı adı verilen, değişik boyutlardaki metal partikülleri (mikro projektiller; altın ya da tungsten) ile DNA'nın hedef dokulara aktarılmasıdır (Wang ve Frame, 2009). Partiküller bitki hücre membranından geçerler, nukleusa ulaşırlar ve genetik materyallerini bitkinin genomik DNA'sına aktarırlar (Oneto ve diğ., 2010). Günümüzde partikül bombardımanı, özellikle tek çenekli bitkilere gen aktarımında kullanılan en güvenilir ve etkili doğrudan gen aktarım yöntemidir (Wang ve Frame, 2009).

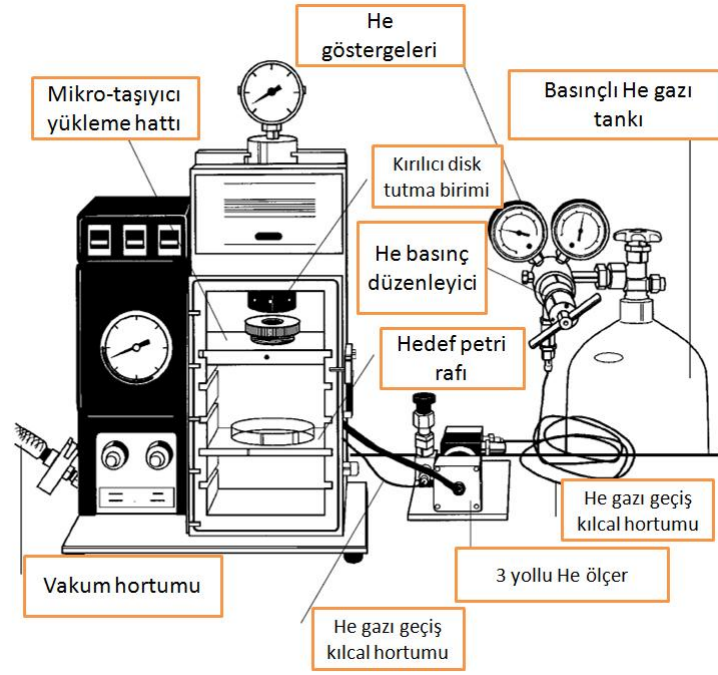
Partikül bombardımanının keşfinin, bitki genetik mühendisliğinde yeni bir çağ açtığını söylemek yanlış olmayacaktır. İlk fertil mısır transformasyonunun rapor edilmesinden sadece 10 yıl sonra ABD'nin toplam mısır üretiminin %20'si transgenik hatlara kaymıştır. Günümüzde bu oran %80'den fazladır (Wang ve diğ., 2003; Özcan, 2009)

Yüksek hızlı mikro projektillerin kullanılarak bitki dokusuna genetik materyal aktarılması metodu Ted Klein, Ed Wolf, Nelson Allen işbirliğinde John Stanford tarafından 1987 yılında geliştirilmiştir. Bu ilk çalışmada soğan dokusuna aktarım yapılmıştır. Soğan epidermal hücrelerine kloramfenikol asetil transferaz (CAT) geni aktarılmış, bombardımandan 3 gün sonra CAT aktivitesi gözlenmiştir.

Partikül bombardımanı ile ilk stabil transformasyon 1988 yılında rapor edilirken, yakın zaman aralığında diğer organizmaların transformasyonu da ilan edilmiştir. 1991 yılında hayvan hücresi, 1992 yılında bakteri, 1993 yılında fungus transformasyonları ilan edilmiştir (Finer ve diğ., 1999).

Biyolistik sistemi ilk olarak tasarlandığında; barutun patlatılmasıyla elde edilen basınç aracılığıyla hızlandırılmış tungsten moleküller kullanılarak işleyen bir sistemdi. Günümüzde kullanılan sistem sıkıştırılmış helyum gazından elde edilen ivme kullanılarak hızlandırılan altın ve tungsten partikülleri ile işleyen bir sistemdir. Günümüzde halen kullanılmakta olan güncel sistem 1991 yılında ilan edilmiştir (Sanford ve diğ., 1991).

Partikül bombardımanı ile gen aktarımında kullanılan cihaz; bombardıman kabini ve ekipmanları, helyum tankı ve helyum gazı aktarım sistemi ve vakum sisteminden oluşur. Şekil 2.6'da partikül bombardımanı sisteminin (BioRad PDS-1000/He) şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.6- Biyolistik sisteminin şematik gösterimi (Bio-Rad).

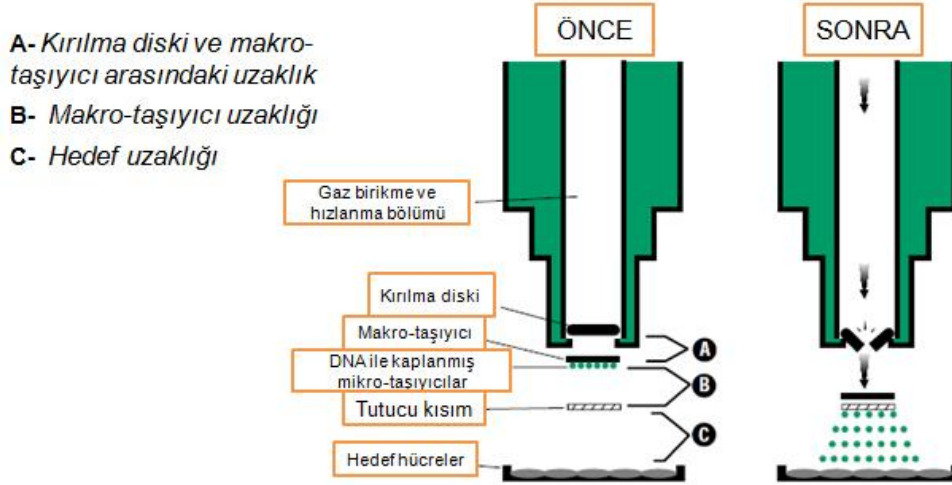
Partikül bombardımanı sisteminde yapılacak uygulamaya göre değişim gösteren bazı parçalar mevcuttur. Bu parçalar mikro taşıyıcılar (micro-carrier) (altın – tungsten), kırılma diskleri (rupture disk), makro taşıyıcılar (macro-carrier), tutucu kısımlar (stopping screen)'dir. Şekil 2.7' de bu kısımların fotoğrafları bulunmaktadır.



Şekil 2.7- Partikül bombardımanı sisteminde kullanılan değişken bileşenler (Bio-Rad).



Biyolistik PDS-1000/He sistemi kırılma diskinden açığa çıkan yüksek helyum gazı basıncını ve vakum sistemini kullanarak, milyonlarca mikroskobik altın veya tungsten mikro taşıyıcılarla yüklü makro taşıyıcı filmi çok yüksek hızla hedef hücelere doğru fırlatır. Mikro taşıyıcılar gen aktarımı için kullanılacak DNA molekülleri ile kaplanmaktadır. Fırlayan makro taşıyıcı kısa bir mesafe sonra tutucu kısım tarafından durdurulur. DNA ile kaplanmış mikro taşıyıcılar kazandıkları ivme ile hedef kısımdaki hüceleri patlatmak ve transforme etmek için yollarına devam ederler. Bu tanım Şekil 2.8' de görsel olarak verilmiştir.



Şekil 2.8- Partikül bombardımanı sisteminin çalışma prensibinin şematik gösterimi (Bio-Rad.).

Partikül bombardımanının avantajları ve dezavantajları aşağıda listelenmiştir (Özcan ve diğ., 2004) :

1) Avantajları:

- i. Genotipten bağımsız kullanım,
- ii. Farklı hedef dokulara ve hücelere uygulanabilirlik,
- iii. Genetiği değiştirilmiş tahıl elde etmek için halen kullanılan en etkili yöntem olmasıdır.

2) Dezavantajları:

- i. Karmaşık bir sistem ve pahalı donanım gerektirmesi,
- ii. Aktarılan DNA'nın yüksek derecede yeni düzenlemeler ve çok sayıda kopya aktarılması olasılığıdır.

Biyolistik yöntemi; *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarım yöntemiyle kıyaslandığında en önemli avantajı biyolojik vektör kullanımından dolayı kaynaklanabilecek biyolojik uyumsuzluğu ortadan kaldırmasıdır. Biyolistik ile transformasyon denemelerinde geçici transformasyon oranının çok yüksek olmasına rağmen stabil transformasyon oranı düşüktür. Aktarılan DNA'nın büyük bir kısmı DNazlar tarafından parçalanır ya da inaktif hale getirilir (Finer ve diğ., 1999).

Gen aktarılabilecek her bitki türü için, çeşitli denemeler yapılarak cihazda en iyi sonucu veren değerlerin belirlenmesi gerekir. Böylece çalışılacak her bir bitki türü için bir bombardıman yöntemi optimize edilebilir. Bu değerler;

1. Kırılma diski ve makro-taşıyıcı arasındaki uzaklık,
2. Makro-taşıyıcı ve tutucu kısım arasındaki uzaklık,
3. Tutucu kısım ve hedef uzaklığı,
4. Uygulanacak helyum basınç miktarı,
5. Kabin içi vakum oranıdır.

Partikül bombardımanı yöntemi 20 yılı aşkın süredir bitkilere gen aktarımı çalışmalarında başarılı şekilde kullanılmaktadır (Brettschneider ve diğ., 1997; Cabreraponce ve diğ., 1995; Dai ve diğ., 2001; Finer ve McMullen, 1990, 1991; Frame ve diğ., 2000; Klein ve diğ., 1988; Klein ve diğ., 1989; Oneto ve diğ., 2010; Vain ve diğ., 1993; Wang ve Frame, 2009; Wright ve diğ., 2001; Yao ve diğ., 2006).

Bu yöntem aracılığıyla mısır bitkisinin transformasyonu ve işlem optimizasyonu üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Brettschneider ve diğ., 1997; Frame ve diğ., 2000; Gordonkamm ve diğ., 1990; Klein ve diğ., 1989; Oneto ve diğ., 2010; Register ve diğ., 1994; Songstad ve diğ., 1996; Wang ve Frame, 2009).

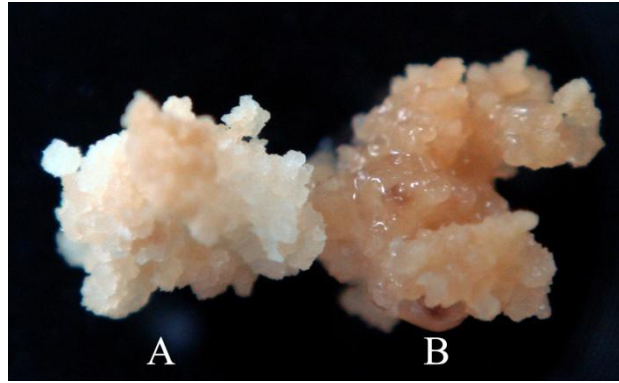
Biyolistik yönteminde kullanılan mikrotarıyıcılar altın ya da tungstendir. Altın partikülleri kimyasal olarak inaktif olduklarından hücreler için zararlı (sitotoksik) etki göstermezler. Tungsten partikülleri altına kıyasla çok daha ucuzdur ancak sitotoksik etki gösterirler. Ayrıca tungsten ile kıyaslandığında altın partikül boyutları ve şekilleri daha homojendir (Finer ve diğ., 1999).

Mısır bitkisinde 0.6  $\mu\text{m}$  ve 1  $\mu\text{m}$  altın partikülleri ile yapılan optimizasyon denemelerinde başarılı transformasyon oranının 0.6  $\mu\text{m}$ 'de yaklaşık 14 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Büyük partiküllerle yapılan denemeler, küçük partiküllerle yapılanlarla kıyaslandığında hasar gören doku miktarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum, kullanılan partikül ağırlığı ya da partikül sayısı eşit tutulan deneylerde açıkça görülmüştür (Frame ve diğ., 2000).

Transforme edilen hücrelerden sağlıklı bir bitkinin gelişebilmesi; alıcı hücre (host) -genom stabilitesi, genin birleşme hızı, genotipin bağımsızlığı gibi temellere de bağlıdır. Bu yüzden sürgün uçları, yaprak ve sap segmentleri, hipokotiller, epikotiller, olgunlaşmamış embriyolar, olgunlaşmış sağlıklı tohumların rejenerasyon kapasiteleri, dış koşullara adaptasyonu ve tohum oluşturma kapasiteleri açılarından test edilmelidir (Oneto ve diğ., 2010).

Transformasyon çalışmalarında üretken mısır elde etmek için, uygulamaların olgunlaşmamış embriyodan elde edilen kalluslar üzerinde yoğunlaştırılması gerekmektedir (Petrillo ve diğ., 2008).

Mısır doku kültürlerinde kalluslar; embriyonik olmayan, tip I embriyonik ve tip II embriyonik kalluslar olmak üzere başlıca üç tipe ayrılırlar. Embriyonik olmayan kalluslar sulanmış, kahverengiye dönmüş ve rejenerasyon yeteneğini kaybetmiş kalluslardır ki, bu onları transformasyon için elverişsiz kılar. Tip I embriyonik kalluslar genellikle kompakt ve beyazdır. Organogenezis ile direkt olarak bitki oluşturabilirler, ancak bu tip kalluslar uzun süre stabil tutulamadıklarından transformasyon çalışmaları için ideal kalluslar değildir. Tip II kalluslar kırılgan, yumuşak ve sarımtıraktır. Rejenerasyon kapasiteleri oldukça yüksektir (Oneto ve diğ., 2010). Rejenerasyon başarılarından dolayı tip II embriyonik kalluslar transformasyon çalışmaları için en iyi seçenektir. (Oneto ve diğ., 2010; Petrillo ve diğ., 2008). Şekil 2.9'da embriyonik olan ve embriyonik olma özelliğini yitirmiş kallus örnekleri görülmektedir.



Şekil 2.9- A-Rejenerasyon yeteneğine sahip embriyonik kallus B- Rejenerasyon yeteneğini kaybetmiş embriyonik olmayan kallus (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Partikül bombardımanı uygulaması esnasında başarıyı etkileyen önemli bir diğer husus da dokulara verilecek zararı en aza indirgeyip, bombardıman sonrasında DNA'nın aktarılacağı hücrelerin embriyonogeneze ve takiben rejenerasyona gitmesini engelleyecek şekilde zarar vermemektir. Bunun için hedef hücreleri bombardıman öncesinde ozmotik bir muameleye tabi tutmak gerekir. Ozmotik muamele mısır hücrelerinde plazmolizasyona neden olur. Bitki hücresi izotonik ortamdayken kendisinden daha yoğun bir ortama konulduğunda, hücredeki küçük moleküllerin enerji harcanmadan çok yoğun hücre ortamından, az yoğun dış ortama geçişine plazmolizasyon denir. Plazmolizasyonda osmoz kurallarına göre hücre su kaybeder.

Plazmolize olmuş hücreler, partiküllerle vurulduklarında patlayarak dağılmayıp bütünlüklerini korurlar. Mısır bitkisine ozmotik muamelede bulunmak için en uygun madde ve oranlarının 0,4M mannitol ve 0,4M sorbitol olduğu belirtilmiştir (Vain ve diğ., 1993).

GUS geni içeren bir plazmit ile mısır kalluslarına bombardıman denemesi yapılmış ve en uygun süreyi belirlemek için skorlama yapılmıştır. Sonuçları belirlemek için bombardımandan sonra GUS anlatımını belirten mavi bölge oluşumuna bakılarak sayım yapılmıştır (Vain ve diğ., 1993) . Deneyin sonuçları Tablo 2.7' de verilmiştir.

Tablo 2.7- Mısır kalluslarına partikül bombardımanında ozmotik muamelenin başarıya etkisini gösteren tablo (Vain ve diğ., 1993).

Ozmotik muamele süresi (saat)		Sayılan mavi bölgeler
Bombardımandan önce	Bombardımandan sonra	
0	0	3274
0	16	2608
4	0	4691
4	16	8789
4	1	9376
4	16	10178
4	24	8283
4	48	8077
48	16	2908
24	16	5676
7	16	7236
4	16	8236

Yapılan ozmotik muameleler sonucunda transformasyon başarı oranının katlanarak arttığı görülmüştür. Tablo 2.7'den de anlaşılacağı gibi partikül bombardımanının öncesinde ve sonrasında uygulanan ozmotik işlem, başarılı olarak geni alan mısır hücrelerinin bombardıman sonrası toparlanmalarını dikkat çekici bir oranda arttırmıştır. Yalnızca bombardıman öncesinde ya da yalnızca bombardıman sonrasında yapılan uygulamalar etkili bir sonuç vermemiştir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 BİTKİ MATERYALİ

##### 3.1.1 Bitki Materyalinin Belirlenmesi, Temini ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılmış olan kendilenmiş mısır hatları, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü (STAE) tarafından geliştirilen ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737'dir. Serada ve kontrollü bitki büyütme kabinlerinde yapılan embriyo elde etme denemelerinin başarısız olması nedeniyle mısırlar Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü arazisinde yetiştirilmiş ve kontrollü tozlaşmaları sağlanmıştır. Kontrollü tozlaşma işlemi Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü'den Yüksek Ziraat Mühendisi Rahime CENGİZ ve Dr. Mehmet Cavit SEZER tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu hatlar, istenilen özellikleri homozigot hale getirmek ve bundan sonra hattın genetik değişmeye uğramaksızın devamını sağlamak amacıyla kendileme yoluyla elde edilmiştir. Mısır bitkileri gerekli toprak hazırlıkları yapıldıktan sonra, iki ayrı zamanda deneme yapabilmek için iki zamanlı olarak ekilmiştir. Gerekli bakım işlemleri yapılmış, yetiştirme periyodu süresince herhangi bir problemle karşılaşmamıştır.

Günümüzde tarımda kullanılan mısır çeşitleri, olgunlaşma gün sayılarına veya diğer bir ifadeyle erkencilik - geççilik durumlarına göre, FAO sisteminde 8 ayrı gruba ayrılmışlardır. Bunlar FAO-100 ile FAO-800 arasında yer almaktadır. FAO-100 grubunda yer alan çeşitler çok erkenci, genellikle 70-75 günde olgunlaşmasını tamamlarlar. FAO-800 grubunda yer alanlar ise, çok geççi, yaklaşık 140 günde olgunlaşmalarını tamamlarlar. Yine aynı şekilde, FAO-400 grubu orta erkenci, 100-105 günde olgunlaşan çeşitleri, FAO-600 grubu ise orta geççi, 115-125 günde olgunlaşan çeşitleri ifade eder (Babaoğlu, 2005). Kullanılan mısır hatlarının karakteristik özelliklerine ait veriler Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından sağlanmıştır.

ADK 310: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. FAO-600 olum grubundadır. Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 62 gün olup, bitki boyu 150 cm'dir. Sarı at dişi tane yapısındadır.

ADK 451: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. Genel kombinasyon yeteneği yüksektir. FAO-750 olum grubundadır. Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 75 gün olup, bitki boyu 220 cm'dir. Sarı at dişi tane yapısındadır.

ADK 455: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. Koyu yeşil ve çok sayıda yaprakları ile ön plana çıkmaktadır. FAO-750 olum grubundadır. Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 75 gün olup, bitki boyu 230 cm'dir. Sarı at dişi tane yapısındadır.

ADK 599: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. Koçanda sıra sayısı fazladır. FAO-700 olum grubundadır. Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 70 gün olup, bitki boyu 180 cm'dir. Sarı-sert gibi tane yapısındadır.

ADK 694: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. Polen verme süresi uzun ve polen verme kapasitesi yüksektir. FAO-700 olum grubundadır. Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 70 gün olup, bitki boyu 190 cm'dir. Sarı at dişi gibi tane yapısındadır.

ADK 737: Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nde yürütülen Marmara Bölgesi Mısır İslah Araştırmaları Projesi ile geliştirilmiştir. Pedigri seleksiyon metodu ile kendileme yapılarak elde edilmiştir. Enstitünün ıslah programında melez kombinasyonlarında kullanılmaktadır. Koçan verimi yüksek bir hattır. FAO-650 olum grubundadır Tepe püskülü çıkarma gün sayısı 68 gün olup, bitki boyu 180 cm'dir. Sarı at dişi tane yapısındadır.

Mısır bitkisi 350 – 400 metre mesafeye kadar polen tozlarını canlı olarak ulaştırabildiğinden, izolasyon mesafesi olarak bu değerler kabul edilmektedir. Ancak ıslah çalışmalarında pek çok hatla çalışıldığı için, izole sahaları bulmak daha zordur. Böyle durumlarda kendileme işlemini gerçekleştirebilmek için tepe ve koçan püsküllerine özel hazırlanmış kağıt torbalar bağlanarak el ile tozlaştırma yapılır. Çiçeklenme döneminde mısır koçan püskülleri çıkmadan önce, ışık geçiren özellikteki izolasyon kağıt torbalarıyla kapatılmıştır. Her bitkinin tepe püskülü, anterleri polen döktüğü zaman yine izolasyon torbasıyla kapatılmış ve polenlerin toplanması sağlanmıştır. Koçan püskülü 2 - 3 cm uzunluğa ulaştığında, tepe püskülüne takılı izolasyon torbası alınarak polen kontrolü gözle yapılmış ve aynı bitkideki koçanın üzerindeki izolasyon kağıdı hızla çekilerek üzerine kapatılmıştır. Bu işlem sırasında, kişiler bitkiden bitkiye geçerken ellerini alkole temizleyerek olası polen kontaminasyonunu engellemişlerdir. Hasada kadar koçan üzerindeki izolasyon kağıtları kalmıştır. Kontrollü tozlaşma çalışması Şekil 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'de aşama aşama gösterilmiştir. Tozlaşmadan 9 gün sonra koçanlarda oluşan taneler günlük olarak kontrole başlanmış, yeterli olgunluğa erişen mısır koçanları, çalışmada kullanılmak üzere hasat edilmiş ve aynı gün embriyolar çıkartılana kadar 4°C'de, karanlıkta muhafaza edilerek TÜBİTAK MAM GMBE Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarına getirilmiştir. Mevsimsel şartlara bağlı olarak embriyonun uygun büyüklüğe ulaşmasının 9-12 gün arası aldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1- Kendi poleniyle tozlaşdırılacak mısır hattında tepe püsküllerinden polen toplayıcı kağıt torbaların görüntüsü (Fotoğraf: Selma ONARICI).



Şekil 3.2- Mısır hattının tepe püsküllerinden polenlerin toplayıcı kağıt ile toplanması (Fotoğraf: Selma ONARICI).



Şekil 3.3- Tepe püskülünden toplanan polen ile bitkinin kendi koçanının tozlaşdırılması işlemi (Fotoğraf: Selma ONARICI).





Şekil 3.4- Tozlaşması gerçekleşmiş mısır koçanları gerekli olgunluğa ulaşana kadar başka bitkilerin polenleri ile enfekte olmamaları için kâğıt zarf ile kapatıldı (Fotoğraf: Selma ONARICI).

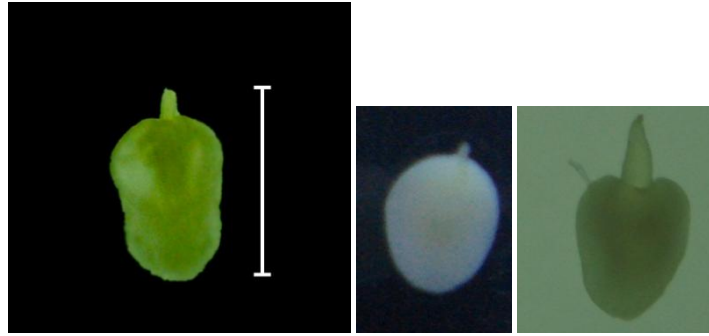
### 3.1.2 Partikül Bombardımanı İçin Olgunlaşmamış Embriyoların Çıkarılması ve Tip II Kallus Oluşumunun Başlatılması

Partikül bombardımanı çalışmalarında doğrudan olgunlaşmamış embriyolara ya da olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslara uygulama yapılmaktadır (Petrillo ve diğ., 2008; Wang ve Frame, 2009). Bu çalışmada olgunlaşmamış embriyolar ile birlikte olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen embriyonik kalluslar kullanılmıştır (Wang ve Frame, 2009; Wright ve diğ., 2001). Embriyonik kallus eldesi için öncelikle olgunlaşmamış embriyoların çıkartılması protokollerde tarif edilen yol ile yapılmıştır (IASTATE, 2005; Mark, 1999; Petrillo ve diğ., 2008; Wang ve Frame, 2009). Taneler steril bisturi yardımıyla zarar verilmeden koçanlarından ayrılmış ve ardından taneleri kaplayan zar dikkatlice ayrılmıştır (Şekil 3.5). Taneler 20 dakika süre ile %50 ticari çamaşır suyu ve %0,01 Tween 20 (Sigma) içeren çözeltide bekletilmiştir. Daha sonra otoklavlanmış distile su ile 3 defa 20'şer dakika boyunca yıkanarak çamaşır suyu uzaklaştırılmıştır. Tanelerin üst kısmı kesilip, endosperm ve embriyo ayrılmıştır. Embriyonun ölçeklendirilmiş bir fotoğrafı şekil 3.6' de gösterilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolar bisturinin ucu ile N6 (Chu ve diğ., 1975) besi ortamına, skultellumu (bombeli kısım) besi ortamına degecek şekilde yerleştirilmiştir. Petri başına en fazla 50 adet embriyo alınmıştır (Şekil 3.6). Bu embriyolar, içeriği Tablo 3.1 ve 3.2'de verilen N6E besi ortamında karanlıkta, 28°C'de, iki hafta inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun ilk haftasında kallus oluşumu başlamıştır. İki hafta sonunda kalluslar taze N6E besi ortamına alınmıştır ve bundan sonra 10 hafta boyunca alt kültürleme yapılmıştır. Embriyo bombardımanı için kullanılacak materyal karanlıkta, 28°C'de, uygulamadan önce 2-3 gün bekletilmiştir.





Şekil 3.5- Mısır tanelerinin hazırlanması (Fotoğraf: Deniz KÖM).



Şekil 3.6- Mısır embriyosu stereomikroskop görüntüleri, ölçek 2mm (Fotoğraf: Deniz KÖM).

### 3.2 BESİ ORTAMI VE DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARI

Mısır bitkisinin doku kültürü çalışmalarında MS (Murashige & Skoog, 1962) ve N6 (Chu et al., 1975) besi ortamları (Duchefa) kullanılmıştır. Besi ortamları hazırlanırken 900 ml distile su içerisinde çözünen toz halindeki minerallere besi ortamının amacına göre %3-6 arası değişen değerlerde sükröz eklendi. Toz halindeki minerallerin ve sükrözün çözünmesini takiben, kullanılan besi ortamına göre önceden belirlenmiş oranlarda miyo-inositol (Duchefa), kazein hidrolizat (Fluka), L-prolin (Sigma), mannitol (Sigma), dicamba (Duchefa) eklenerek çözümleri sağlandı. Tüm bileşenler çözüldükten sonra pH'ları 10N NaOH kullanılarak 5.8'e ayarlanmış ve çözelti 1 litreye tamamlanmıştır. Besi ortamlarında katılığı sağlamak için kullanılacak jelrit (Sigma), besi ortamlarının hazırlandığı solüsyona karıştırılmadan, otoklavlanmanın yapılacağı kuru şişelere konduktan sonra hazırlanan besi ortamı bileşenleri şişelere eklenmiştir. Besi ortamlarının içeriğinde bulunan ve otoklavda sıcaklık nedeniyle bozulabilecek vitaminler, herbisit, gümüş nitrat çözeltisi ve sorbitol çözeltisi önceden belirlenen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra 0.22 µm por açıklığı olan filtreler (Sartorius) ile steril edilmiştir. Bu solüsyonların stok çözeltileri cam şişelerde 4°C'de muhafaza edilmiştir. Sıcaklıkla bozulabilecek maddeler besi ortamları otoklavdan çıkarılıp 50°C'nin altına kadar soğuması beklendikten sonra ortama eklenmiştir.

Bu çalışma kapsamında 6 farklı hattın kullanıldığı denemeler yapılmıştır. Bu hatların kallus oluşturma yetenekleri genotipe bağılı olarak değişkenlik gösterdiğinden bu çalışma kapsamında içerikleri Tablo 3.1 ve 3.2’de verilen iki farklı besi ortamı kullanılmıştır.

Tablo 3.1- Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri.

İlk denemede kullanılan besi ortamları ve eklenen madde miktarları						
	N6E (Kallus oluşturma ortamı)	N6O (Ozmotik bombardıman ortamı)	N6S (Seçilim ortamı)	R1 (Rejenerasyon 1 ortamı)	R2 (Rejenerasyon 2 ortamı)	R3 (Rejenerasyon 3 ortamı)
<b>Otoklavdan önce eklenen maddeler</b>						
N6 tuzları	4 g/L	4 g/L	4 g/L	-	-	-
MS tuzları, Gamborg vitamini dahil	-	-	-	4.4 g/L	4.4 g/L	4.4 g/L
Sükroz	%3/L	%3/L	%3/L	%3/L	%6/L	%3/L
2,4-D	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	-	-
Miyo-inositol	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM
Kazein hidrolizat	0.1 g/L	-	-	-	-	-
L-prolin	0.25 mM	0.25 mM	-	-	-	-
Mannitol	-	0.4 M	-	-	-	-
Jelrit	2.5 g/L	2.5 g/L	2.5 g/L	3 g/L	3 g/L	2.5 g/L
<b>Otoklavdan sonra eklenen maddeler</b>						
N6 vitamini 1000x	1 ml	1 ml	1 ml	-	-	-
2,4-D	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L		
Gümüş nitrat çözeltisi	25 µM	25 µM	5 µM	-	-	-
Sorbitol	-	0.4 M	-	-	-	-
Bialafos	-	-	3 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	-

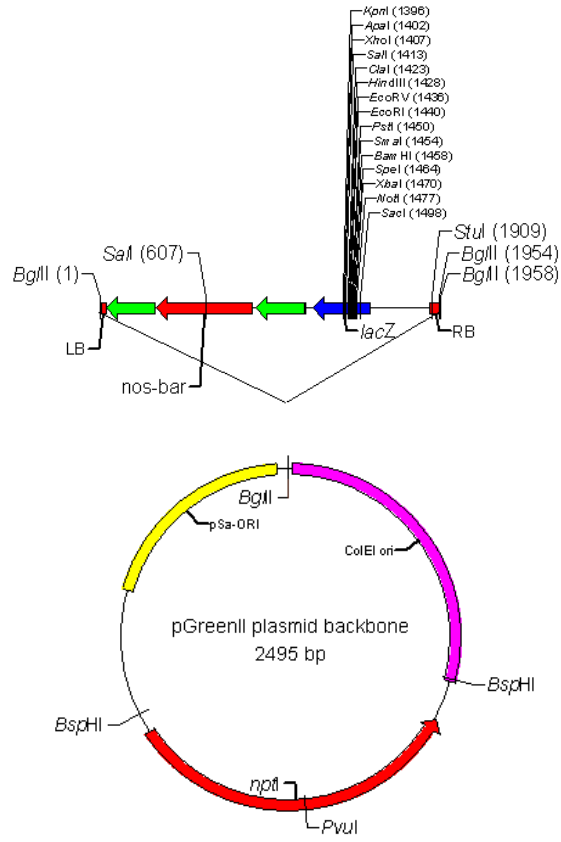
Tablo 3.2- Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri.

<b>Sonraki denemelerde kullanılan besi ortamları ve eklenen madde miktarları</b>						
	<b>N6E (Kallus oluşturma ortamı)</b>	<b>N6O (Ozmotik bombardıman ortamı)</b>	<b>N6S (Seçilim ortamı)</b>	<b>R1 (Rejenerasyon 1 ortamı)</b>	<b>R2 (Rejenerasyon 2 ortamı)</b>	<b>R3 (Rejenerasyon 3 ortamı)</b>
<b>Otoklavdan önce eklenen maddeler</b>						
N6 tuzları	4 g/L	4 g/L	4 g/L	-	-	-
MS tuzları, Gamborg vitamini dahil	-	-	-	4.4 g/L	4.4 g/L	4.4 g/L
Sükroz	%3/L	%3/L	%3/L	%3/L	%6/L	%3/L
Dicamba	15 mM	15 mM	15 mM	15 mM	-	-
Miyo-inositol	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM	0.55 mM
Kazein hidrolizat	0.1 g/L	-	-	-	-	-
L-prolin	0.25 mM	0.25 mM	-	-	-	-
Mannitol	-	0.4 M/L	-	-	-	-
Jelrit	2.5 g/L	2.5 g/L	2.5 g/L	3 g/L	3 g/L	2.5 g/L
<b>Otoklavdan sonra eklenen maddeler</b>						
N6 vitamini 1000x	1 ml	1 ml	1 ml	-	-	-
Gümüş nitrat çözeltisi	88 µM	88 µM	88 µM	-	-	-
Sorbitol	-	0.4 M/L	-	-	-	-
Bialafos	-	-	3 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	-

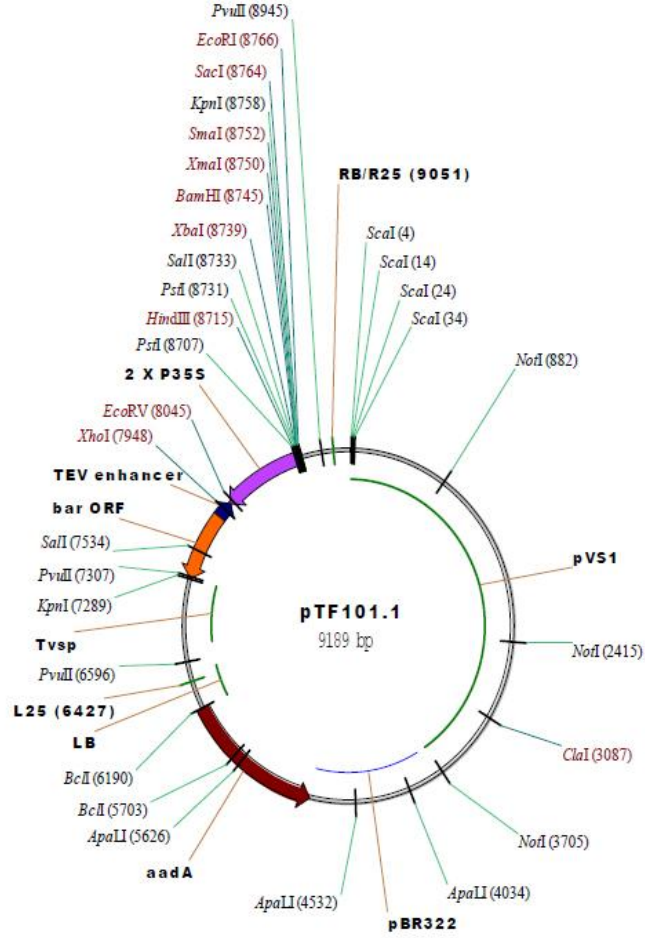
### 3.3 GEN AKTARIMINDA KULLANILAN PLAZMİTLER

#### 3.3.1 Plazmitlerin Tanıtılması

Mısır bitkisine transformasyon çalışmalarında iki farklı plazmit kullanılmıştır. pGreenII 0229 plazmiti (Şekil 3.7) (Pgreen) ile yapılan denemelerin ardından pTF101.1 plazmiti (Şekil 3.8) (IASTATE) ile denemeler yapılmıştır.



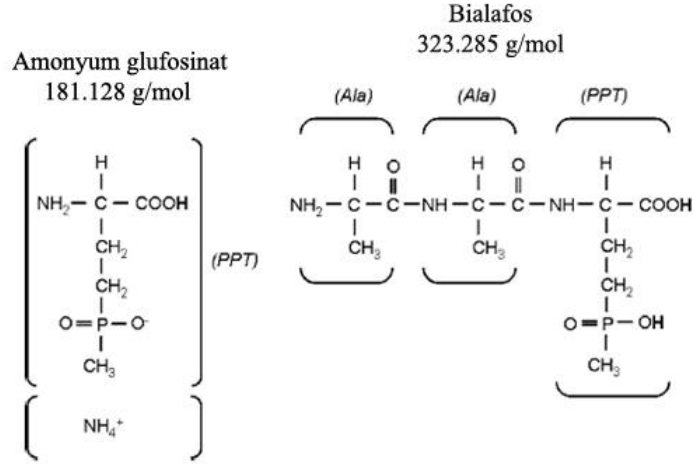
Şekil 3.7- pGreenII 0229 plazmit haritası



Şekil 3.8- pTF101.1 plazmit haritası

Her iki plazmit de seçim işleminde kullanılacak olan *bar* genini içermektedir. *Bar* geni orijinal olarak *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edilmiştir. Bu organizma metabolit olarak tripeptit bialafos üretir. Bialafos, fosfinötrisin (PPT) içerir. PPT, glutamatin bir analogudur ve glutamin sentetazın aktivitesini inhibe etmek suretiyle amonyumun detoksifiye edilmesini engelleyerek bitkinin azot metabolizmasını bozar. Glutamin sentetaz, bitkilerde amonyumu detoksifiye edebilen tek enzimdir. Glutamin sentetazın inhibasyonu hücrelerde toksik amonyum birikmesine neden olur ve bu da bitki hücrelerinin ölümünde rol oynar. Bu gen, mühendislik çalışmalarında herbisit dirençliliği sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Şekil 3.9' da kimyasal formülü verilen bialaphos, 2 tane L-alanin ve 1 tane fosfinötrisin'den oluşan bir tripeptiddir (Thompson ve diğ., 1987; Wang ve diğ., 2003).



Şekil 3.9- PPT ve Bialaphos'un kimyasal formüllerini gösterir tablo (Montague ve diğ., 2007).

Bialafos ve fosfinötrisin mısır seçimindeki etkinlikleriyle ilgili yapılan karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda (Dennehey ve diğ., 1994; Wang ve diğ., 2003) bialafosun daha düşük dozlarda etkin olduğu belirtilmiştir.

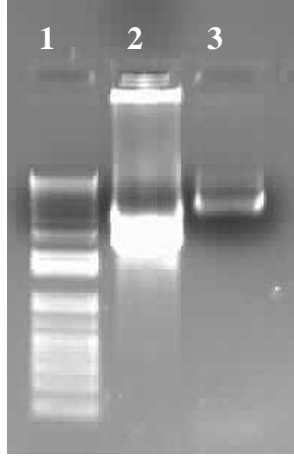
Çalışmalara ilk başladığı dönemde kimyasal ithal eden distribütör firmalardan bialafos temin edilemediğinden ilk denemeler fosfinötrisin ile yapılmıştır.

pGreenII 0229 plazmiti bakterilere kanamisin antibiyotiğine karşı dirençlilik sağlarken, pTF101.1 plazmiti spektinomisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençlilik sağlar. Bu dirençlilik özelliği sayesinde plazmitleri içeren bakteriler saf bir şekilde üretilebilir ve plazmitin yüksek miktarda kopyası elde edilir.

### 3.3.2 Plazmitlerin Gen Aktarımı Uygulaması İçin Eldesi

pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitleri *E. coli* DH5α suşunda %15 gliserol ve %85 LB ortamında -80°C'de stoklanmıştır. Stoklardan alınan bakteri numuneleri pGreenII 0229 için 100 mg/L kanamisin (Sigma) içeren LB (MERCK) ortamında, pTF101.1 için 100 mg/L spektinomisin (Sigma) ve 300 mg/L streptomisin (Sigma) karışımı içeren LB ortamında 16 saat boyunca, 37°C'de, dakikada 225 rpm hızla çalkalanarak olan üretilmiştir.

Bakterilerden plazmit izolasyonu için CompactPrep Plasmid Midi Kit (QIAGEN) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu kitin öngördüğü şekilde yapılmıştır. Kitle izolasyon tamamlandıktan sonra nanodrop kullanılarak miktar tayinleri yapılmıştır. Nanodrop ölçümlerinde pGreenII 0229 plazmitinin miktarı 900 ng/μl olarak ölçülürken, pTF101.1 plazmitinin miktarı 200 ng/μl olarak ölçülmüştür. Ancak nanodropun hata yapma ihtimaline karşı DNA'lar agaroz jel elektroforezi ile görsel olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10- pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitlerinin jelde görünümü. 1: 1Kb Plus ladder, 2: pGreenII 0029 plazmiti, 3: pTF101.1 plazmiti. Örneklerden 3'er μl yüklenmiştir.

### 3.4 PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE GEN AKTARIMI

#### 3.4.1 Partikül Bombardımanı Uygulaması Öncesi Altın Partiküllerinin Hazırlanması

Partikül bombardımanında kullanılacak altın partiküllerinin (Bio-Rad) uygulamada kullanılabilir hale getirilebilmesi için yıkama ve miktar ayarlama uygulamaları yapılmıştır. Partikül bombardımanı için Kan Wang ve Browyn Frame'in protokolü (Wang ve Frame, 2009) takip edilmiştir. Bombardımandan önce altın partikülleri hazırlanmış ve transformasyonda kullanılacak plazmit vektörle kaplanmıştır.



Altın partiküllerinin hazırlanmasında izlenen yollar madde madde aşağıda belirtilmiştir.

- 1- 0.6  $\mu\text{m}$  boyutundaki altın partiküllerinden 15 mg tartılıp steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Ölçülen bu miktar ile 10 tüplük stok hazırlanacaktır.
- 2- Steril laminar kabinde; 500  $\mu\text{l}$  absolut etanol (Sigma) eklendi. Bu karışım ultrasonikatör (Branson) kullanılarak, tüpün kapağı açık şekilde 15 saniye süre ile sonike edildi (Şekil 3.11). Ultrasonikasyon tamamlandıktan sonra tüpün kapağı kapatıldı ve karışımdaki tüm altın partiküllerinin tüpün dibine toplanması için yaklaşık 30 dakika beklendi.



Şekil 3.11- Ultrasonikatör ile altın partiküllerinin homojen olarak dağılması sağlandı (Fotoğraf: Deniz KÖM).

- 3- Tüp 1 dakika süre ile 3000 rpm hızla santrifüj yapıldı. Altın partiküllerine temas etmemeye özen gösterilerek süpernatant atıldı.
- 4- Dipte toplanan altın partiküllerine önceden buzda bekletilen ddH<sub>2</sub>O'dan 1ml eklendi ve dipteki altın partikülleri tamamen dağılana kadar parmakla vurarak çözüldü. Tüm çökelti dağıldıktan sonra tüp dik bir şekilde tüplükte bırakıldı ve tüm altın partiküllerinin kendiliğinden çökmesi beklendi.
- 5- 1 dakika süre ile 3000 rpm hızla santrifüj uygulandı. Altın partiküllerine temas etmemeye özen gösterilerek süpernatant atıldı.
- 6- Yıkama işlemi 2 defa daha tekrarlandı. Son uygulamada santrifüj işlemi 5000 rpm hızla 15 saniye uygulandı. Ve santrifüj tamamlandıktan dipte toplanan altın partikülleri 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O su ile çözüldü.
- 7- Altın ve su karışımını içeren tüp 15 saniye süre ile ultrasonikasyon işlemine tabi tutuldu. Ultrasonikasyon işleminin tamamlanmasının ardından hemen vortekse alınan tüp yüksek hızda çalkalanmaya devam ettirildi.
- 8- Tüplere paylaştırılma işlemi sırasında süspansiyonun buharlaşmaması için çok hızlı çalışılması gerektiğinden 1X yoğunluktaki altın partiküllerini içerecek tüpler önceden hazırlandı ve etiketlendi.
- 9- Paylaştırma işlemi sırasında partiküllerin çökmemesi ve eşit olarak dağılması için tüp sürekli olarak çalkalandı. Tüp karışmaya devam ederken soldan sağa olacak şekilde her bir tüpe 25  $\mu\text{l}$  çözelti eklendi. Kalan çözelti daha sonra eşitliği sağlamak adına sağdan sola her bir tüpe 25  $\mu\text{l}$  hacimde eklendi. İşlem tamamlandığında 10 adet 1X yoğunlukta altın – su karışımını içeren tüp elde edildi. Bu tüpler kullanım zamanı gelene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

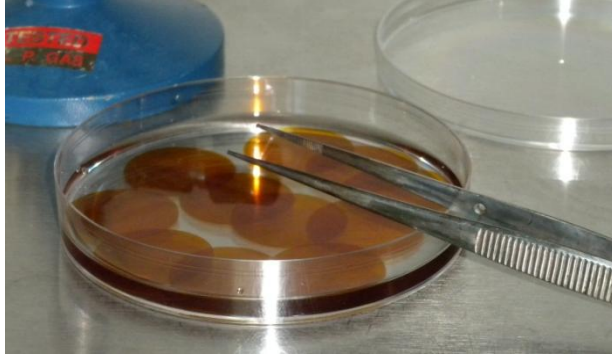
### 3.4.2 Altın Partiküllerinin DNA İle Kaplanması Ve Sistemin Uygulamaya Hazır Hale Getirilmesi

Partikül bombardımanı uygulamasından yaklaşık olarak 2 saat önce uygulamada kullanılacak altın partikülleri DNA ile kaplandı. 1 tüp için uygulanan protokol işlem aşağıda sıralandığı gibidir.

- 1- Önceden hazırlanıp  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilen 1X altın-su karışımına ultrasonikatör kullanılarak 15 saniye uygulama yapıldı.
- 2- Ultrasonikasyon işleminden sonra tüpe 9  $\mu\text{g}$  plazmit DNA eklendi ve parmakla vurularak iyice karışması sağlandı. Tüpün iyice karıştığından emin olduktan sonra tüpteki tüm damlacıkların dipte toplanması sağlandı.
- 3- Karışımın içine steril olarak hazırlanmış 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  (Sigma)'den 50  $\mu\text{l}$  eklendi ve nazikçe pipetaj yapıldı. Ardından tüp düşük hızda vorteks ile karıştırıldı.
- 4- Tüp en düşük hızda karışmaya devam ederken steril, 10  $\mu\text{l}$  0.1 M spermidin (Sigma) eklendi, tüp hemen tüplüğe alındı ve kapağı açık şekilde 30 saniye bekletildikten sonra tüpün kapağı kapatıldı, parmakla vurularak karıştırıldı ve vortekse alınarak 2 ya da 3. kademede 10 dakika boyunca karıştırılması sağlandı.
- 5- 10 dakikalık süre sonunda tüp standa alındı ve partiküllerin çökmesi için 5-10 dakika beklendi.
- 6- 5000 rpm hızla 15 dakika santrifüj uygulandı. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 7- Pelletin üzerine derin dondurucudan alınan absolut etanolden 250  $\mu\text{l}$  eklendi. Çökeltiyi dağıtmak için parmakla vurularak karıştırıldı.
- 8- Altının çökmesi için tüp stand üzerinde 5-10 dakika bekletildi ve ardından 5000 rpm hızla 15 saniye santrifüj uygulandı.
- 9- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 140  $\mu\text{l}$  absolut etanol ile çözüldü. Yükleme yapılana kadar en düşük hızda karışması sağlandı.

### 3.4.3 Partikül Bombardımanı Uygulamasında Cihazın ve Kullanılacak Materyallerin Sterilizasyonu

Partikül bombardımanı uygulaması yapılmadan 1 gece önce makro taşıyıcı filmler (macrocarrier) (Bio-rad) %70 etanol karışımında 10 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapıldı. Süre tamamlandıktan sonra bu filmler önceden steril edilmiş kurutma kağıtlarının üzerine serilerek steril kabinde gece boyu kurumaları sağlandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12- Makro taşıyıcı filmlerin %70 alkol ile sterilizasyonu (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Makro taşıyıcı tutucusu (macrocarrier holder) (Bio-rad) ve tutucu kısım (stopping screen) (Bio-rad) uygulamadan 1 gün önce otoklav ile 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika steril edildi ve 80°C'ye ayarlanmış etüvde gece boyu kurutuldu.

Kırılma diskleri (rupture disc) (Bio-rad) uygulama sırasında absolut izopropanole (Sigma) batırıldıktan sonra 1-2 dakika açık havada bekletilerek kurutuldu ve kullanıldı.

Partikül bombardımanı cihazının vakum kabini (vacuum chamber), hedef petri rafı (target shelf), kırılma diski tutucusu (rupture disc holder) uygulama öncesinde %70 etanol ile silinerek steril edildi.

Altın partikülleri DNA ile kaplandıktan sonra önceden steril edilmiş olan makro taşıyıcılar ve makro taşıyıcı tutucular hazırlandı. Makro taşıyıcı tutucuların içerisine yerleştirilen makro taşıyıcılar, içerisinde steril desikatör boncukları içeren steril petrilere yerleştirildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13- Makro taşıyıcıların ve makro taşıyıcı tutucuların hazırlanması (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Şekil 3.13'deki gibi hazırlanan makro taşıyıcıların açık tarafta bulunan bölgesinin ortasına plazmit DNA ile kaplanan altın partikülleri vortekste karışmaya devam ederken 10-12 µl hacminde eklendi ve kuruması beklendi.

### 3.4.4 Partikül Bombardımanı Uygulaması

Partikül bombardımanı uygulaması doğrudan olgunlaşmamış mısır embriyolarına ve olgunlaşmamış mısır embriyolarından üretilmiş tip II mısır kalluslarına yapıldı. Embriyo ve kallus bombardımanları için izlenen yol Mark, 1999; Oneto ve diğ., 2010; Vain ve diğ., 1993; Wang ve Frame, 2009 çalışmaları göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Embriyo ve kallus uygulamaları için ayrı protokoller izlendi. Protokolde adı geçen, cihaza ait tüm parçalar ve montaj yerlerinin grafiksel gösterimi Şekil 2.6' da verilmiştir.

Mısır bitkisine gen aktarım çalışmalarına başlamadan önce partikül bombardımanı cihazının etkinliğinden ve sistemdeki ekipmanların doğru çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla GUS (*Uda*) geni içeren pAHC25 plazmiti ile ön deneme yapılmıştır. pAHC25 plazmitinin haritası Şekil 3.14'de gösterilmiştir. Bu denemede stabil gen aktarımı beklenmemiş, sadece geçici gen ifadesine bakılmıştır. GUS gen aktarımının başarılı olduğu görüldükten sonra asıl aktarılmak istenen plazmit DNA'ları ile çalışmalara başlanmıştır.

GUS geni ile kontrol yapmanın prensibi, GUS tepkime çözültisinin içeriğinde yer alan bir madde olan 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronid'in (X-Gluc), geni içeren hücrelerde GUS geninin anlatımıyla ortaya çıkan  $\beta$ -glukuronidaz enzimi ile tepkimeye girerek mavi renk açığa çıkarmasıdır.

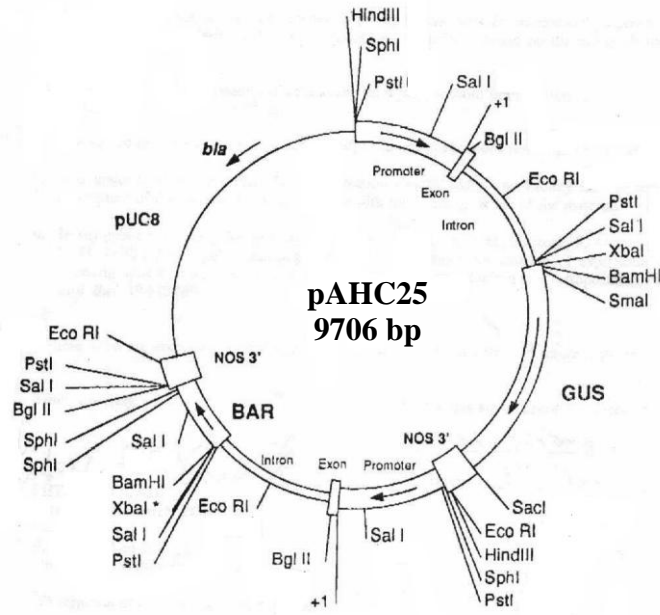
Tezde bahsedilen protokole uygun olarak hazırlanan ADK 310 hattına partikül bombardımanı yöntemi ile pACH25 plazmiti gönderilmiştir. Bombardımanın ardından kalluslar toparlanmaları için N6E ortamına alınmıştır. Uygulamadan 10 gün sonra plazmit gönderilen kalluslar X-Gluc solüsyonuna alındılar ve 37°C'de karanlıkta en az 10 saat bekletilen kalluslar 10 saatin sonunda %70 etanol ile yıkanmıştır.

X-Gluc solüsyonunun hazırlanışı (10 ml için):

- 1mM X-Gluc (Sigma), 1 ml DMSO (Sigma) içerisinde çözüldükten sonra fosfat tamponu ile 10 ml' ye tamamlandı.
- 200  $\mu$ l 10 mM EDTA eklendi.
- 10  $\mu$ l Triton x-100 (Sigma) eklendi.

Fosfat tamponunun hazırlanışı (50 ml):

- 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözültileri su ile hazırlandı. Her iki çözültinin de pH değeri 7.0' a ayarlandı.
- 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözültisinden 30.5 ml ve 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözültisinden 19.5 ml alınarak bir araya getirildi ve pH değeri yeniden 7.0' a ayarlandı.



Şekil 3.14- pAHC25 plazmitinin haritası (Christensen ve Quail, 1996).

#### 3.4.4.1 Tip II Kalluslara Yapılan Partikül Bombardımanı Uygulama Basamakları

1. Partikül bombardımanından 4 saat önce uygulamada kullanılacak kalluslar yaklaşık 2 aydır geliştikleri N6E besi ortamından N6O ozmotik besi ortamına alındılar. N6O besi ortamı, kalluslara uygulama sırasında gerekli ozmotik düzenlemeyi yapması için kullanılmıştır. N6O besi ortamının hazırlandığı petrinin orta bölgesinde yaklaşık 3 cm çapında bir daire çizildi ve mısır kallusları 4 - 5 mm boyutlara parçalanarak bu alanda hiç boşluk kalmayacak şekilde yerleştirildi.
2. Denemelerde kullanılan 650 ve 1100 psi kırılma diskleri, uygulama öncesinde absolut izopropanole batırılarak steril edildi ve kırılma diski tutucusuna yerleştirildikten sonra cihazdaki ilgili bölgeye bağlandı.
3. Uygulamadan önce hazırlanan ve plazmit DNA kaplı mikro taşıyıcılarla yüklenen makro taşıyıcı, makro taşıyıcı tutucu ve tutucu kısımlar %70 etanolle silinip steril edilmiş mikro taşıyıcı yükleme hattına yerleştirildi.
4. Mısır ile önceden yapılan denemeler (Frame ve diğ., 2000; IASTATE, 2005; Mark, 1999; Oneto ve diğ., 2010; Petrillo ve diğ., 2008; Vain ve diğ., 1993; Wang ve Frame, 2009; Wright ve diğ., 2001) ışığında 650 psi'lik kırılma diski için 6 cm, 1100 psi'lik kırılma diski için 9 cm hedef rafı uzaklığı belirlenmiş olup belirlenen değerlere göre ayarlanan hedef hücre rafının üzerine 4 saat

boyunca N6O besi ortamında tutulan kallusların bulunduğu petri yerleştirildi ve kabinin kapağı kapatıldı.

5. Vakum motoru çalıştırıldıktan sonra cihaz içi vakum 28 inç cıva değerine ayarlandı. Sistemin uygulamaya hazır hale getirilmiş görüntüsü Şekil 3.15’de verilmiştir. Vakum istenilen değerde sabitlendikten sonra cihazın ateşleme düğmesine basılarak kallusların plazmit DNA kaplı altın partikülleriyle vurulma işlemi gerçekleştirildi.
6. Patlama gerçekleştikten sonra ateşleme butonu bırakıldı. Vakum butonu “vent” konumuna getirilerek cihazın içerisindeki vakum değerinin normale gelmesi sağlandı. Bombardıman edilen kalluslar cihazdan alındı ve 28°C’de, karanlık inkübatöre alındı. Kırılma diskisi, DNA yüklü mikro taşıyıcılarla yüklenmiş makro taşıyıcılar ve tutucu kısmı değiştirmek ve cihazın içini %70 etanolle silmek suretiyle cihaz yeni bir uygulamaya hazır hale getirildi.
7. Her bir uygulama için 2 – 6 adımlar tekrarlandı.
8. Bombardıman edilmiş kalluslar 28°C’de, karanlıkta, N6O ortamında bekletildikten sonra N6E ortamına aktarıldılar. Bu aşamada N6O besi ortamında bekleme süresini optimize edebilmek için 1, 4 ve 20 saatlik bekleme süreleri denendi.

Partikül bombardımanı uygulaması tamamlandıktan sonra güvenlik kuralları doğrultusunda helyum tüpünün vanası kapatıldıktan sonra cihaza boş atışlar yaptırılarak sistemde biriken gaz uzaklaştırıldı.



Şekil 3.15- Uygulamaya hazır halde bir partikül bombardımanı sistemi (Fotoğraf: Deniz KÖM)

#### 3.4.4.1 Olgunlaşmamış embriyolara Partikül Bombardımanı Uygulama Basamakları

Mısırlardan çıkartılan embriyolar uygulamadan önce 2 – 3 gün süre ile N6E besi ortamında 28°C’de, karanlıkta tutularak kallus oluşturma yetenekleri uyarıldı.

1. Partikül bombardımanından 4 saat önce uygulamada kullanılacak embriyolar N6E ortamından N6O ozmotik besi ortamına alındılar. N6O besi ortamının hazırlandığı petrinin orta bölgesinde yaklaşık 3 cm. çapında bir daire çizildi ve mısır embriyoları bu alana hiç boşluk kalmayacak şekilde yerleştirildi.
2. Denemelerde kullanılan 650 ve 1100 psi kırılma diskleri, uygulama öncesinde absolut izopropanole batırılarak steril edildi ve kırılma diski tutucusuna yerleştirildikten sonra cihazdaki ilgili bölgeye bağlandı.
3. Uygulamadan önce hazırlanan ve DNA kaplı mikro taşıyıcılarla yüklenen makro taşıyıcı, makro taşıyıcı tutucu ve tutucu kısımlar, %70 etanolle silinip steril edilmiş mikro taşıyıcı yükleme hattına yerleştirildi.
4. Mısır ile önceden yapılan denemeler ışığında 1100 psi’lik kırılma diski için 9 cm hedef rafı uzaklığı belirlenmiş olup belirlenen değere göre ayarlanan hedef hücre rafının üzerine 4 saat boyunca N6O besi ortamında bulunan embriyolar yerleştirildi ve kabinin kapağı kapatıldı.
5. Vakum motoru çalıştırdıktan sonra cihaz içi vakum 28 inç cıva değerine ayarlandı. Vakum istenilen değerde sabitlendikten sonra cihazın ateşleme düğmesine basılarak plazmit DNA kaplı partiküller embriyolara gönderildi.
6. Patlama gerçekleştikten sonra ateşleme butonu bırakıldı. Vakum butonu “vent” konumuna getirilerek cihazın içerisindeki vakum değerinin normale gelmesi sağlandı. Bombardıman edilen embriyolar cihazdan alındı ve derhal 28°C’de, karanlık inkübatöre alındı. Kırılma diski, DNA yüklü mikro taşıyıcılarla yüklenmiş makro taşıyıcılar ve tutucu kısmı değiştirmek ve cihazın içini %70 etanolle silmek suretiyle cihaz yeni bir uygulamaya hazır hale getirildi.
7. Her bir uygulama için 2 – 6 adımları tekrarlandı.
8. Bombardıman edilmiş embriyolar 28°C’de, karanlıkta, N6O besi ortamında 16-20 saat daha bekletildikten sonra N6E ortamına aktarıldılar.

Partikül bombardımanı uygulaması tamamlandıktan sonra güvenlik kuralları doğrultusunda helyum tüpünün vanası kapatıldıktan sonra cihaza boş atışlar yaptırılarak sistemde biriken gaz uzaklaştırıldı.

### 3.4.5 Partikül Bombardımanı Uygulaması Sonrası Seçilim Süreci

Bombardımandan sonra 7 -10 gün süre ile N6E besi ortamında bekleyen embriyo ve kalluslar seçilim sürecinin başlatılması için ilk denemede fosfonötrisin herbisiti, ikinci denemede ise bialafos herbisiti içeren N6S besi ortamına aktarıldılar. Aktarım yapılırken dokular arasında 0.5 cm ve 1 cm aralıklar denendi. Seçilim süresince dokular 28°C'de ve karanlıkta inkübe edildiler. Petri ler seleksiyon süresince parafilm ile sarıldı. Her 2 haftada bir tüm kalluslar taze hazırlanmış N6S ortamına aktarıldı. Seçilim süreci tüm denemelerde ortalama 8 hafta olarak belirlendi.

### 3.4.6 Partikül Bombardımanında Seçilim Sonrası Rejenerasyon Süreci

Partikül bombardımanı uygulaması yapılan mısır dokularının ortalama 8 haftalık seçilim süreci tamamlandıktan sonra 3 aşamalı rejenerasyon sürecine başlandı. Rejenerasyon sürecinin, gümüş nitrati ortamdan uzaklaştırmayı hedefleyen ilk aşaması R1 rejenerasyon ortamında gerçekleştirildi. Herbisitli ortamda 8 hafta geçirdikten sonra sağlıklı şekilde büyümeye devam eden mısır kallusları R1 ortamına alındı. R1 ortamında gelişim süreci 100 mm X 20 mm ölçülerinde, steril petri lerde gerçekleştirildi. R1 ortamına alınan kalluslar 2 hafta süre ile 25°C'de ve karanlıkta inkübe edildiler.

Seçilim süreci boyunca hiç gelişim gösteremeyen bazı hatların embriyoları rejenerasyona alınmadı.

Rejenerasyon sürecinin somatik embriyo oluşumu ve seçilimdeki olası kaçakları engellemeyi hedefleyen, doku kültürünün son kez herbisit içeren 2. rejenerasyon aşaması, R2 rejenerasyon ortamında gerçekleştirildi. R1 rejenerasyon ortamında 2 haftalarını dolduran mısır kallusları rejenerasyonlarının uyarılacağı R2 rejenerasyon ortamına aktarıldılar. R2 rejenerasyon ortamına alınan kalluslar, somatik embriyo oluşturana kadar 2 - 3 hafta süre ile 25°C'de ve karanlıkta inkübe edildiler.

R2 rejenerasyon ortamındaki inkübasyonu tamamlanan ve somatik embriyolarını oluşturan mısır kallusları rejenerasyonun son basamağı olan fide oluşturma aşamasını gerçekleştirecekleri R3 ortamı içeren, yüksekliği fazla olan kültür kaplarına aktarıldılar. R3 rejenerasyon ortamında 25°C'de 16 saat gündüz, 8 saat gece fotoperiyotta fide oluşturana kadar bekletildiler.

R3 rejenerasyon ortamında geliştirilen mısır fideleri, açık alana adaptasyonlarının sağlanması amacıyla 27°C gündüz ve 21°C gece sıcaklığı, 16:8 fotoperiyot ve %60 nemin sağlandığı bitki büyütme kabinlerinde iyi havalandırılmış, otoklavlanmış torf içeren saksılara aktarıldı. Genç fidelerin gelişimlerinin nem farkından zarar görmemesi ve toprağa adaptasyonun başarısını arttırmak için aktarımdan sonraki ilk 5 gün saksı, üzerine delikler açılmış şeffaf poşetlerle kapatılarak sera etkisi oluşturulmuştur. Toprağa uyum sağlayan fideler daha sonra 1:1 oranında torf ve toprak karışımı içeren saksılara



alınmıştır. Fidelerin geliştiği toprak sürekli olarak nemli tutulmuştur. Mısır fideleri gelişmeye devam ettikçe kullanılan saksılar kademeli olarak büyütülmüştür ve haftada 1 defa %100 konsantrasyonda Hoagland besi çözeltisi ile sulanmıştır (Manfred, 2002). Mısır fideleri yeterli erişkinliğe ulaştıktan sonra ileri analizlerin yapılması (bu tez çalışmasında yer almamaktadır) ve tohum elde edilecek transgenik hatların belirlenmesi amacıyla yaprak numuneleri alınıp  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanmıştır.

### **3.5 BİTKİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) KONTROLLERİ**

#### **3.5.1 Doku Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu**

Gelişen bitkilerden numuneler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Her bir tüpün içerisine önceden otoklavlanarak steril edilmiş ve buzda soğutulmuş bilyelerden 1 adet koyulmuştur. Tüpler sıvı azotta dondurulduktan sonra Retsch MM301 Tissue Lyser kullanılarak, saniyede 30 defa hızla, 1 dakika boyunca uygulama yapılarak doku toz haline getirildi ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar sıvı azotta muhafaza edildi.

Mısır bitkisinden daha önce yapılan DNA izolasyon denemelerinde ortaya çıkan fenolik madde kirliliği nedeniyle aşağıda yazılan yöntem optimize edilmiş ve kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan tamponlar izolasyondan önce taze olarak hazırlanmıştır.

DNA izolasyon metodu:

1. İzolasyon tamponu  $65^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmıştır. Isıtıldıktan sonra kullanılacak kadarı bir cam şişeye alınmış ve kullanmadan önce üzerine her 10 ml tampon için 0,038 g  $\text{NaHSO}_3$  (Sigma) ve 20 $\mu\text{l}$  2-merkaptöetanol (Sigma) eklenmiştir. Tampon  $65^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmeye devam edilmiştir.
2. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne toz haline getirilen dokudan 0.4 gram tartılarak koyulmuş ve üzerine 750  $\mu\text{l}$  izolasyon tamponu eklenmiştir. Tüp vorteks ile karıştırılarak içeriği homojen hale getirilmiştir. Tüp  $65^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat bekletilmiş ve her 15 dakikada bir vorteks ile karıştırılmıştır.
3. 1 saatlik inkübasyon süresi tamamlanınca tüpe 300  $\mu\text{l}$  5M KOAc (Sigma) eklenmiştir. Tüp yavaşça ters düz edilerek karıştırılmış ve buz içerisinde 30 dakika bekletilmiştir.
4. Süre dolunca tüp 13000 rpm hızla,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 1:1 oranında -20°C'ye soğutulmuş izopropanol (Sigma) yavaşça, tüpteki sıvıların faz oluşturmasına müsaade edecek şekilde eklenmiştir. Alkol eklendikten sonra tüp 1 saat boyunca -20°C'de hiç hareket ettirilmeden bekletilmiştir.
6. Temiz bir tüpe 1 ml saflaştırma tamponu eklenmiş ve 4°C'ye soğutulmuştur.
7. 1 saat boyunca -20°C'de bekletilen örneklerin üst kısmında toplanan DNA bir pipet ucu ya da öze yardımıyla alınarak saflaştırma tamponunun olduğu tüpe aktarılmış ve gece boyu 4°C'de bekletilmiştir.
8. Saflaştırma tamponu pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra DNA oda sıcaklığına kurumaya bırakılmıştır.
9. Kuruyan DNA 300 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra üzerine 20 ünite RNaz (Sigma) eklenmiş ve 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra 60°C'de 10 dakika bekletilerek RNaz inaktive edilmiştir.
10. Tüpe 1:1 oranında fenol (Sigma) : kloroform (Sigma) eklenmiştir. Tüp birkaç defa ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 13000 rpm hızda, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Üst faz dikkatlice yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 2.5 katı olacak miktarda -20°C'ye soğutulmuş absolut etanol eklenmiştir. Tüp birkaç defa ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 13000 rpm hızda, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Tüpteki sıvı fazın tamamı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 ml, -20°C'ye soğutulmuş %70 etanol ile yıkanmıştır. Tüp 13000 rpm hızda, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra tüp içerisindeki DNA hava ile kurumaya bırakılmış ve tamamen kuruduktan sonra ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür.
14. Nanodrop cihazı kullanılarak miktar okumaları yapılmıştır.

Kullanılan tampon çözeltiler:

1. İzolasyon Tamponu : 100 ml 1M Tris (Sigma), pH 8.0, 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma) pH 8.0, 100 ml 5M NaCl (Sigma), 62.5 ml %20 SDS (Sigma) (a/h), distile su ile 1 Lt ye tamamlanmalıdır.
2. Saflaştırma Tamponu: 9,5 ml 3M NaOAc (Sigma), 49 ml absolut EtOH (Sigma), 36.5 ml otoklavlanmış distile su eklenmelidir.

İyi kalitede DNA izole edebilmek için Cornell DNA izolasyon yönteminin yanısıra Qiagen plant DNA izolasyon kiti ve i-genomic plant DNA extraction mini kiti de denenmiştir.

### 3.5.2 Örneklerle PZR uygulanması

Gen aktarımı denemelerinde kullanılan pGreenII 0229 plazmitinin varlığını teyit edebilmek için *bar* genine özgü primerler, pTF101.1 plazmitinin varlığını teyit edebilmek için ise 35S promotör bölgesine özgü primerler kullanılmıştır. *Bar* genine ve 35S promotörüne özgü primer dizileri aşağıda verilmiştir. PZR kontrolü için kullanılan primer dizileri ve ürün bilgileri aşağıdaki gibidir.

Bar Fw: 5'-TGCACCATCGTCAACCACTA -3'

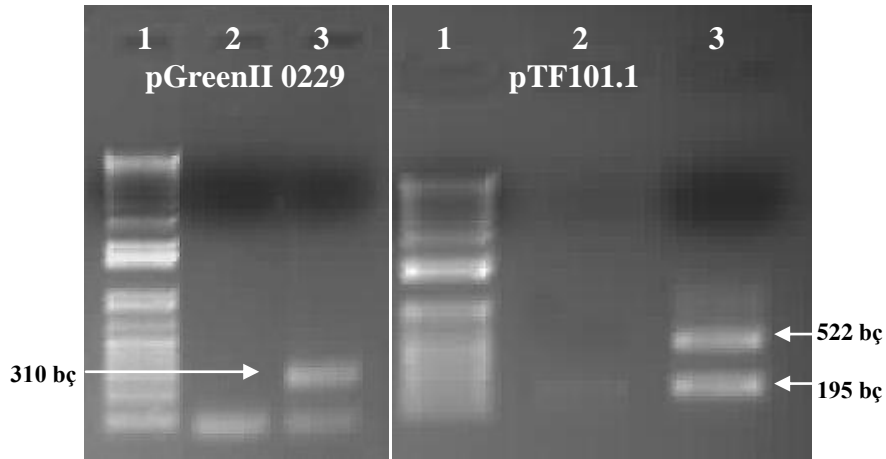
Bar Rv: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGAA -3'

Bu primer ile pGreenII 0229 plazmitinde üretilen amplifikasyon ürününün büyüklüğü 310 bç olmalıdır.

35S Fw: 5'- GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'

35S Rv: 5'- GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'

Bu primer ile pTF101.1 plazmitinde 195 bç ve 522 bç'lik iki bant üretilmektedir. Bunun nedeni pTF101.1 plazmitinde ardı ardına iki 35S promotörü bulunmasıdır. pGreenII 0229 plazmitine *bar* geni primerleri, pTF101.1 plazmitine 35S promotörü primerleri ile PZR uygulanmış ve elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.16- pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitlerine uygulanan PZR sonucunun jel görüntüsü. pGreenII 0229 için 1: 1 Kb Plus ladder, 2: *bar* negatif kontrol, 3: pGreenII 0229 plazmitinin *bar* geni primerleri ile uygulanan PZR sonucu. pTF101.1 için 1: 1 Kb Plus ladder, 2: 35S negatif kontrol, 3: pTF101.1 plazmitinin 35S promotörü primerleri ile uygulanan PZR sonucu.

DNA izolasyonundan sonra elde edilen örnekler PZR uygulamasında kullanılmak üzere 50 ng/μl yoğunlukta olacak şekilde sulandırılmıştır. PZR uygulamasında INTRON marka PZR kiti kullanılmıştır. Kit 10X PZR tamponunu, MgCl<sub>2</sub> çözeltisini, ddNTP çözeltisini, Taq polimeraz enzimini ihtiva etmektedir. PZR uygulamaları için kitin içeriğinde belirtilen metot değiştirilerek kullanılmıştır.

1 tüp için hazırlanan PZR karışımı ve PZR döngüleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de belirtilmiştir.

Tablo 3.3- PZR karışımı.

ddH <sub>2</sub> O	
10X PCR Tamponu	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub> çözeltisi	1.5 mM
10 mM ddNTP çözeltisi	0.4 mM
5 pmol Primer Fw-Rw karışımı	10 pmol
5 ünite/μl Taq DNA Polimeraz	0.5 ünite
DNA 50ng/ul	50 ng

Tablo 3.4- PZR döngüleri.

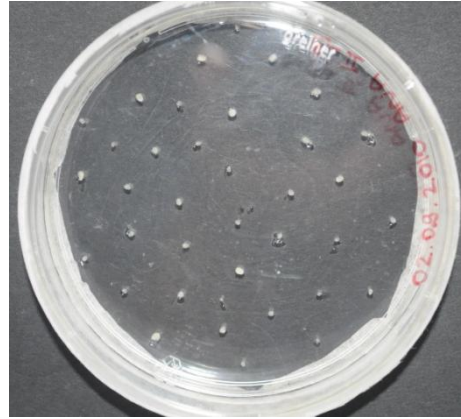
95 °C	→	3 dk	
93 °C	→	45 sn	} 35 tekrar
54 °C	→	45 sn	
72 °C	→	1 dk	
72 °C	→	10 dk	

## 4. BULGULAR

### 4.1 DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

#### 4.1.1. Embriyo Çıkarılması

Mısır bitkisinin doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarında, embriyonun gelişim dönemi kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle embriyolar literatürde tavsiye edildiği üzere 2-3 mm'lik boyuta ulaştığında GMBE laboratuvarında steril koşullar altında ve karanlıkta çıkarılmıştır. Koçanlar bitkiden ayrılmış olsa bile taneler içinde embriyolar gelişmeye devam etmektedir. Bu nedenle koçanlar koparıldıktan en fazla iki gün içerisinde embriyo çıkarma işlemi tamamlanmıştır. Monokotil bir bitki olan mısırdaki gen aktarım frekansı oldukça düşük olduğundan başarı şansını artırabilmek için her hattan yaklaşık 2000 embriyo çıkarılmıştır. Doğrudan partikül bombardımanında kullanılacak embriyolar N6E besi ortamına alınarak 2-3 gün 28°C ve karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Tip II kallus oluşturulacak embriyolar ise aynı besi ortamına ve inkübasyon koşullarına alınarak muhafaza edilmişlerdir. N6E besi ortamına alınan embriyoların görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1- Kallus oluşturma ortamına alınan mısır embriyoları (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).

#### 4.1.2 Kullanılan Hatların Doku Kültürü ve Tip II Kallus Üretimini Etkileyen Faktörler

Yapılan çalışmada doku kültürü ve tip II kallus oluşturma kapasitesini etkileyen başlıca faktörler besi ortamı içeriği, kalluslar arası mesafe, petri başına örnek sayısı ve kullanılan mısır genotipi olmuştur.

#### 4.1.2.1 Besi Ortamları

Daha önceden de belirtildiği üzere Türkiye’de geliştirilen yerel mısır hatlarının kullanıldığı gen aktarım çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle kullanılacak olan hatların bu tip çalışmalara uygunluğu konusunda bilgi bulunmamaktadır. Çalışmada bu durum göz önüne alınarak önce Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından geliştirilen ve Akdeniz Bölgesinde ikinci ürün olma kapasitesi yüksek olan ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatları kullanılmıştır. Genotipe bağlı olarak kallus gelişim hızları değiştiğinden farklı genotiplerde farklı besi ortamları kullanılmıştır. İlk denemelerde kullanılan ADK 310 ve ADK 455 hatlarında Tablo 3.1’de verilen besi ortamı içeriği kullanılmıştır. ADK 451, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatlarında ise Tablo 3.2’de verilen besi ortamı içerikleri kullanılmıştır. Bu iki besi ortamı arasındaki temel farklılık gümüş nitrat konsantrasyonları ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D yerine dicamba kullanılmasıdır. Yapılan ilk denemelerde bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D (2 mg/L) ve 25 µM gümüş nitrat, sonraki denemelerde 15 mM dicamba ve 88 µM gümüş nitrat kullanılmıştır. Dicamba ve 88 µM gümüş nitrat kullanılan besi ortamlarında oluşturulan kalluslarda kararmanın önemli oranda azaldığı ve çoğu örnekte ortadan kalktığı görülüp, kallusların bölünme hızlarının ve kalitelerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Besi ortamı içeriğinde yer alan gümüş, etilenin aktivitesini azaltarak embriyonun olgunlaşmasını engellemektedir. Böylece tip II kallus oluşumunu dikkat çekici şekilde arttırmaktadır.

#### 4.1.2.2 Kalluslar Arası Mesafe ve Petri Başına Örnek Sayısı

Mısır bitkisinin doku kültürü süresince kalluslar arasında 0.5 cm ve 1 cm mesafeler bırakılarak denemeler yapılmıştır. 0.5 cm mesafe bırakılan denemelerde petri başına düşen örnek sayısı kallusların büyüklüğüne bağlı olarak 25 ile 40 arasında değişmiştir. 1 cm mesafe bırakılan numunelerde petri başına düşen örnek sayısı kallusların büyüklüğüne bağlı olarak 12 ile 20 arası olmuştur. Yapılan doku kültürü çalışmaları sonucunda kalluslar arasında 0.5 cm mesafe bırakılan petrielerde büyümenin ve gelişmenin yavaşladığı, birbirine değmeye başlayan kallusların hızla kahverengileşip ölüme gittiği görülürken, 1 cm mesafe bırakılan kalluslarda gelişimin hızla devam ettiği görülmüştür. Mısır doku kültüründe kalluslar arası en uygun mesafe 1 cm, petri başına kallus sayısı da 12 ve 20 arası olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.2.3 Mısır Genotipi

Bu çalışmada mısır bitkisinin (*Zea mays* L.) Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından geliştirilen ve ikinci ürün potansiyeli yüksek olan ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 olmak üzere 6 farklı hattı kullanılmıştır. Çalışmanın amaçlarından birisi doku kültürüne en uygun mısır hattını belirlemek olduğu için hatlar kallus oluşturma yetenekleri, tip II kallus oluşturma yetenekleri, bu kallusların gen aktarımı açısından uygunlukları ve rejenerasyon yetenekleri bakımından

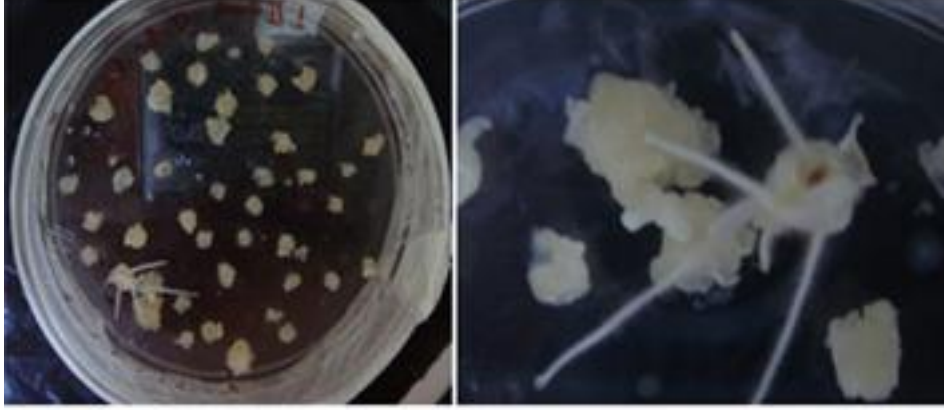
değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada en kritik aşama uygun mısır hattının belirlenmesidir. Çünkü seçilen mısır hattı gen aktarım çalışmalarının başarısı açısından birinci derecede önem taşımaktadır. Bazı mısır hatları gen aktarımına uygun iken bazıları yapılan tüm modifikasyonlara rağmen gen aktarım çalışmalarına yanıt vermemektedir. Dünya çapında mısır gen aktarım çalışmaları yapılan laboratuvarlarda genellikle hep aynı mısır hatları gen aktarımı için kullanılmakta, istenilen diğer özellikler geri çaprazlama çalışmaları ile yeni geliştirilen çeşide aktarılmaktadır. Örneğin B73, A188 hatları en çok tercih edilen hatlardır (Du ve diğ., 2010; Frame ve diğ., 2002; Gordonkamm ve diğ., 1990; Sidorov ve diğ., 2006; Vega ve diğ., 2008; Wang ve Frame, 2009). Ülkemizde bu konuda daha önce yapılmış çalışma bulunmadığından hangi mısır hatlarının gen aktarımı için uygun olduğu henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada birden fazla mısır hattı denemelere alınmıştır.

#### 4.1.3 Embriyonik Kallus Oluşturma Yetenekleri

İlk olarak mısır tanelerinden çıkartılan olgunlaşmamış embriyoların kallus oluşturma yetenekleri değerlendirilmiştir. Denemelerde kullanılan bütün hatlarda embriyoların tamamına yakını kallus oluşturmuştur. Kontaminasyon sorunu yaşanmadığı sürece kullanılan embriyoların hepsi kısa süre içinde kallus oluşturmaya başlamış ve hacimleri 3-4 katına çıkmıştır. Kallus oluşturma yeteneği ve hızında en belirleyici faktörün embriyo büyüklüğü olduğu görülmüştür. Embriyonun erken dönemleri kallus geliştirme yeteneklerinin en yüksek olduğu dönem olmuştur. Çalışmalarımızda, tozlaşmadan sonraki 9.-15. günler arası toplanan embriyolar kullanılmıştır. İklimsel faktörler etkili olsa da genellikle tozlaşmadan sonraki 12. günde elde edilen embriyoların kallus oluşturma kabiliyetlerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Hiçbir hat diğerine açıkça üstünlük sağlamamıştır. Gelişim dönemi uygun olmayan ya da besi ortamına skultellum bölgesi yukarı gelecek şekilde yerleştirilmiş olan embriyolar organogenez aşamasına geçmiş ve tip II kallus oluşturamamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2- Embriyodan ilk gelişen kalluslar (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).



Şekil 4.3- Organogenez aşamasına geçen kallus görüntüsü (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).

Yukarıda da bahsedildiği gibi kullanılan 6 hatta da olgunlaşmamış embriyolar hiç sorunsuz kallus oluşturmuşlardır. Ancak tamamen hatta bağlı olarak, değişik besi ortamlarında değişen gelişim hızları göstermişlerdir. Başlangıçta çok hızlı bir şekilde kallus geliştiren hatların daha sonraki dönemlerde gelişim hızlarının yavaşlayabildiği ya da daha da hızlanabildiği görülmüştür. Bu nedenle bu hatların partikül bombardımanı ile gen aktarımına uygunluğunu anlayabilmek için rejenerasyon aşamasına kadar gidilmesi gerekmektedir.

#### 4.1.3.1 Tip II Ebriyonik Kallus Oluşturma Yetenekleri

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından uygun görülen ADK 310 ve ADK 455 hattı denemelere alınmıştır. Her iki hat için aynı besi ortamı ve inkübasyon koşulları kullanılmış olmasına rağmen farklı morfolojide tip II kalluslar oluşturmuşlardır.

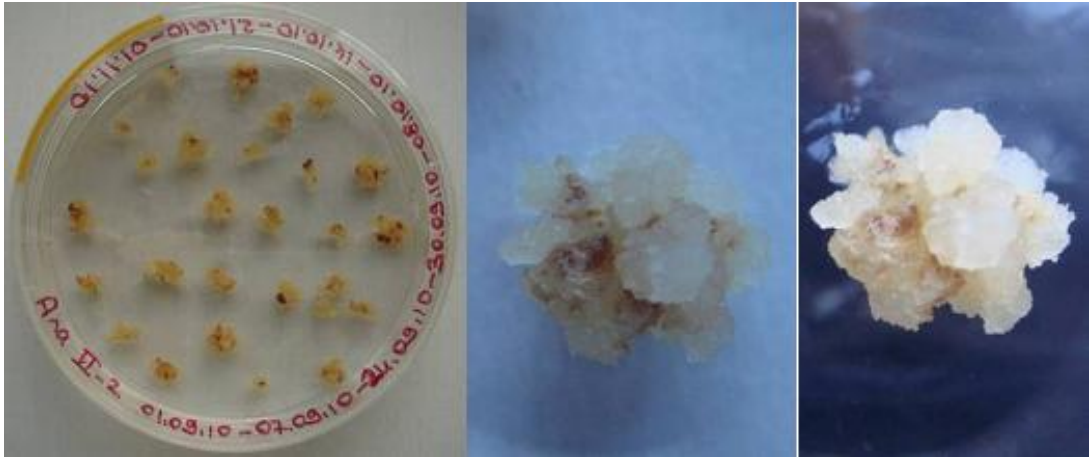
ADK 310 hattı N6E besi ortamındaki 6. haftasından itibaren tip II kallus oluşumuna başlamış ve partikül bombardımanı aşamasına kadar beyaz renkli kalluslar oluşturmaya devam etmiştir (Şekil 4.4).





Şekil 4.4- ADK 310 hattına ait tip II kalluslar (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).

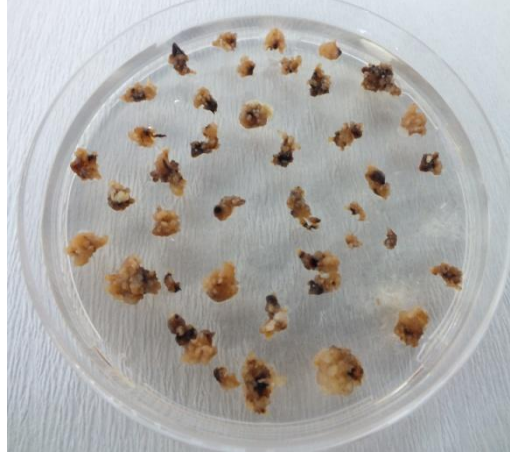
ADK 455 hattına ait embriyoların kallus geliştirme hızları başlangıçta iyi iken sonra yavaşlamıştır. Daha sonra tekrar gelişim hızı artmış ve 8. haftadan itibaren tip II kallus oluşturmaya başlamıştır (Şekil 4.5). Ancak tip II formunu muhafaza edemeyerek hızla embriyonik olma özelliğini yitirmeye başlamıştır.



Şekil 4.5- ADK 455 hattına ait tip II kalluslar (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).

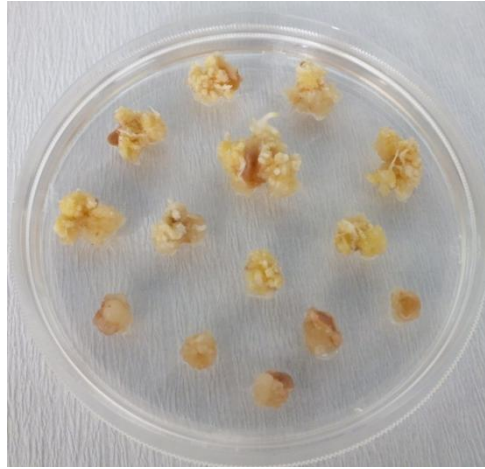
Çalışmanın ikinci aşamasında Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından uygun bulunan ADK 451, ADK 599, ADK 694, ADK 737 hatları denemeye alınmıştır. Her dört hat için de aynı besi ortamları kullanılmasına ve inkübasyon şartları sağlanmasına karşın tip II kallus oluşturma zamanlarında ve tip II kallus morfolojilerinde farklılıklar görülmüştür.

ADK 451 hattında embriyoların kallus geliştirme hızı başlangıçta iyi iken zamanla yavaşlamıştır. Tip II kallus oluşumunun 10. haftadan itibaren başladığı gözlenmiştir. İlerleyen dönemlerde tip II formuna geçebilen ve bu formu koruyabilen kallus sayısı başlangıca kıyasla oldukça azdır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6- ADK 451 hattına ait kallusların büyük kısmı tip II formuna geçirilemeden kaybedilmiştir (Fotoğraf: Deniz KÖM).

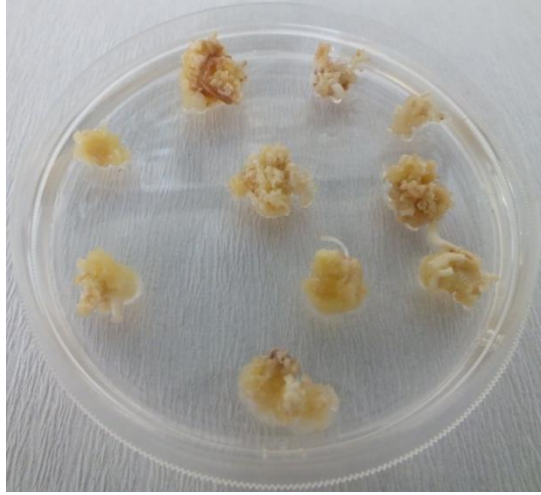
ADK 599 hattında embriyolar oldukça hızlı bir şekilde kallus geliştirmiş ve sonraki dönemlerde de hiç yavaşlama gözlenmemiştir. Tip II kallus oluşumunun başlaması 7. haftadan itibaren gözlenmiş olup, partikül bombardımanı uygulaması yapılana kadar büyüme hızında ve kalitesinde bir kayıp olmadan gelişmeye devam etmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7- ADK 599 hattına ait tip II kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

ADK 694 hattında embriyoların kallus geliştirme hızı başlangıçta yavaş iken zamanla hızlanma göstermiştir. Embriyoların N6E ortamına alınmasını takip eden 7. haftadan itibaren tip II kallus oluşumu görülmüş olup, partikül bombardımanı uygulaması yapılana kadar bu formunu muhafaza etmiştir.

ADK 737 hattına ait embriyoların gelişim hızı oldukça iyidir. N6E ortamına alındıktan sonra hızla gelişmeye başlayan embriyonik kallusdan, 6. haftadan itibaren tip II kallus oluşumunu gerçekleştirmiştir ve partikül bombardımanı uygulamasına kadar gelişimlerini hızlı bir şekilde sürdürmüşlerdir (Şekil 4.8).



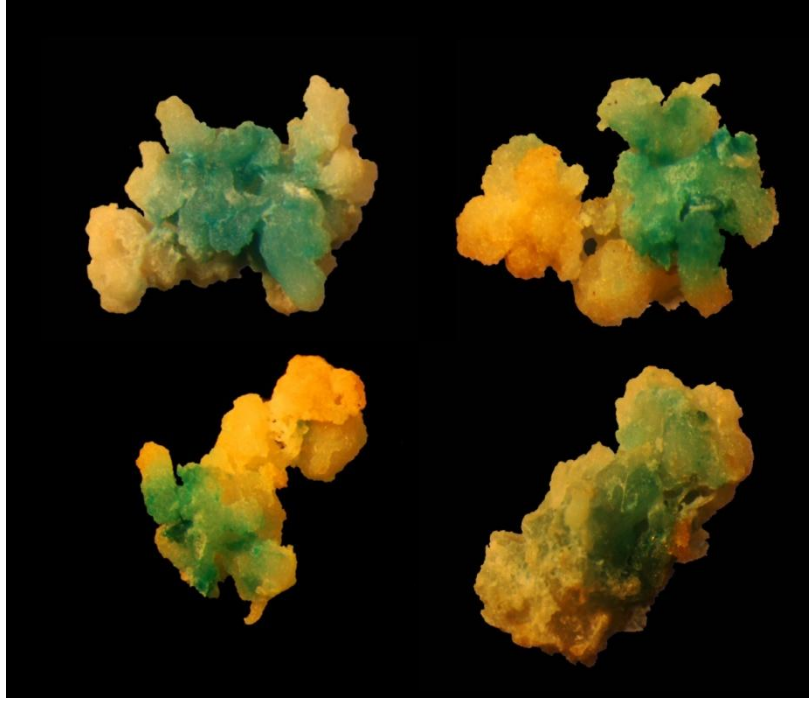
Şekil 4.8- ADK 737 hattına ait tip II kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

## 4.2 PARTİKÜL BOMBARDIMANI İLE GEN AKTARIMI ÇALIŞMALARI

Partikül bombardımanında kullanılacak biyolistik cihazının parametrelerini ayarlamak ve oluşturulan tip II kallusların gen aktarımı için uygun hale gelip gelemediklerini belirleyebilmek için GUS geni içeren bir plazmit kullanılarak denemeler yapılmıştır. Asıl aktarılması planlanan pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitleri seçilimi sağlamak için herbisit dirençlilik geni içermektedir. Herbisitler ile seçim haftalar alan bir süreç olduğundan kullanılan yöntemin başarısını kısa sürede anlatabilmek için histokimyasal boyama ile görsel sonuçlar sağlayan GUS geninin olduğu pAHC25 plazmiti kullanılmıştır (Şekil 3.15).

### 4.2.1 GUS Deneyi

Partikül bombardımanı sisteminin çalışıp çalışmadığını öğrenmek amacıyla yapılan GUS geni transferi denemesi başarıyla sonuçlanmıştır. Uygulama tamamlandığında kalluslarda gen aktarımından yaklaşık 10 gün sonra GUS geninin geçici anlatımı histokimyasal olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9- pAHC25 plazmiti ile partikül bombardımandan sonra X-Gluc çözeltisinde GUS histokimyasal reaksiyonu gösteren kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

GUS geni içeren pAHC25 plazmitinin mısır tipII kalluslarında geçici ifadesi belirlendikten sonra asıl aktarmayı planladığımız pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitlerinin kullanıldığı denemeler yapılmıştır.

#### 4.2.2 Partikül Bombardımanı Denemeleri ve Fiziksel Değişkenler

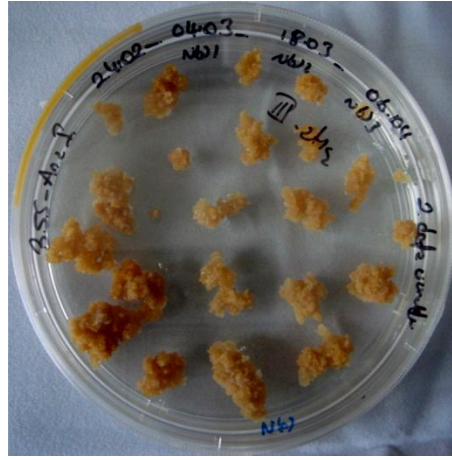
Partikül bombardımanı ile gen aktarımı sırasında atış mesafesi, atış basıncı, atış tekrarı, ozmotik muamele süresi gibi kriterler değiştirilerek denenmiştir.

##### 4.2.2.1 Atış mesafesi

Gen aktarımı denemelerinde 6 cm ve 9 cm atış mesafeleri ile 650 psi ve 1100 psi atış basınçları denenmiştir. Literatürlere uygun olarak 6 cm mesafe ile yapılan uygulamalarda 650 psi basınç kullanılırken, 9 cm mesafe ile yapılan uygulamalarda 1100 psi basınç kullanılmıştır. Kalluslara yapılan uygulamalarda genel olarak en uygun mesafenin 6 cm, en uygun basıncın 650 psi olduğu belirlenirken, embriyolara yapılan uygulamalarda en uygun mesafenin 9 cm, en uygun basıncın 1100 psi olduğu belirlenmiştir. Ancak ADK 694 hattında kalluslara 9 cm ve 1100 psi basıncın daha etkili olduğu görülmüştür.

#### 4.2.2.2. Atış Tekrarı

Literatürdeki bazı çalışmalarda gen aktarım başarısını artırabilmek için aynı kalluslara birden fazla atış uygulanmıştır. Bu çalışmada da atış tekrarının kalluslar üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla ADK 310 hattından 100 adet kallus içeren iki petri hazırlanmış, petrilere biri 6 cm atış mesafesi ve 650 psi basınç ile iki defa vurulmuş, diğeri 6 cm atış mesafesinden 650 psi basınçla bir defa vurulmuştur. Bir defa vurulan petrideki kalluslar gelişimlerine devam ederken, iki defa vurulan petride oluşan fiziksel hasardan sonra mısır kallusları toparlanamamış ve yaklaşık 3 hafta sonunda hepsi ölmüştür (Şekil 4.10). Bu çalışmada partikül bombardımanı ile gen aktarımı için en uygun atış sayısı bir defa olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10- ADK 310 hattına ait iki defa atış yapılan bütün kalluslar ölmüştür (Fotoğraf: Deniz KÖM).

#### 4.2.2.3 Partikül Bombardımanı Sonrası Ozmotik Muamele

Partikül bombardımanı ile gen aktarımı denemelerinde uygulama sonrası ozmotik muamele süresinin etkilerini test etmek için atış sonrası 1, 4 ve 20 saatlik muameleler yapılmıştır (Şekil 4.11). 20 saatlik muameleye maruz bırakılan kallusların büyük kısmı toparlanma gösterememişlerdir. 4 saat ozmotik muamele uygulanan kallusların yarısından fazlası toparlanma gösterirken, 1 saatlik muameleye maruz bırakılan kallusların tamamına yakınının toparlanma gösterdiği ve bölünmeye başladığı görülmüştür. En iyi uygulama, partikül bombardımanı uygulaması sonrasında 1 saatlik ozmotik muamele olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11- Partikül bombardımanı öncesi ve sonrası ozmotik muamele uygulanan kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

#### 4.2.3 Seçilimde Kullanılan Herbisitler

Çalışmanın ilk aşamalarında herbisit olarak fosfonötrisin kullanılmıştır. İlk denemelerde herbisit ile yapılan seçilimin başarılı olmaması nedeniyle sonraki çalışmalarda daha etkili bir herbisit olan bialafos kullanılmıştır. Bu şekilde iki herbisit arasında kullandığımız mısır hatları üzerindeki etkinlik karşılaştırması yapma imkanı da elde edilmiştir. Yapılan denemelerde fosfonötrisin herbisiti kallusların gelişimini engelleyememiştir. Yapılan 8 alt kültürleme çalışmasına rağmen hiçbir petride tam kallus ölümüne rastlanamamıştır. Bialafos herbisiti ile yapılan denemelerde kısa sürede kallus ölümü görülmüş, seçim sürecinde etkin olarak kullanılmıştır. Bialofos herbisiti ile 4-6 alt kültürleme yapılmıştır ve 4. alt kültürlemeden sonra sonuç değişmemiştir.

#### 4.2.4. Partikül Bombardımanı Sonrası Seçim Süreci

Partikül bombardımanı uygulamasının ardından bir hafta süre ile N6E besi ortamında bekleyen mısır embriyoları ve tip II mısır kallusları, transforme olmayan bireylerin eleneceği N6S seçici besi ortamına aktarılmışlardır.

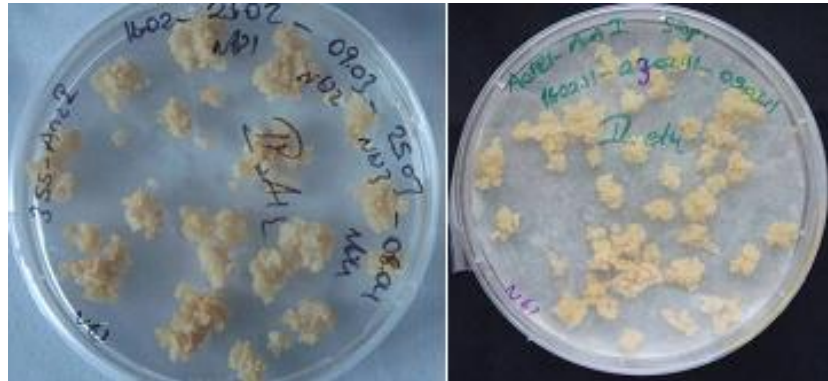
Direkt olarak embriyoların kullanıldığı partikül bombardımanı çalışmalarında bombardımandan sonraki süreçte kallus gelişimi ve rejenerasyon sağlanamamıştır (Şekil 4.12). Bu nedenle çalışmalara sadece partikül bombardımanı yapılan tip II kalluslarla devam edilmiştir.



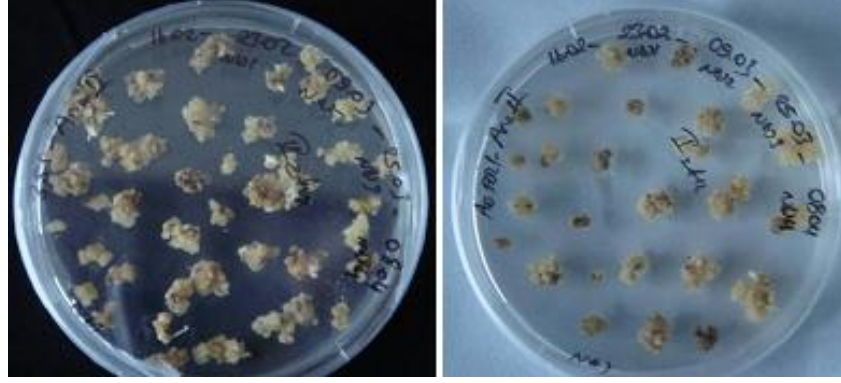


Şekil 4.12- Partikül bombardımanından sonra hiç gelişim gösteremeyen ADK 694 hattına ait embriyolar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de 2 mg/L fosfonötrisin içeren besi ortamında 4. ve 5. alt kültürlemedeki ADK 310 ve ADK 455 hatlarına ait kalluslar görülmektedir. Kalluslarda kahverengileşme olmuş ancak bazı hücre ölümleri görülmediğinden geniş alan ve almayanlar kalluslar ayırlanamamıştır.

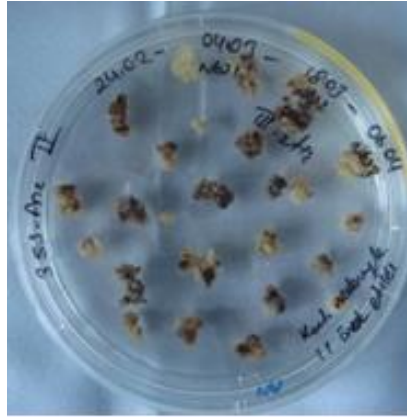


Şekil 4.13- Fosfonötrisin içeren seçici besi ortamındaki ADK 310 hattına ait kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).



Şekil 4.14- Fosfonötrisin içeren seçici besi ortamındaki ADK 455 hattına ait kalluslar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

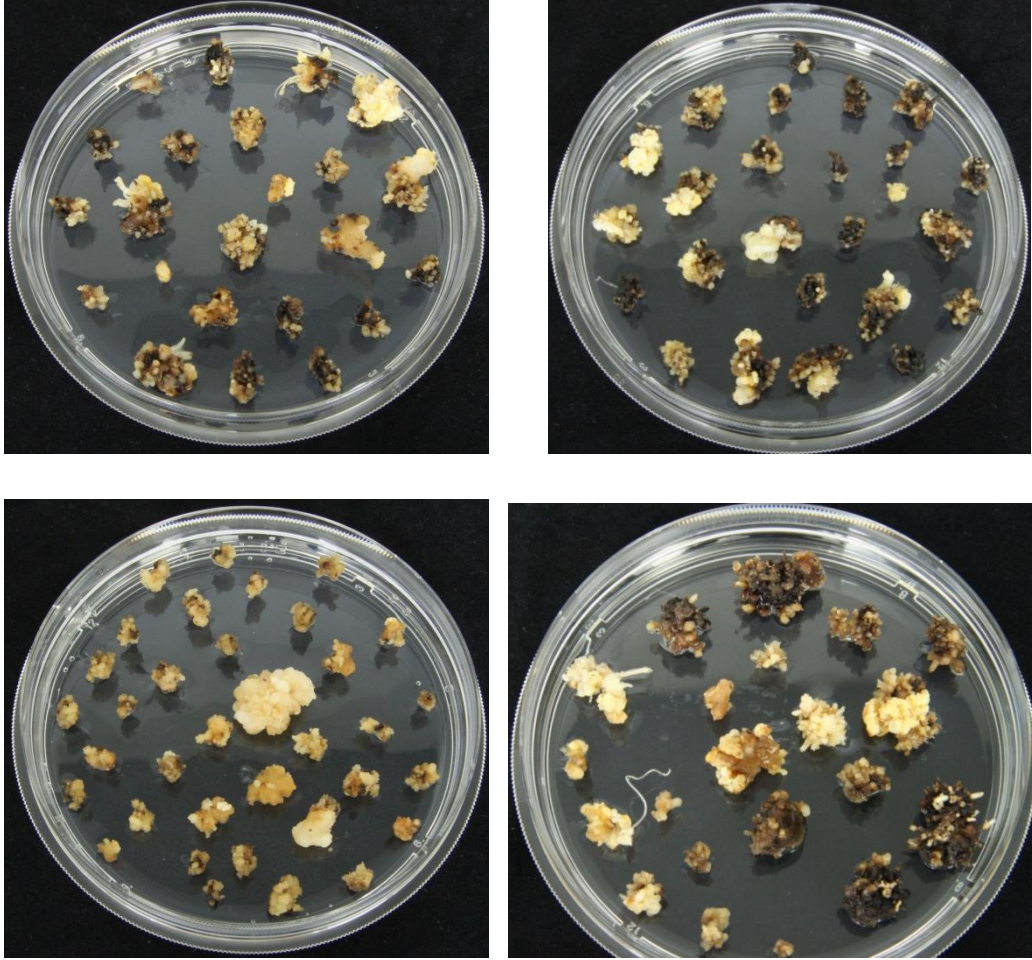
ADK 310 hattının seçici besi ortamında uzun süre alt kültürlemesi yapılmış olmasına rağmen durum değişmemiştir. Ancak ADK 455 hattında çok bariz olmasa da ADK 310 hattına göre daha fazla ölümler olmuştur (Şekil 4.15)



Şekil 4.15- ADK 455 hattının fosfonötrisin içeren besi ortamında kahverengileşip kuruyan kallusları (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Çalışılan mısır hatlarında fosfonötrisin herbisiti etkin bir seçim gerçekleştiremediğinden bundan sonraki çalışmalar bialafos herbisiti ile gerçekleştirilmiştir. Bialafos ile yapılan altkültürleme çalışmalarının ilk haftalarından itibaren hücre ölümleri görülmeye başlanmıştır. ADK 451, ADK 599, ADK 694, ADK 737 hatlarının bialafos içeren besi ortamında alt kültürleme çalışmalarına ait resimler Şekil 4.16'da verilmiştir. Seçim süreci yaklaşık 4 altkültürasyon ve 8 hafta sürdürülmüştür. Bu aşamada hayatta kalan kallusların muhtemel transformantlar olduğu düşünülmektedir.



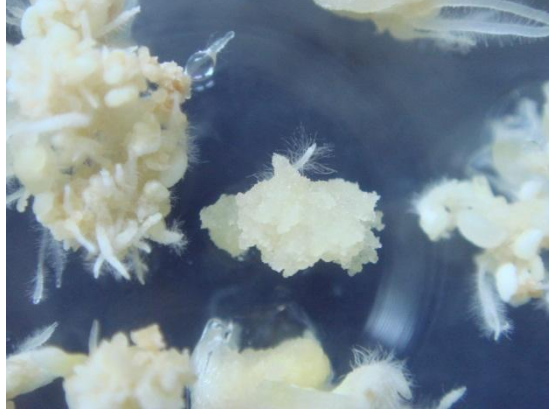


Şekil 4.16- Seçilim sürecinin sonunda canlı kalan kallusların görüntüsü (Fotoğraf: Deniz KÖM).

#### 4.2.4. Rejenerasyon

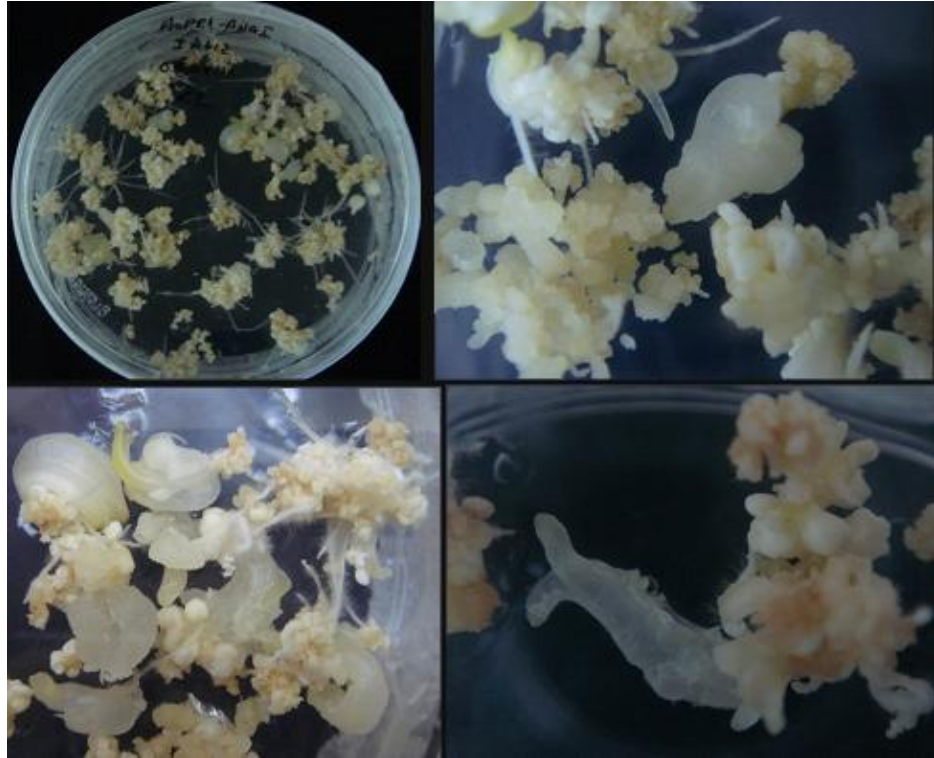
Herbisitli besi ortamında en az 8 hafta boyunca alt kültürasyonları yapılmış ve halen canlılıklarını sürdüren tip II kalluslar rejenerasyon I ortamına alınmıştır (Tablo 3.2). Bu ortamda da seçici besi ortamında olduğu gibi ilk denemelerde 2mg/L konsantrasyonda fosfonötrisin herbisiti eklenmiştir. Daha sonraki denemelerde fosfonötrisin yerine 3mg/L bialafos eklenmiştir. Petri kapları parafilm yerine hava geçiren bantlarla sarılmış ve 25 °C’de karanlıkta inkübe edilmişlerdir. ADK 694 ve ADK 737 hatlarında bu aşamada somatik embriyo gelişiminin başladığı gözlenmiştir. Ancak diğer hatlarda bu aşamada somatik embriyo gelişimi gözlenmemiştir. Rejenerasyon I ortamında iki hafta tutulan kalluslar bu sürenin sonunda rejenerasyon II ortamına alınmıştır. Rejenerasyon II besi ortamında kalluslar 25 °C’de ve karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Kallusların hava alabilmesi için petri kapları hava geçiren bant ile sarılmıştır. Bu besi ortamında bialafos miktarı 4mg/L’ye çıkarılmıştır. Herbisite rağmen canlılıklarını sürdüren ve hızla gelişen

kalluslar önce kök geliştirmeye başlamıştır (Şekil 4.17). Bu aşamada ADK 455 hattına ait kalluslar gelişimlerini durdurmuş ve sonuçta embriyonik olma özelliklerini kaybederek yaşlanmışlardır.



Şekil 4.17- Rejenerasyon I besi ortamında somatik embriyo gelişimi (Fotoğraf: Yasemin YILDIZHAN).

Rejenerasyon-II besi ortamında ADK 455 dışındaki tüm hatlarda 2-3 haftalık olgunlaşma periyodundan sonra somatik embriyoların çoğunluğu beyaz ve opak bir renk almıştır (Şekil 4.18).



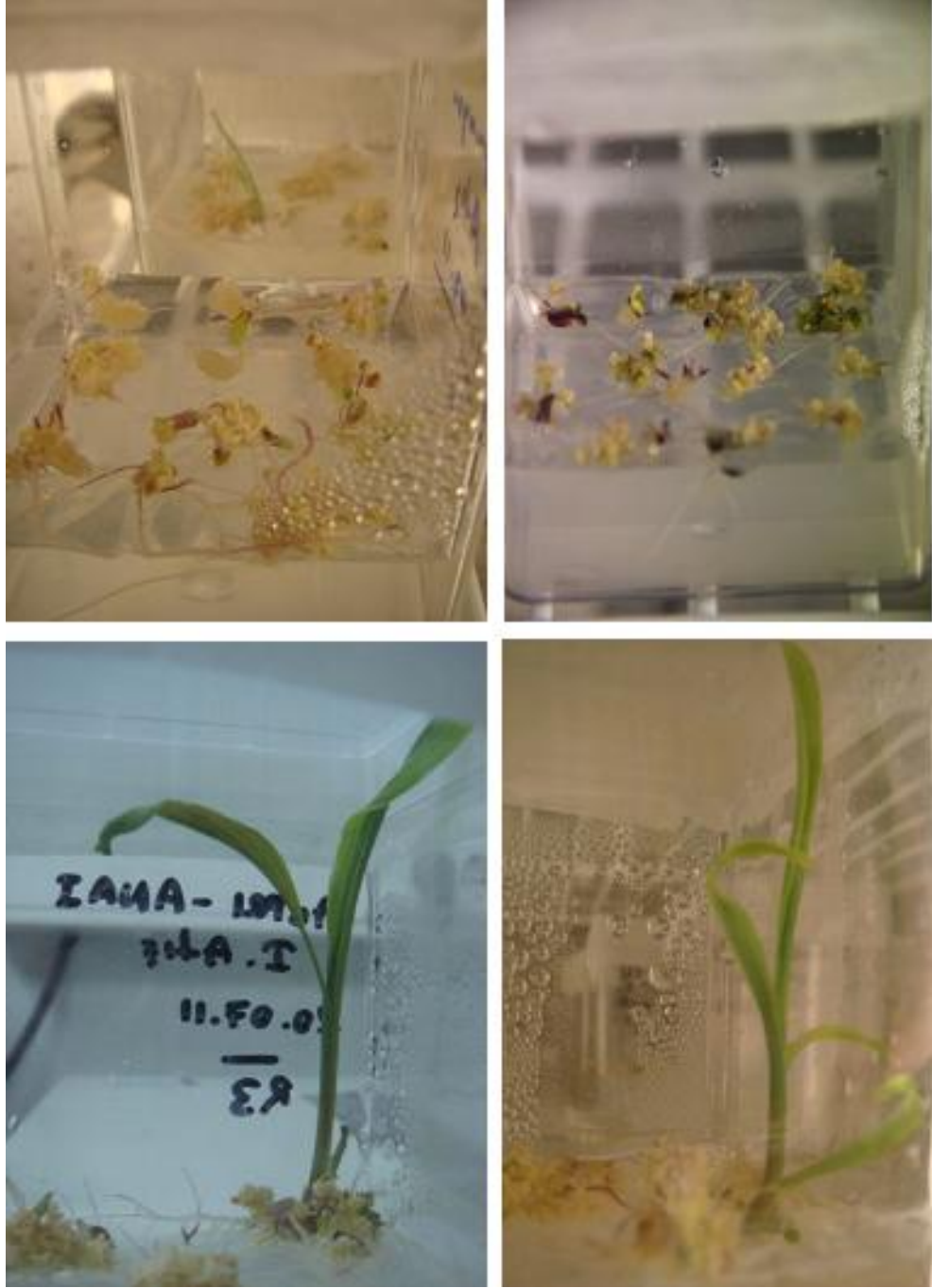
Şekil 4.18- Rejenerasyon-II besi ortamında gelişen somatik embriyolar (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Somatik embriyo geliştiren kalluslar ışık ortamında gelişebilmeleri için rejenerasyon-III ortamına aktarılmışlardır. Herbisit içermeyen rejenerasyon III ortamına alınan somatik embriyolar 25°C'de, 80-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ışık yoğunluğunda 16:8 ışık periyodunda inkübe edilmişlerdir. Bu aşamada da parafilm yerine hava geçiren bant kullanılmıştır (şekil 4.19).



şekil 4.19- Somatik embriyo geliştiren kalluslar rejenerasyon III besi ortamına alındıktan sonra magenta kültür kapları hava geçiren bant ile sarılmıştır (Fotoğraf: Deniz KM).

Rejenerasyon III ortamına alınan somatik embriyolar yaklaşık 10 gün içerisinde kök ve yaprak geliştirmeye başlamışlardır (şekil 4.20). ADK 455 hattına ait kallusların gelişimi bu aşamada durmuştur.



Şekil 4.20- Rejenerasyon III ortamında gelişen mısır fideleri (Fotoğraf: Deniz KÖM).

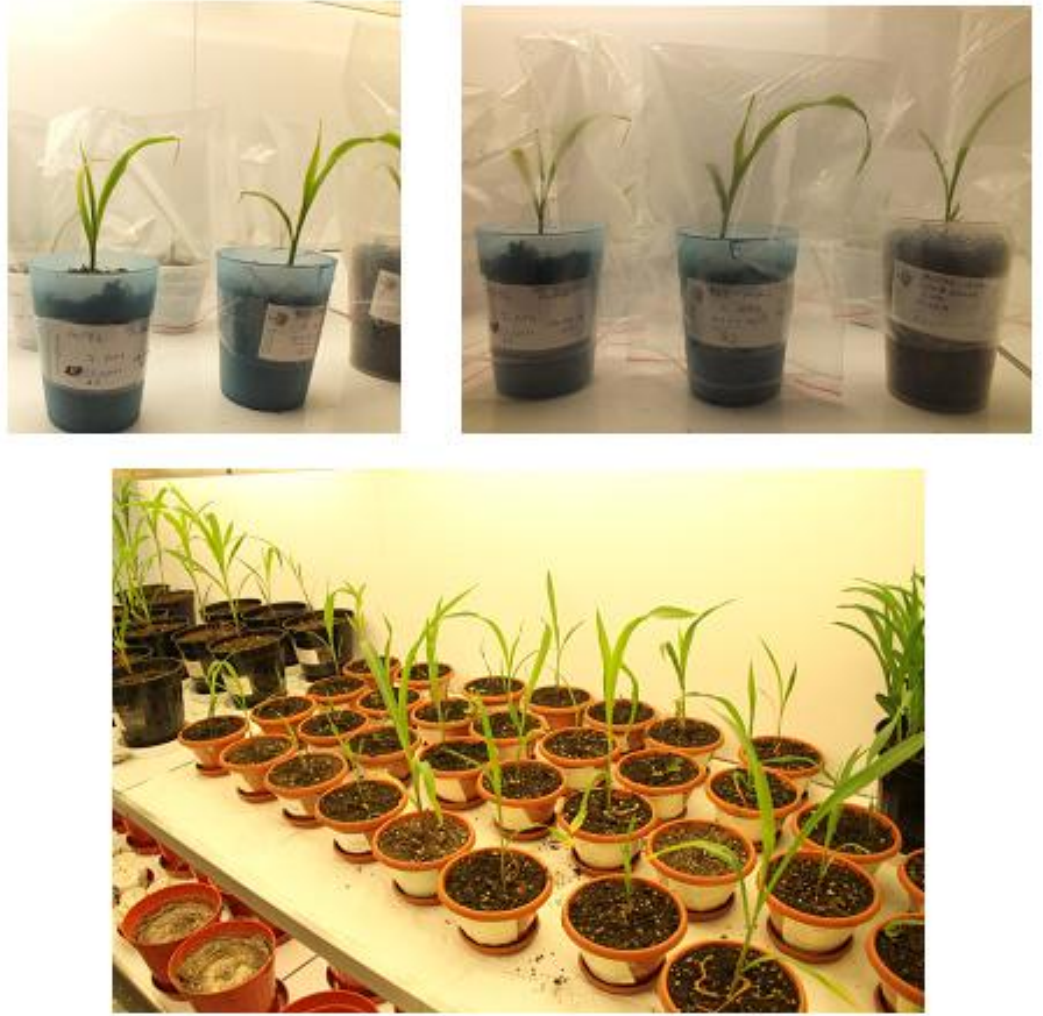


Mısır fideleri steril kabin içinde steril pens kullanılarak çıkarılmış ve köklerindeki besi ortamı kalıntıları mümkün olduğunca temizlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21- Toprağa alınmak üzere köklerindeki besi ortamı temizlenen mısır fidesi (Fotoğraf: Deniz KÖM).

Temizlenen bitkicikler ilk aşamada torfa aktarılmıştır. Sera etkisi oluşturabilmek için yaklaşık 10 gün süreyle saksıların üzerleri naylon ile kaplanmıştır. Bitkilerin besin ihtiyacını karşılamak için Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. İklim odasında çok sayıda mısır fidesi ekilmiştir. İklim odasının koşulları 16:8 ışık periyodu,  $350 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ışık yoğunluğu,  $26^\circ\text{C}$  gündüz,  $22^\circ\text{C}$  gece sıcaklığı şeklinde ayarlanmıştır. Bitkiler torfa uyum sağlayıp gelişmeye başladıktan sonra 1:1 oranında torf-toprak karışımı olan saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.22).

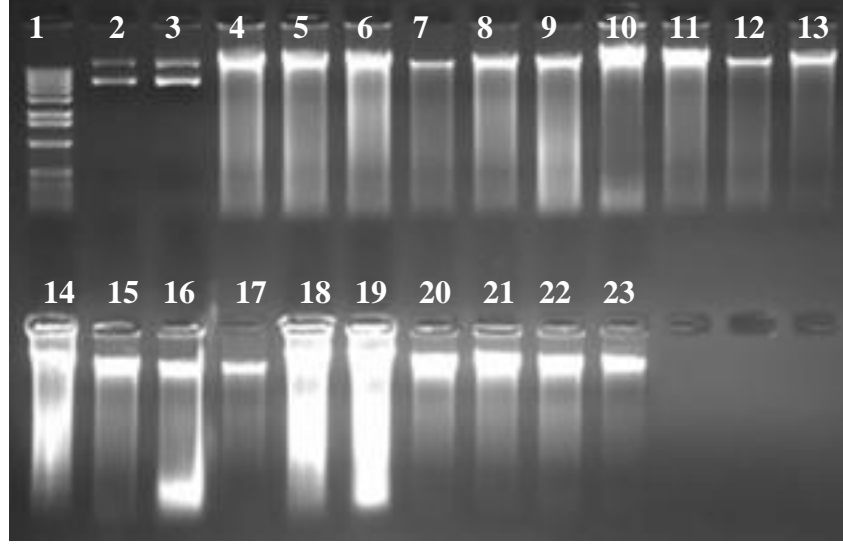


Şekil 4.22- Rejenerasyon III ortamından alınan mısır fideleri toprağa aktarıldıklarında sera etkisi oluşturmak amacıyla üstleri ışık geçiren naylon torbalarla kapatılmıştır. Ortalama 10 gün sonra üzerlerindeki torbalar kaldırılmış ve fidelerin bulunduğu saksılar kademeli olarak büyütülmüştür (Fotoğraf: Deniz KÖM).

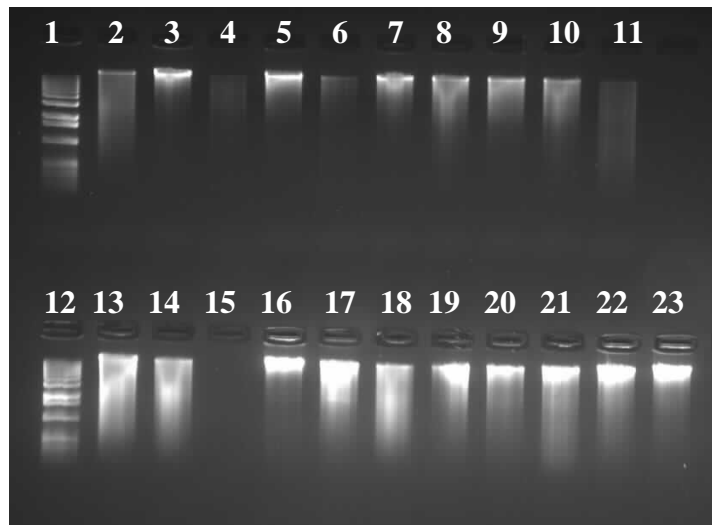
#### **4.2.5. Partikül Bombardmanı Denemelerinden Sonra Elde Edilen Mısır Fidelerinin Transgenik Olup Olmadıklarını Anlayabilmek İçin Yapılan PZR Analizleri:**

İklim odasında yetiştirilen, pGreenII 0229 plazmiti ile transforme edilen ADK 310 hattına ait mısır fidelerinin bar genini taşıyıp taşımadıklarını anlayabilmek amacıyla PZR analizleri yapılmıştır. ADK 451, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatlarında ise pTF101.1 plazmitinin varlığını teyit edebilmek için 35S promotör bölgesine ait primerler kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle taze yaprak örnekleri alınmıştır. Bu işlem

sırasında bitkilerin birbirlerini kontamine etmemesi amacıyla yapraklara elle dokunulmamış ve kesici alet kullanılmamıştır. DNA izolasyonunda güçlükler yaşandığından, iyi kalitede DNA izole edebilmek için Cornell DNA izolasyon yönteminin yanısıra Qiagen plant DNA izolasyon kiti ve i-genomic plant DNA extraction mini kiti de denenmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen genomik DNA'ların agaroz jel görüntüleri Şekil 4.23 ve şekli 4.24'de verilmiştir.

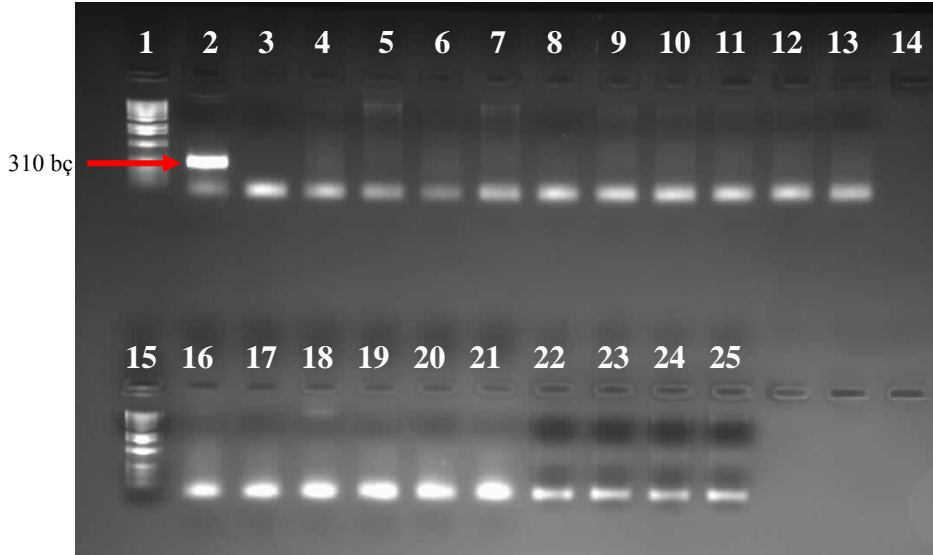


Şekil 4.23- Cornell yöntemi ile izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 1 kb Ladder, 2-23: Transgenik olduğu düşünülen mısır hatlarına ait genomik DNA'lar.



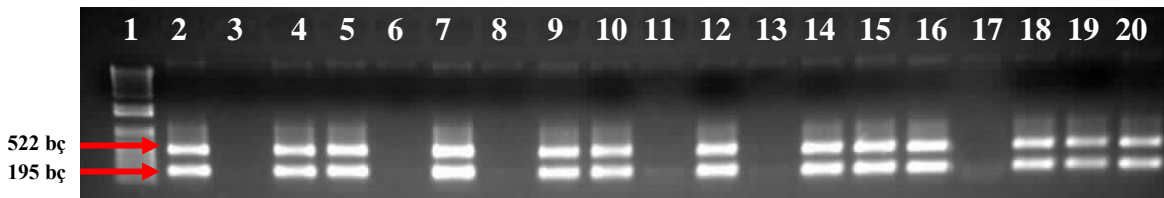
Şekil 4.24- DNA izolasyon kiti ile izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 12 numaralı kuyucuklar 1 kb Ladder içerirken; 2-11 ve 13-23 numaralı kuyucuklar transgenik olduğu düşünülen mısır hatlarına ait genomik DNA'ları içermektedir.

ADK 310 hattına ait bireylerde pGreenII 0229 plazmitinin varlığını teyit edebilmek için *bar* genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR analizleri yapılmıştır. Ancak analizler birçok kez tekrar edilmesine rağmen elde edilen 130 bitkinin hiçbirinde pGreenII 0229 plazmitinin varlığını gösteren 310 baz çifti büyüklüğündeki banda rastlanmamıştır. Sonuç olarak ADK 310 hattına ait transgenik mısır bitkileri elde edilememiştir. Şekil 4.25'de kontrolü yapılan ilk bitkilerin PZR sonuçlarını gösteren jel görüntüsü verilmiştir. Bütün sonuçlar aynı çıktığından diğer jel görüntülerine yer verilmemiştir.



Şekil 4.25- ADK 310 hattına ait bireylerde *bar* genine özgü primerlerle yapılan PZR analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1 ve 15: 1 Kb Plus Ladder; 2: *bar* pozitif kontrol, 3: *bar* negatif kontrol, 4-14 ve 16-25: ADK 310 hattına ait bireylerin PZR sonuçları.

pTF101.1 plazmitinin aktarıldığı ADK 737 hattından 18 adet bitki elde edilmiş ve PZR analizleri sonucu 12 adet bitkinin 35S primerleriyle pozitif bant verdiği görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.26- ADK 737 hattına ait bireylerde 35S promotörüne özgü primerlerle yapılan PZR analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 1 Kb Plus Ladder; 2: 35S pozitif kontrol; 3-20: ADK 737 hattına ait bireylerin PZR sonuçları.



pTF101.1 plazmitinin aktarıldığı ADK 451, ADK 599, ADK 694 hatlarının rejenerasyonu başlamıştır. Bu hatlarda çok sayıda somatik embriyo mevcuttur ve bunların büyük kısmından mısır fidelikleri oluşmaktadır. Ancak mısır fideleri moleküler analizler için örnek alacak büyüklüğe ulaşmadan tez çalışma süresi sona erdiğinden PZR kontrolleri yapılamamıştır. Yaklaşık bir aylık süreç içerisinde bu hatlara ait PZR analizleri de tamamlanmış olacaktır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kullanım alanları her geçen gün artan mısır bitkisi giderek artan tüketim oranına karşın, dünyadaki tarım arazilerinin kısıtlı olması ve üretimi engelleyen biyotik ve abiyotik faktörler nedeniyle ihtiyaca karşılık veremez duruma gelmiştir. Giderek artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacı ve hızla gelişen teknolojinin sonucu olarak yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması nedeniyle doğal kültürlerin yeterli olmadığı, birim alanda verimliliği yüksek mısır hatlarına yönelişin yaşandığı bilinen bir gerçektir. Klasik ıslah çalışmalarıyla yeni hat geliştirme çalışmaları yüzyıllardır devam etmektedir. Doğal olarak besin kalitesi yüksek mısır hatları bulunduğu gibi biyotik ve abiyotik faktörlere dayanıklı mısır hatları da bulunmaktadır. Ancak bu özelliklerin tümünü doğal olarak bünyesinde bulunduran mısır hatlarını klasik ıslah yöntemleri ile geliştirmek uzun yıllar alan bir süreçtir. Klasik ıslah çalışmalarında istenilen tek bir özelliği tek bir melezleme çalışmasıyla elde etmek mümkün değildir. İstenen özelliklerin yanısıra kontrolsüz olarak ebeveynin sahip olduğu diğer özellikler de yeni çeşide aktarılmaktadır. Bu durum çeşit geliştirme çalışmalarının beklenenden uzun süreler almasına neden olmaktadır. Ayrıca klasik ıslah çalışmalarında tür sınırlaması bulunmaktadır. Aktarılmak istenen yeni karakterler ancak kendi aralarında mezlelenebilen ve fertil bireyler meydana getirebilen bitkiler arasında gerçekleştirilebilmektedir. Gelişen biyoteknolojik yöntemler ile bu sınırlamaların ve uzun süreçlerin ortadan kaldırılması mümkündür.

Günümüzde biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilmiş ticari mısır çeşitlerinin dünya pazarında kullanımı giderek artmaktadır (ISAAA, 2012a, 2012b). Ülkemizde klasik ıslah çalışmalarıyla geliştirilen mısır çeşitleri bulmasına rağmen biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilmiş çeşitler henüz mevcut değildir. Ancak dünya çapında biyoteknolojik bitkilere yönelim gelecek yıllarda Türkiye için de kaçınılmaz olacaktır. Bu nedenle kendi araştırma enstitülerimiz tarafından geliştirilen, Türkiye'nin iklim ve toprak özelliklerine uyumlu bitkilerin bu çalışmalarda kullanılması son derece önemlidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında kendi yerel çeşitlerimize gen aktarım koşullarının optimizasyonu planlanmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler ve tecrübeler daha sonra gerçekleştirilecek daha kapsamlı çalışmalar için temel oluşturacaktır.

Çalışma kapsamında gen aktarımının partikül bombardımanı yöntemi ile gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çok kopyalı aktarım ihtimaline ve bitki rejenerasyon sürecini tamamladığında elde edilen başarı oranının maksimum %1–4 arası olmasına karşın, biyolistik yöntemi, monokotil bitkilere gen aktarımı için halen en başarılı yol olarak görülmektedir ve yaygın olarak tercih edilmektedir (Brettschneider ve diğ., 1997; Mark, 1999; Oneto ve arkadaşları., 2010; Wang ve Frame, 2009).

Partikül bombardımanı ile mısır bitkisine gen aktarım çalışmalarının ilk aşaması, kullanılması planlanan hatlar için doku kültürünün optimizasyonudur. Literatürde Türkiye’de yetiştirilen mısır çeşitlerinin doku kültürüne ait daha önce yapılmış çalışmalara rastlanılmadığından hangi çeşitlerin doku kültürüne uygun olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle bu tez çalışması süresince Sakarya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü tarafından tavsiye edilen ADK 310, ADK 451, ADK 455, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatları, Akdeniz Bölgesi’nde ikinci ürün verme imkanlarının yüksek olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmaya ilk olarak ADK 310 ve ADK 455 hatlarıyla başlanmış ve Tablo 3.1’de yer alan besi ortamlarıyla denemeler yapılmıştır. İlk denemelerin sonuçları alındıktan sonra çalışmaya ADK 451, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatları ile devam edilmiştir. İlk denemelerdeki problemler neticesinde bu alanda oldukça deneyimli olan Doç. Dr. Manish RAIZADA (University of Quelph), Prof. Dr. Kan WANG ve Browyn FRAME (Iowa State University) ile görüşülmüş ve onların tavsiyeleri doğrultusunda kullanılan besi ortamlarında bazı değişiklikler yapılmıştır. Sonuç olarak denenmesi planlanan dört yeni hat ile yapılan doku kültürü çalışmalarında Tablo 3.2’de yer alan besi ortamları kullanılmıştır. ADK 310 ve ADK 455 hatları ile yapılan ilk denemelerde bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D (2 mg/L) ve 25 µM gümüş nitrat, ADK 451, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatları ile yapılan sonraki denemelerde ise 15 mM dicamba ve 88 µM gümüş nitrat kullanılmıştır. Dicamba ve 88 µM gümüş nitrat kullanılan besi ortamlarında oluşturulan kalluslarda kararmanın önemli oranda azaldığı ve çoğu örnekte tamamen ortadan kalktığı, kallusların bölünme hızlarının ve kalitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Gümüş nitrat ve dicamba oranlarının doku kültürüne etkisi ile ilgili bulgular daha önce yayınlanmış sonuçlarla paralellik göstermiştir (Close ve Ludeman, 1987; Graj ve Conger, 1985; Carvalhove diğ., 1997; Songstad ve diğ., 1988; Wu ve diğ., 2006) Denemelerde kullanılan 6 hat, tip II kallus oluşturma ve bu kallusların canlılıklarını yaklaşık 6 ay süre boyunca devam ettirebilme kapasiteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Embriyolar çıkarıldıktan sonra, tamamına yakını embriyonik kallus oluşturmaya başlamıştır. Ancak bu kallusların tip II formuna dönüşme kapasitesi çalışılan tüm hatlarda aynı olmamıştır.

ADK 451 hattı tip II kallus oluşturma ve bu kallusların canlılığını sürdürme özelliği bakımından en başarısız hat olarak belirlenmiştir. ADK 455 hattına ait embriyonik kallusların yarısı tip II kallusa dönüşmesine karşın bu kalluslar kısa sürede embriyonik olma özelliğini yitirerek gen aktarımı için uygun olmayan hale gelmiştir. ADK 310 ve ADK 737 hatları N6E besi ortamındaki 6. haftalarında tip II kallus oluşumuna başlamış olup bu süreçte en erken gelişen hatlar olarak belirlenmiştir. ADK 599 ve ADK 694 hatlarının tip II kallus oluşturmaları yaklaşık 8 hafta sürmüştür. ADK 310, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatlarının tip II kallus oluşturma oranlarının %80’den fazla olduğu görülmüştür. ADK 310, ADK 599, ADK 694 ve ADK 737 hatlarına ait kallusların bölünme ve gelişme hızlarının yüksek olduğu ve tip II kallusların oldukça kaliteli olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan tekrarlı rejenerasyon denemelerinden sonra elde edilen verilere göre ADK 310, ADK 694 ve ADK 737 hatlarının rejenerasyon

yeteneği ADK 451, ADK 455, ADK 599 hatlarından daha yüksektir. Yapılan çalışmalarda daha önce denenmiş ve başarılı olmuş besi ortamı ve inkübasyon koşulları sağlanmış olmasına rağmen somatik embriyo oluşumu gerçekleşmemiş ve bombardıman aşamasında yaklaşık 700 adet kallus kullanılmasına karşın ADK 455 hattında rejenerasyon başarılammıştır. ADK 451 hattı düşük oranda tip II kallus oluşturmasının yanı sıra bombardıman çalışmalarında kullanılan yaklaşık 600 adet tip II kallusunun çok azı somatik embriyo oluşturabilmiştir. ADK 599 hattında 3200'den fazla kallus bombardıman denemesine alınmış, ancak az sayıda somatik embriyo oluşturması nedeniyle rejenerasyon oranı %1'in altında gerçekleşmiştir. ADK 737 hattında 1429 kallus ile bombardıman denemesi yapılmış ve rejenerasyon oranı %1'in üzerinde belirlenmiştir. ADK 310 hattında 1844 kallus ile yapılan deneme sonucunda rejenerasyon oranının %7'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. ADK 694 hattında yaklaşık 900 örnekle deneme yapılmış ve rejenerasyon oranı %1 olarak belirlenmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1- Partikül bombardımanı denemelerinde kullanılan tip II kallusların rejenerasyon yüzdesi

<b>Kullanılan Hat</b>	<b>Partikül bombardımanı uygulamasına alınan kallus sayısı</b>	<b>Rejenerasyon sonucu elde edilen bitki sayısı</b>	<b>Hattın rejenerasyon başarısının % olarak ifadesi</b>
<b>ADK 310</b>	1844	130	> %7
<b>ADK 451</b>	600	4	< %1
<b>ADK 455</b>	700	0	-
<b>ADK 599</b>	3200	6	< %1
<b>ADK 694</b>	900	10	> %1
<b>ADK 737</b>	1429	18	> %1

Yukarıdaki tabloda görüldüğu gibi yapılan denemeler sonucunda mısır bitkisinde doku kültürü çalışmaları için en uygun 3 hat belirlenmiştir. Bu hatlar en başarılıdan itibaren sırasıyla ADK 310, ADK 737 ve ADK 694'tür. Tüm koşullar aynı olduğu halde rejenerasyonda görülen bu farklılıkların kaynağının mısır genotipi olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle transformasyon denemesi yapılması planlanan her mısır hattı için ayrı ayrı doku kültürü şartlarının optimizasyonu yapılmalıdır.

Yapılan literatür araştırmasına göre, bazı partikül bombardımanı çalışmalarında atış tekrarlarının gen aktarım frekansını artırdığı görülmüştür (Petrillo ve diğ., 2008). Atış tekrarının denemelerde kullanılan hatlara ait kalluslar üzerindeki etkisini araştırabilmek için denemeler yapılmış ve iki kez aynı alana yapılan atışın kalluslarda büyük hasara neden olduğu görülmüştür. Atış mesafesi 6 cm olan ve 650 psi basınç ile bir kez vurulan kalluslar kısa sürede toparlanma ve tekrar büyüme gösterirken, iki defa atış yapılan petrideki kalluslar hiç toparlanma gösterememiş ve kısa sürede ölmüştür. Bu sonuç yayınlanmış diğer araştırma sonuçlarını desteklemektedir (Brettschneider ve diğ., 1997; Frame ve diğ., 2000; Mark, 1999; Oneto ve diğ., 2010; Wang ve Frame, 2009).

Partikül bombardımanı çalışmasında kullanılan hatlar için en uygun ozmotik uygulama süresini belirlemek amacıyla denemeler yapılmıştır. Bombardıman sonrası 1 saat, 4 saat ve 20 saatlik ozmotik uygulamalar denenmiş ve en başarılı uygulamanın 1 saatlik ozmotik uygulama olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç literatüre uygundur (Frame ve diğ., 2000; Vain ve diğ., 1993).

Partikül bombardımanı uygulaması sonrasında transforme olmuş kallusların seçiminde fosfonötrisin ve bialafos herbisitleri denenmiştir. Fosfonötrisin herbisiti ile yapılan denemelerde seçici besi ortamında sekiz alt kültürlemeye karşılık gelen yaklaşık dört ay süresince fosfonötrisin kullanılmış olmasına rağmen kalluslarda tam olarak kararma ve bunun sonucu olarak ölüm görülmemiştir. Dolayısıyla gen çalışmalarında muhtemel transgenikleri ve transgenik olmayanları belirlemenin kullandığımız mısır hatlarında neredeyse imkansız olduğu gözlenmiştir. Bialafos herbisiti ile yapılan denemelerde henüz ikinci alt kültürlemede ölümler görülmeye başlanmış, bu durum belirgin şekilde artarak devam etmiştir. Denemeler sonucunda çok sayıda kallus ölürken, muhtemel transgeniklerin yaşadığı ve beyaz renkli kalluslar oluşturarak büyümeye devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle çalışma sonunda mısır transformasyon çalışmalarında kullanılacak en uygun herbisit bialafos olduğuna karar verilmiştir. Bu durum daha önce belirtilen sonuçlarla da (Dennehey ve diğ., 1994) uyumludur.

Bu çalışmada mısır bitkilerine aktarılması planlanan pGreenII 0229 ve pTF101.1 plazmitleri için seçimde kullanılacak olan işaret geni, herbisite dirençlilik sağlayan *bar* genidir. Bu genin ifadesini görmek ve seçilimi tam olarak gerçekleştirebilmek için aylar alan bir süreç gerekmektedir. Oysa partikül bombardımanı çalışmalarında optimizasyon işlemlerini gerçekleştirebilmek için kısa sürede fenotipik olarak bilgi veren işaret genlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle GUS geni içeren pAHC25 plazmiti kullanılarak kısa süre içinde geçici gen ifadesine bakılmıştır. ADK 310 hattına GUS geni içeren pAHC25 plazmiti ile yapılan partikül bombardımanı denemesinde, uygulamadan 10 gün sonra kalluslarda GUS histokimyasal aktivitesi gözlenmiştir. Bu deneme sonucunda planladığımız partikül bombardımanı koşullarının mısır bitkilerinde işe yaradığı sonucuna varılarak asıl aktarılmak istenen plazmitlerle denemelere başlanmıştır.

Partikül bombardımanı ile gen aktarımının ilk denemelerinde pGreenII 0229 plazmiti ile gerçekleştirilen çalışmada ADK 455 hattına ait kallusların tamamı daha rejenerasyon aşamasına gelmeden tip II embriyonik olma özelliklerini yitirdiklerinden hiçbir bitki elde edilememiştir. Tip II kallus oluşturma yeteneği oldukça yüksek olan ADK 310 mısır hattından 130 adet bitki elde edilmiş, ancak *bar* geni primerleri ile yapılan PZR kontrollerinde hiçbir bitki gene özgü pozitif bant vermemiştir. Bu aşamada daha önce denenmiş ve başarılı olmuş besi ortamları ve inkübasyon koşulları denendiğinden başarısızlığın üç faktörden kaynaklanabiliyor olacağı sonucuna varılmıştır. Bunlardan birincisi ADK 310 hattının genotipik olarak gen aktarımına uygun olmama durumudur. Literatüre de bakıldığında gen aktarımı yapılan çalışmalarda genellikle belli hatların tercih edildiği görülmektedir (Du ve diğ., 2010; Frame ve diğ., 2002; Gordonkamm ve diğ., 1990; Sidorov ve diğ., 2006; Vega ve diğ., 2008; Wang ve Frame, 2009). Ancak ülkemizdeki yerel mısır çeşitleri için bu güne kadar yapılmış hiçbir gen aktarım çalışmasına rastlanamamıştır. İkincisi pGreenII 0229 plazmitinin mısır transformasyonu için uygun olmama durumudur. pGreenII 0229 plazmiti ile daha önce yapılmış mısır transformasyon çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle bu plazmitin mısır partikül bombardımanı çalışmalarındaki başarısı bilinmemektedir. Partikül bombardımanı ile yapılan sonraki denemelerinde pGreenII 0229 plazmiti yerine, daha önce mısır gen aktarım çalışmalarında çalıştığı bilinen (Frame ve diğ., 2002; Frame ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2003) pTF101.1 plazmiti kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda ADK 737 hattından 18 mısır bitkisi elde edilebilmiş ve bunlardan 12 tanesi 35S promotör bölgesine ait primerlerle yapılan PZR analizi sonucunda pozitif bant vermiştir. ADK 451, ADK 599, ADK 694 hatlarına ait bitkiler rejenerasyona başlamış ancak PZR kontrollerini yapacak olgunluğa gelmeden bu tez çalışmasının süresi sona ermiştir. Dört aydan uzun bir süredir bialafos herbisiti içeren besi ortamlarında canlılıklarını sürdürebildiklerinden, rejenerasyon sonucu elde edilecek bu bitkilerin de muhtemel transformantlar olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmalardan elde edilen verilerle partikül bombardımanı denemelerinde kullanılan iki plazmitten pTF101.1'in mısır transformasyonu için daha uygun olduğu, kullanılan yerel çeşitlerden ADK 737 hattının gen aktarım çalışmaları için en uygun hat olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca ADK 451, ADK 599 ve ADK 694 hatlarının doku kültürü ve rejenerasyon aşamalarının daha ileri derecede optimizasyonu yapıldıktan sonra gen aktarımı için ümitvar olabileceği görülmüştür. ADK 310 hattının doku kültürüne uygunluğu ve tip II kallus oluşturma yeteneğinin yüksek olmasına rağmen, transformasyon çalışmalarında istenen başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle bu hat için farklı plazmit vektörlerinin kullanılmasının başarı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Çünkü gen aktarım çalışmaları için en kritik aşamalardan birisi tip II kallus oluşturma aşamasıdır ve ADK 310 hattı bu aşamada oldukça iyi sonuçlar vermektedir.

Özet olarak; bu çalışma ile Türkiye’de üretilen bazı mısır hatlarının doku kültürü kapasiteleri ile ilgili bilgi sahibi olunmuş, partikül bombardımanı yöntemi ile transformasyon için gerekli parametreler optimize edilmiş, kontrol denemelerinde geçici gen ifadesi sağlanmış, sonraki denemelerde de stabil transgenik bitki elde edilmiştir. Türkiye’de mısır bitkisine transformasyon yapılan literatürde yayınlanmış başka bir çalışma bulunamadığından bu proje bir ilk niteliğindedir. Bu proje ile elde edilen deneyimler daha sonra yapılacak daha kapsamlı çalışmalar için temel oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Babaoğlu, M., 1999, Bitkilerde gen transferi teknikleri. *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi*, 322, 24–26.
2. Babaoğlu, M., 2005, *Mısır ve Tarımı* [online], Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, <http://www.ttae.gov.tr/yenittae/index.php/makaleler/diger-makaleler/198-m-s-r-tar-m-yazar-dr-metin-babaoglu>, [Ziyaret Tarihi: 25.10.2012]
3. Bio-Rad., *Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System* [online], [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9075.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9075.pdf), [Ziyaret Tarihi: 14.02.2012]
4. Birch, R. G., 1997, PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 297–326.
5. Brettschneider, R., Becker, D., & Lorz, H., 1997, Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(6-7), 737–748.
6. Cabreraponce, J. L., Vegasgarcia, A., & Herreraestrella, L., 1995, Herbicide-Resistant Transgenic Papaya Plants Produced by an Efficient Particle Bombardment Transformation Method. *Plant Cell Reports*, 15(1-2), 1–7.
7. Christensen, A. H., & Quail, P. H., 1996, Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5, 213 – 218.
8. Chu, C. C., Want, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., & Bi, F. Y., 1975, Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin*, 18, 659–668.
9. Close, K. R., & Ludeman, L. A., 1987, The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. *Plant Science*, 52(1-2), 81–89.
10. Coe, E., & Sarkar, K., 1966, PREPARATION OF NUCLEIC ACIDS AND A GENETIC TRANSFORMATION ATTEMPT IN MAIZE. *CROP SCIENCE*, 6(5), 432–435.
11. CRA., 2009, *Corn Oil* [online], <http://www.corn.org/wp-content/uploads/2009/12/CornOil.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 11.01.2012]
12. Çetiner, S., 2010, Genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) nedir? sorular ve yanıtlar-1. *Uluslararası Ekonomik Sorunlar Dergisi*, 10(38), 40–54.



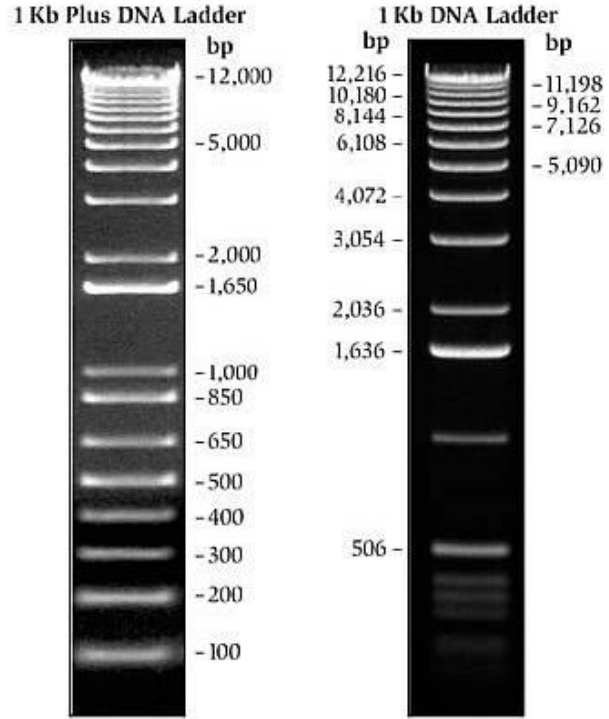
13. Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Beachy, R. N., & Fauquet, C., 2001, Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25–33.
14. Dennehey, B. K., Retersen, W. L., Ford-Santino, C., Pajeau, M., & Armstrong, C. L., 1994, Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene *bar* in maize transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(1), 1–7.
15. Du, H., Wu, H., Yan, J., Li, J., & Tnos, I. G. U. S., 2010, Effects of basal media , salt concentrations , antioxidant supplements and co-effects on the *Agrobacterium*- mediated transformation efficiency in maize. *Journal of Biotechnology*, 9(8), 1135–1143.
16. Finer, J. J., Finer, K. R., & Ponappa, T., 1999, Particle bombardment mediated transformation. *Plant Biotechnology-Bk: New Products and Applications*, 240, 59–80.
17. Finer, J. J., & McMullen, M. D., 1990, TRANSFORMATION OF COTTON (*GOSSYPIUM-HIRSUTUM-L*) VIA PARTICLE BOMBARDMENT. *Plant Cell Reports*, 8(10).
18. Finer, J. J., & McMullen, M. D., 1991, TRANSFORMATION OF SOYBEAN VIA PARTICLE BOMBARDMENT OF EMBRYOGENIC SUSPENSION CULTURE TISSUE. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 27P(4).
19. Frame, B R, Shou, H. X., Chikwamba, R. K., Zhang, Z. Y., Xiang, C. B., Fonger, T. M., Pegg, S. E. K., et al., 2002, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*, 129(1).
20. Frame, Bronwyn R, McMurray, J. M., Fonger, T. M., Main, M. L., Taylor, K. W., Torney, F. J., Paz, M. M., et al., 2006, Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Reports*, 25(10).
21. Frame, Bronwyn R, Zhang, H., Cocciolone, S. M., Sidorenko, L. V, Dietrich, C. R., Pegg, S. E., Zhen, S., et al., 2000, Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 36(1), 21–29.
22. Gordonkamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V, et al., 1990, TRANSFORMATION OF MAIZE CELLS AND REGENERATION OF FERTILE TRANSGENIC PLANTS. *Plant Cell*, 2(7).
23. Graj, D. J., & Conger, B. V., 1985, Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4(2), 123–133.

24. Haspolat, I., 2012, Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 75–80.
25. IASTATE. (n.d.). *pTF101.1* [online], <http://www.agron.iastate.edu/ptf/procedures/map-1.pdf> [Ziyaret Tarihi: 15.07.2012]
26. IASTATE., 2005, *Particle bombardment of Hi II immature zygotic embryos and recovery of transgenic maize plants* [online], <http://www.agron.iastate.edu/ptf/protocol/Embryobb.pdf> [Ziyaret Tarihi: 10.11.2011]
27. ISAAA, 2006, *Pocket K No. 17: Genetic Engineering and GM Crops* [online], ISAAA, <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/17/default.asp>, [Ziyaret Tarihi: 10.11.2012]
28. ISAAA, 2012a, *PocketK No. 16: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2011* [online], ISAAA, <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>, [Ziyaret Tarihi: 10.11.2012]
29. ISAAA, 2012b, *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*[online], ISAAA, <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/pptslides/default.asp> [Ziyaret Tarihi: 26.10.2012]
30. Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E., & Maliga, P., 1988, STABLE GENETIC-TRANSFORMATION OF INTACT NICOTIANA CELLS BY THE PARTICLE BOMBARDMENT PROCESS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22).
31. Klein, T. M., Kornstein, L., Sanford, J. C., & Fromm, M. E., 1989, GENETIC-TRANSFORMATION OF MAIZE CELLS BY PARTICLE BOMBARDMENT. *Plant Physiology*, 91(1).
32. Malthus, T., 1798, *An Essay on the Principle of Population* [online], London, <http://129.237.201.53/books/malthus/population/malthus.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 13.11.2012]
33. Manfred, J., 2002, *Hoagland's Solution (Fertilizer For Plants)* [online], UMN, <http://plant-tc.cfans.umn.edu/listserv/2002/log0202/msg00278.html>, [Ziyaret Tarihi: 27.12.2012]
34. Mark, G., 1999, *Biostatics Particle Gun Bombardment of Maize Zygotic Embryos* [online], UMN, <http://plant-tc.cfans.umn.edu/maize-tc/zembbomb.htm> [Ziyaret Tarihi: 06.02.2012]
35. Montague, A., Ziauddin, A. A., Lee, R., Ainley, W. M., Medicago, A., & Ppt, P. A., 2007, High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91(1), 29–36.

36. Murashige, T., & Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
37. Oneto, C. D., Gonzalez, G., & Lewi, D., 2010, Biolistic maize transformation: Improving and simplifying the protocol efficiency. *African Journal of Agricultural Research*, 5(25).
38. Özcan, S. 2009, Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 01–34.
39. Özcan, S., Gürel, E., & Babaoğlu, M., 2004, *Bitki Biyoteknolojisi 2 - Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları* (2nd ed.). S.Ü. Vakfı Yayınları.
40. Petrillo, C. P., Carneiro, N. P., Corsetti Purcino, A. A., Siqueira Carvalho, C. H., Alves, J. D., & Carneiro, A. A., 2008, Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *PESQUISA AGROPECUARIA BRASILEIRA*, 43(3), 371–378.
41. Pgreen. (n.d.). *pGreen0229* [online]. pGreen, <http://www.pgreen.ac.uk/JIT/pG0229.htm>, [Ziyaret Tarihi: 10.10.2010]
42. Register, J. C., Peterson, D. J., Bell, P. J., Bullock, W. P., Evans, I. J., Frame, B., Greenland, A. J., et al., 1994, STRUCTURE AND FUNCTION OF SELECTABLE AND NON-SELECTABLE TRANSGENES IN MAIZE AFTER INTRODUCTION BY PARTICLE BOMBARDMENT. *Plant Molecular Biology*, 25(6), 951–961.
43. Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B., & Şahin, G., 2008, MİKOTOKSİNLER: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28, 63–92.
44. Sanford, J. C., Devit, M. J., Russell, J. A., Smith, F. D., Harpending, P. R., Roy, M. K., & Johnston, S. A. , 1991, AN IMPROVED HELIUM-DRIVEN BIOLISTIC DEVICE. *Technique (Philadelphia)*, 3(1), 3–16.
45. Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., & Duncan, D., 2006, Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Reports*, 25(4).
46. Siqueira Carvalho, C. H., Bohorova, N., Bordallo, P. N., Abreu, L. L., Valicente, F. H., Bressan, W., & Paiva, E., 1997, Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports*, 17(1), 73–76.
47. Songstad, D. D., Armstrong, C. L., Petersen, W. L., Hairston, B., & Hinchee, M. A. W., 1996, Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi-II immature embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(3).

48. SONGSTAD, D. D., Duncan, D., & Widholm, J. M., 1988, Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Reports*, 7(4), 262–265.
49. Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., & Botterman, J., 1987, CHARACTERIZATION OF THE HERBICIDE-RESISTANCE GENE BAR FROM STREPTOMYCES-HYGROSCOPICUS. *Embo Journal*, 6(9).
50. TMO, 2011a, *2010 Yılı Hububat Raporu* [online], TMO, <http://www.tmo.gov.tr> [Ziyaret Tarihi: 21.08.2011]
51. TMO, 2011b, *YEM AMACLI KULLANILMAK İSTENEN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ MON810 MISIR ÇEŞİDİ VE ÜRÜNLERİ İÇİN BİLİMSEL RİSK DEĞERLENDİRME RAPORU* [online], TMO, <http://www.tbbdm.gov.tr/Files/rapor/risk/MON810.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 17.10.2012]
52. TMO, 2012, *TMO 10/2012 Hububat Bülteni* [online], TMO, <http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/bultenler/2012/hububatbulten09102012.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 17.10.2012]
53. Vain, P., McMullen, M. D., & Finer, J. J., 1993, OSMOTIC TREATMENT ENHANCES PARTICLE BOMBARDMENT-MEDIATED TRANSIENT AND STABLE TRANSFORMATION OF MAIZE. *Plant Cell Reports*, 12(2), 84–88.
54. Van Herbariumu. (n.d.). *Van Herbariumu Zea mays* [online], <http://www.vanherbarium.yyu.edu.tr/flora/azortandir/zeamama/index.htm>, [Ziyaret Tarihi: 13.10.2012]
55. Vega, J. M., Yu, W., Kennon, A. R., Chen, X., & Zhang, Z. J., 2008, Improvement of Agrobacterium-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports*, 27(2), 297-305
56. Wang, K., & Frame, B., 2009, Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 526, 29-45
57. Wang, K., Frame, B., & Marcell, L., 2003, Maize Genetic Transformation. In P. K. Jaiwal & R. P. Singh (Eds.), *Plant Genetic Engineering Vol 2: Improvement of Major Food Crops* (pp. 175–217).
58. Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., et al., 2001, Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports*, 20(5), 29-436
59. Wu, L. M., Wei, Y. M., & Zheng, Y. L., 2006, Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(4), 530-534

60. Yao, Q., Cong, L., Chang, J. L., Li, K. X., Yang, G. X., & He, G. Y., 2006, Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3737-3746.
61. Yentür, S., 2003, *Bitki Anatomisi* (3rd ed.), İstanbul Üniversitesi Yayınları.

**EK**

Tez çalışması süresinde kullanılan markır ladderler. Her iki markır ladder da invitrogen markadır.

## **ÖZGEÇMİŞ**

21.08.1988 tarihinde İstanbul'da doğdum. Orta öğretimimi Üsküdar Burhan Felek Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde 2002 yılında tamamladım. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne girip, son sene tercih ettiğim Bitki Biyoteknolojisi Kümesi'nden 2006 yılında mezun oldum. Yine aynı tarihte İstanbul Üniversitesi Botanik Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.