



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI İLE GEN
AKTARILMIŞ ARPA'DA (*Hordeum vulgare* L.) TRANSGEN
ENTEGRASYONUNUN ANALİZİ**

Cüneyt UÇARLI

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Doç. Dr. Filiz GÜREL

Haziran, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI İLE GEN
AKTARILMIŞ ARPA'DA (*Hordeum vulgare* L.) TRANSGEN
ENTEGRASYONUNUN ANALİZİ**

Cüneyt UÇARLI

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Doç. Dr. Filiz GÜREL

Haziran, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 23/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik ve Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Filiz Gürel (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni Kuru
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şule Arı
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Hakan Bermek
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 2940 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve bu tez çalışmam boyunca beni teşvik eden, bilimsel ufkumun genişlemesine yardımcı olan ve çalışmalarımda bana her türlü desteği sağlayan sayın danışman hocam Doç. Dr. FİLİZ GÜREL'e,

3 yıl boyunca çalışmamın deney aşamasında tecrübelerinden yararlandığım asistan arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan ve emekleri geçen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her türlü şartta hep yanımda olan ve olacaklarını bildiğim SEVGİLİ AİLEM'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2010

Cüneyt UÇARLI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
ŞEKİL LİSTESİ	İV
TABLO LİSTESİ.....	VI
SEMBOL LİSTESİ	VII
ÖZET	IX
SUMMARY	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ARPA (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	3
2.2. ARPADA GEN AKTARIM YÖNTEMLERİ	5
2.3. GEN AKTARILMIŞ BİTKİLERDE TRANSGEN DİZİLERİNİN ANALİZİ	9
2.3.1 “Thermal Asymmetric Interlaced” Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“TAIL” PZR)	10
3. MALZEME VE YÖNTEM	14
3.1. BİTKİ MATERYALİ	14
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ŞARTLARI	14
3.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI	15
3.3.1. Kullanılan Irk ve Plazmidler	15
3.3.2. Bakteri Üretimi ve Transformasyon Koşulları	15
3.3.3. Transformasyon Sonrası Gen Anlatımının Belirlenmesi	16

3.4. TRANSGEN DİZİLERİNİN GENOMDAKİ YERLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ	17
3.4.1. Arpa Yapraklarından Genomik DNA İzolasyonu	17
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	18
3.4.3. Aktarılan Genlerin “Southern” DNA Melezlemesi ile Belirlenmesi	21
3.4.4. Aktarılan Genlerin “TAIL” (“Thermal Asymmetric Interlaced ”) PZR ile Belirlenmesi	22
3.4.5. Jelden Geri Kazanım ve Veritabanı Araştırması	26
4. BULGULAR	27
4.1. ARPA EMBRİYOLARINA <i>AGROBACTERIUM</i> ARACILIĞI İLE GEN AKTARIMI	27
4.2. ARPA EMBRİYOLARINDA GUS GEN ANLATIMININ HİSTOLOJİK OLARAK BELİRLENMESİ	29
4.3. TRANSGEN ENTEGRASYONUNUN MOLEKÜLER ANALİZLERİ	29
4.3.1. PZR ile Markır Genlerin Çoğaltımı	29
4.3.2. Southern DNA Melezlemesi Çalışmaları	31
4.3.3. “TAIL“ PZR Analizleri	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Bereketli Hilal; arpanın (<i>H. vulgare</i> ssp. <i>spontaneum</i>) kültüre alındığı bölge ve yabancı atalarının farklı bölgelere dağılım süreci4
Şekil 2.2	: <i>Agrobacterium</i> 'un enfeksiyonu sırasında rol oynayan faktörler ve hücrel olaylar9
Şekil 2.3	: "TAIL" PZR yönteminin aşamaları12
Şekil 3.1	: İ.Ü. Biyoloji Bölümü Botanik Bahçesi'nde tarla ekimi yapılan alan b) Golden promise ve c) Tokak 157/37'nin başak morfolojisi14
Şekil 3.2	: <i>Agrobacterium</i> aracılı gen aktarımında kullanılan pCAMBIA2301 vektöründe T-DNA bölgesindeki genlerin yerleşimi15
Şekil 3.3	: Klasik PZR'da ve "TAIL" PZR'da kullanılan primerlerin pCAMBIA2301 vektör kasetindeki konumları20
Şekil 4.1	: a) ve b) İki günlük Tokak 157/37 embriyolarının MS besiyerindeki görünümü, c) Embriyoların <i>Agrobacterium</i> uygulamasından sonra seçici besiyerinde çimlenmesi ve gen aktarılmayan embriyolarla karşılaştırılması27
Şekil.4.2	: Tokak 157/37 ve Golden promise çeşitlerinin gen aktarılmış embriyolarından gelişen bitkilerin 40 gün sonraki görünüşleri28
Şekil 4.3	: Tokak 157/37 embriyolarında kök ve sürgün uçlarında tespit edilen GUS aktivitesine örnekler29
Şekil 4.4	: Tokak 157/37 çeşidinde GUS geninin PZR ile çoğaltımı ve ürünlerin %0.9'luk jelde gösterilmesi30
Şekil 4.5	: Tokak 157/37 çeşidinde NPT II geninin PZR ile çoğaltımı ve ürünlerin %0.9'luk jelde gösterilmesi31
Şekil 4.6	: <i>BamHI</i> ile kesilmiş ve 35 voltta gün boyu yürütülen DNA örnekleri %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü32
Şekil 4.7	: Tokak 157/37 transformantları; TTC ve TTD DNA'larının AD1, AD2, AD3 ve AD4 RD primerleri ve kullanılarak gerçekleştirilen "TAIL" PZR ikinci ve üçüncü reaksiyon çalışmalarında elde bant profilleri32
Şekil 4.8	: TT3 veTT4 transformant DNA'ların SP2 ve SP3 spesifik primerleri ve farklı RD primerlerinin kullanılmasıyla yapılan "TAIL" PZR ikinci ve üçüncü reaksiyon ürünleri33
Şekil 4.9	: TTA veTTB transformant DNA'ların TR3 ve SP4 spesifik primerleri ve farklı RD primerlerinin kullanılmasıyla yapılan "TAIL" PZR üçüncü ve dördüncü reaksiyon ürünleri33
Şekil 4.10	: "TAIL" PZR sonrası elde edilen ve dizilenen bölgenin Chromas 2.32 programı ile incelenmesi34

Şekil 4.11	: Fasta formatına çevrilen dizinin NCBI veritabanında BLASTN programı ile analiz edilmesi35
Şekil 4.12	: a) PCAMBIA2301 vektörüne ait T-DNA'nın arpa genomuna teorik olarak bağlanması. b) Golden promise GT2 transformantında tespit edilen T-DNA sağ sınır dizileri (kalın harf) ile T-DNA'ya ait diziler ve bu diziye bitişik arpa <i>Beta-galaktosidaz</i> genine ait dizi36
Şekil 4.13	: Tokak 157/37 TT3 transformantında tespit edilen sağ sınıra yakın T-DNA dizisi ve bu diziye bitişik arpa ısı şok proteinine (<i>hsp</i>) ait dizi b) TTA transformantında tespit edilen arpa genom/T-DNA bağlantısı37
Şekil 4.14	: Dizilerin Washington Üniversitesinin veritabanınının kullanılarak arpa genomuyla karşılaştırılması38

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Arpa genomik kaynakları	7
Tablo 2.2	: Arpanın farklı genotipleri ile yapılan <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyon çalışmaları ve sonuçları	8
Tablo 3.1	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımında kullanılan besiyeri ve solüsyonların içerikleri	16
Tablo 3.2	: GUS boyama çözeltilisinin içeriği	17
Tablo 3.3	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler	18
Tablo 3.4	: β -glukuronidaz (GUS) işaret geni ve <i>neomisin fosfattransferaz II</i> (NPT II) genlerinin PZR ile çoğaltımında kullanılan primerler	19
Tablo 3.5	: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	19
Tablo 3.6	: Klasik PZR döngüleri	19
Tablo 3.7	: TAIL PZR da kullanılan spesifik ve rastgele dejenere (RD) primerler	22
Tablo 3.8	: “TAIL” PZR’de kullanılan döngü koşulları	23
Tablo 3.9	: “TAIL” PZR birincil reaksiyon içeriği	24
Tablo 3.10	: “TAIL” PZR ikincil reaksiyon içeriği	24
Tablo 3.11	: “TAIL” PZR üçüncül reaksiyon içeriği	25
Tablo 3.12	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar	26
Tablo 4.1	: 40-45 gün sonunda seçici besiyerinde (SB) yaprakları yeşil kalan ve kök veren bitkilere ait veriler	28
Tablo 4.2	: DNA izolasyonu yapılan bitki sayısı ve GUS ve NPT II geni tespit edilen gen aktarılan bitki sayısı	30
Tablo 4.3	: Tokak 157/37 ve Golden promise DNA örneklerinin <i>BamHI</i> ve <i>NcoI</i> ile kesildikten sonra farklı problemlerle yapılan southern melezleme çalışmaları	31

SEMBOL LİSTESİ

BAC	: “bacterial artificial chromosome”
bç	: baz çift
BLAST	: “basic local alignment search tool”
CaMV 35S	: “Cauliflower mosaic virus” 35 S dizisi
CTAB	: “cetyl trimethyl ammonium bromide”
cv	: “cultivar”
ddH₂O	: iki kere distillenmiş H ₂ O
diğ.	: diğerleri
dk	: dakika
dNTP	: deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: “ethylenediaminetetraacetic acid”
EST	: “expressed sequence tag”
FISH	: floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
g	: gram
GFP	: yeşil floresan mikroskop
GUS	: β -glukuronidaz
<i>hpt</i>	: <i>higromisin fosfotransferaz</i>
HCl	: hidroklorür
IBSC	: “International Barley Sequencing Consortium”
İ.Ü.	: İstanbul Üniversitesi
Kb	: kilo baz
L.	: Linnaeus
l	: litre
LiCl	: lityum klorür
mA	: mili amper
MES	: “4-morpholineethanesulfonic acid sodium salt”
mg	: miligram
MgCl₂	: magnezyum klorür
mha	: milyon hektar
mmHg	: milimetre civa basıncı
ml	: mililitre
μl	: mikrolitre
mM	: milimolar
μM	: mikromolar
MS	: Murashige & Skoog
mton	: milyon ton
N	: normal
NaCl	: sodyum klorür
NOS Poli A	: poli adenillenmiş nopalın sentaz
NPT II	: <i>neomisin fosfotransferaz II</i>
OD	: optik densite

OE	: olgunlaşmamış embriyo
pH	: hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
PVP	: “polyvinyl pyrolidone”
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
RD	: rastgele dejenere
RFLP	: “restriction fragment length polymorphism”
rpm	: dönme sayısı / dakika
sn	: saniye
SNP	: “single-nucleotide polymorphism”
sp	: spesifik primer
SSR	: “simple sequence repeat”
SVB	: “strawberry vein banding caulimovirus”
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TAIL	: “thermal asymmetric interlaced”
T-DNA	: transfer DNA
Ti	: tümör indükleyici
Tm	: erime sıcaklığı
X-Gluc	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glukuronid
v	: hacim
V	: Volt
vir	: virulans

ÖZET

***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI İLE GEN AKTARILMIŞ ARPA'DA (*Hordeum vulgare* L.) TRANSGEN ENTEGRASYONUNUN ANALİZİ**

Bu tez çalışmasında, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarılmış arpada (*Hordeum vulgare* L.) transgen entegrasyonunun analizi amaçlandı. Bu amaçla, *Hordeum vulgare* L. cvs Tokak 157/37 ve Golden promise olgun embriyolarına *Agrobacterium* aracılığıyla β -glukoronidaz (GUS) ve neomisin fosfattransferaz II (NPT II) genleri aktarıldı. Gen aktarımından 2 gün sonra transformant embriyolarda GUS gen anlatımı histokimyasal boyama ile doku düzeyinde belirlendi. 40-45 gün sonunda antibiyotik içeren seçici besiyerinde %16.6 oranında *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37; ve %10.3 *Hordeum vulgare* cv. Golden promise transformant bitkisinin canlı kaldığı tespit edildi.

Transformant bitkilerde transgen varlığını belirlemek amacıyla öncelikle PZR yapıldı. *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37 bitkilerinin %47'sinde ve *Hordeum vulgare* cv. Golden promise bitkilerinin %44'ünde GUS geni çoğaltıldı. NPT II geni, Tokak 157/37 bitkilerin %77'sinde; Golden promise bitkilerinin %63'ünde pozitif sonuç ortaya koydu.

T-DNA entegrasyonunun analizi için PZR temelli bilinen DNA bölgelerine komşu bilinmeyen dizilerin eldesinde kullanılan "TAIL" PZR yapıldı. "TAIL" PZR'de pCAMBIA2301 ikili vektörüne özgün spesifik primerler ile rastgele dejenere (RD) primerler kullanıldı. Analiz edilen 21 bitkiden 3'ünde arpa genomunda T-DNA girişi tespit edildi. Elde edilen arpa genom dizileri veritabanlarında analiz edildiğinde T-DNA'nın β -galaktosidaz, *hsp* ve *hbc8* gen bölgelerine girdiği belirlendi.

SUMMARY

ANALYSIS OF THE TRANSGENE INTEGRATION IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) FOLLOWING *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GENE TRANSFER

Determination of the transgene integration in barley (*Hordeum vulgare* L.) following *Agrobacterium* mediated transformation was aimed in this thesis work. To this end, β -glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase II (NPT II) genes were transferred to mature embryos of the *Hordeum vulgare* L. cvs. Tokak 157/37 and Golden promise via *Agrobacterium*. GUS gene expression was observed in transformant embryos at the tissue level by histochemical staining 2 days after *Agrobacterium* infection. After 40-45 days, 16.6% of the *Hordeum vulgare* cv. Tokak157/37 and 10.3% of the *Hordeum vulgare* cv. Golden promise transformants survived on selection medium including antibiotics.

PCR was performed to identify putative transgenes in the transformed plants. 47% of the *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37 plants and 44% of the *Hordeum vulgare* cv. Golden promise plants were positive for GUS. On the other hand, 77% of the Tokak 157/37 plants and 63% Golden promise plants were positive for NPT II.

TAIL-PCR was used to recover of unknown DNA fragments flanking known sequences was performed for T-DNA integration analysis. Primers which are spesific for pCAMBIA2301 binary vector and arbitrarily degenerated (AD) primers were used for TAIL-PCR. T-DNA insertion was detected in 3 plants of the 21 plants analysed. When the obtained barley genome sequences were analysed by genomic databases; T-DNA has been found in β -galactosidase, hsp, hbc8 genes.

1. GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisinin en önemli uygulama alanlarından biri gen aktarımı yoluyla bitkilere üstün özelliklerin kazandırılmasıdır. 1983 yılında tütüne *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla ilk kez gen aktarımı yapılmış, bu teknoloji günümüzde çok sayıda bitki türünde denenerek bazı ticari bitkilerde üretime geçilmiştir. Yakın gelecekte transgenik ürünlerde artış beklendiğinden, aktarılan yabancı genlerin analizi de önem kazanmıştır. Yabancı genlerin bitki genomundaki yerleşimi halen çok iyi anlaşılmış bir konu değildir (Salva-Garrido *ve diğ.*, 2004).

Bitkilere aktarılan yabancı genlerin (transgen) konak genomdaki fiziki pozisyonları ile birlikte genetik harita konumlarının bilinmesi insersiyon bölgelerinin doğrulanmasını sağlayacağı gibi transgen insersiyon şeklinin (“pattern”) daha iyi anlaşılmasını da sağlayacaktır. Ayrıca transgenin bitki genomunda bağlandığı genomik çevrenin anlaşılmasında ve transgen girişinin rastgele bir işlem olup olmadığının belirlenmesinde önemli bir başlangıç noktası olacaktır.

cDNA kullanılarak genomik kütüphanelerin görüntülenmesi bilinen genomik dizilerden komşu DNA dizilerinin izole edilmesinde tercih edilen bir yöntemdir (Michiels *ve diğ.*, 2003). Ancak kütüphanelerin kurulması ve görüntülenmesi çok fazla emek gerektirmekte ve pahalıdır. Diğer yandan PZR temelli genom adımlaması (“genome walking”) DNA dizisi bilinen dizilere komşu bilinmeyen DNA parçalarının tanımlanmasında hızlı ve güvenilirdir. Ters (“invers”) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Ochman *ve diğ.*, 1988), adaptör bağlama aracılı PZR ve “TAIL” (“Thermal asymmetric interlaced”) PZR (Liu ve Chen, 2007) gibi birkaç başarılı genom adımlaması stratejisi geliştirilmiştir. Bunların bilinen diziye bitişik dizinin tanımlanmasında birbirlerine göre üstünlükleri ve sınırlamaları bulunmaktadır.

“TAIL” PZR bilinen dizilere bitişik bilinmeyen DNA parçalarının izole edilmesi ve tanımlanmasında kullanılan PZR temelli basit ve güçlü bir yöntemdir. Bu yöntemde bilinen diziye özgü, erime sıcaklığı (T_m) yüksek spesifik primerler ile 15 bç’lik kısa, T_m’leri düşük rastgele dejenere (RD) primerlerin kullanıldığı çok basamaklı termal döngüler tasarlanır. Bu şekilde spesifik ve spesifik olmayan ürünlerin çoğaltım verimlilikleri sıcaklıkla kontrol edilir. Bu yöntem basittir çünkü PZR’den önce DNA’nın kesimine ve sonrasında melezleme ve primer etiketlemesi gibi işlemlere gerek duyulmaz. Basit agaroz jel analizi ile ürün özgüllüğünün doğrulanabilir olması, genomdaki tek kopya dizilerinin çoğaltılabilir olması ve diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç alınabilmesi yöntemi üstün kılmaktadır.

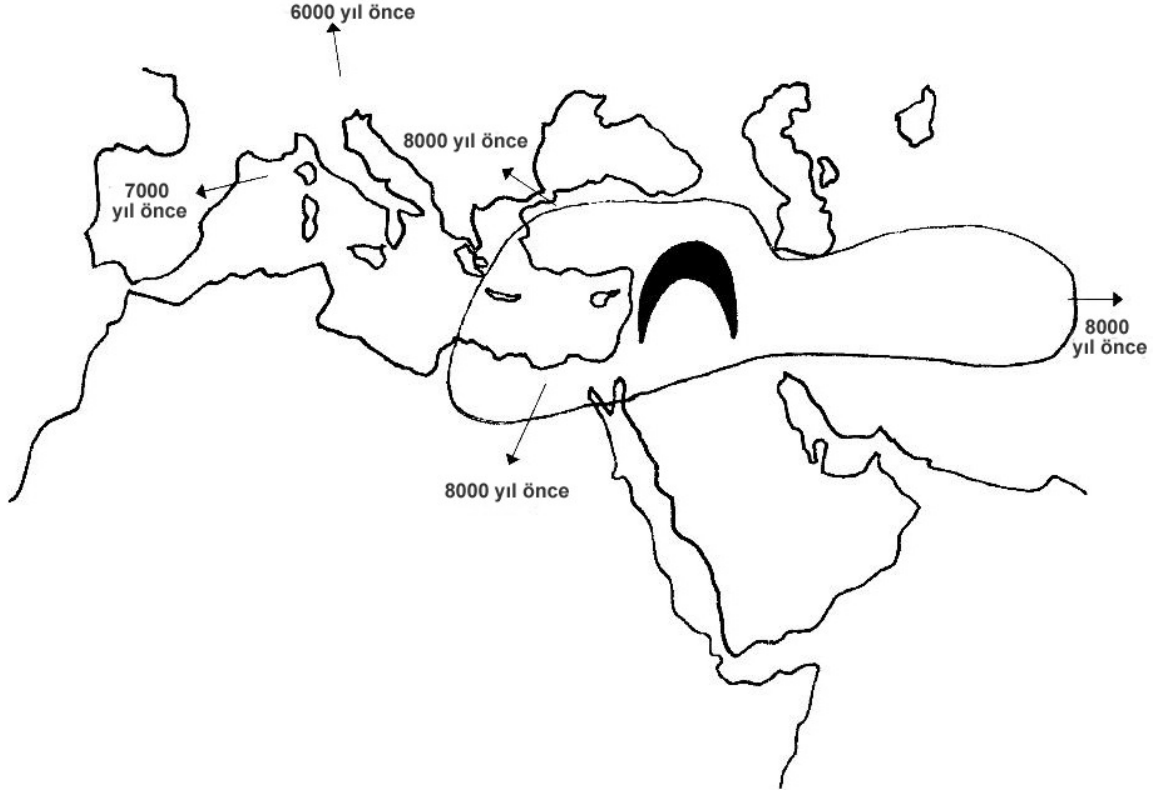
Bu çalışmada *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarılmış arpa dokularında yabancı gen (transgen) entegrasyonunun analiz edilmesi amaçlanmıştır. Transgenin yanında yer alan bölgelerin analiz edilmesi ile transgen insersiyonu hakkında detaylı bilgiler elde edilebilir. *Arabidopsis* ve çeltikte T-DNA insersiyonu ile ilgili geniş çapta çalışmalar yapılmasına rağmen, arpa gibi iri taneli tahıllarda bu çalışmalar az sayıdadır. Arpada transgen entegrasyonunun anlaşılmasına yönelik çalışmalar, yabancı genlerin bitki genomuna insersiyonu ve kararlılığı hakkında yeni bilgiler verecektir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ARPA (*HORDEUM VULGARE L.*)

Arpa (*Hordeum vulgare L.*), Eski Dünya’da; Bereketli Hilal “Fertile Crescent“ (Şekil 2.1) adı verilen bölgede kültüre alınmış en eski tahıl bitkilerinden biridir (Zohary ve Hopf, 1993). *Hordeum vulgare L.* aynı zamanda *Poaceae* ailesinin *Triticeae* oymağındaki 32 türden biridir. Diploid ($2n=2x=14$) olan arpanın genom büyüklüğü 5.6×10^9 bç olup DNA’nın çoğunluğu tekrarlı dizilerden oluşmaktadır (Schulman ve diğ., 2004). Uzun süreçte kültüre alınmış arpanın iki alt ata tür olan *Hordeum vulgare ssp. vulgare* ve *ssp. spontaneum*’dan evrimleştiği kabul edilmektedir. Bu alt türler germplazm çeşitliliği için primer gen havuzu oluşturmuştur (Kasha, 2007). Diğer 30 *Hordeum* türünün (Von Bothmer ve diğ. 2003), *H. bulbosum*’un doğada melezlenmesiyle ortaya çıktıkları ve sekonder gen havuzunu oluşturdukları düşünülmektedir.

Arpa, dünyada gerek üretim gerekse ekilen alan olarak, mısır (*Zea mays L.*), buğday (*Triticum aestivum L.*) ve çeltikten (*Oryza sativa L.*) sonra dördüncü sırada yer almaktadır (<http://faostat.fao.org/2008>). Türkiye’de ise 5.9 milyon tonluk üretim hacmi ve 2.7 milyon hektarlık ekim alanıyla buğdaydan (*Triticum aestivum L.*) sonra ikinci sırada yer alır (<http://faostat.fao.org/2008>). Ülkemizin tüm bölgeleri iklim koşulları açısından arpa yetiştirilmesine uygunluk göstermekle birlikte ekim alanları daha çok İç Anadolu Bölgesi’nde yoğunlaşmıştır. Üretimi yapılan arpanın çok büyük bir kısmı yurt içinde hayvan yemi olarak, kalan kısmı ise maltlık olarak bira sanayinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.1: Bereketli Hilal; arpanın (*H. vulgare ssp. spontaneum*) költüre alındığı bölge ve yabani atalarının farklı bölgelere dağılım süreci (Backes ve diğ., 2006)

Arpa besin içeriği olarak insan sağlığına faydalı özellikler taşır. Bu faydalar temelde arpa tanelerindeki yüksek β -glukan içeriğinden kaynaklanmaktadır (Lifschitz ve diğ. 2002). β -glukan, insanda yemeğin ardından oluşan şekerin emilim oranını azaltarak glisemik yanıtta azalmayı sağlar (Kim ve diğ., 2005). Behall ve diğ. (2004) 3-6 g. arpa türevli β -glukan içeren bir günlük diyetin toplam kolesterolde anlamlı derecede düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla β -glukan vücuttaki total kolesterolü azaltarak kardiyovasküler hastalık riskini de düşürmektedir. Diğer yandan, lizin ve treonin amino asitleri bakımından fakir olması insan ve monogastrik hayvanlar için arpanın besinsel değerini sınırlamaktadır.

Arpa doğal diploid olması ve genomunun diğer küçük taneli tahıllarla benzerliğinden dolayı genetik model sistem olarak tanımlanmıştır (Shewry, 1992). Son 20 yıl boyunca arpa genomunun sistematik analizini kolaylaştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar; moleküler markırların haritalanması, EST

koleksiyonlarının oluşturulması, BAC kütüphaneleri ile mutant koleksiyonların kurulması ve etkili gen aktarım yöntemlerinin geliştirilmesini kapsamaktadır. Fiziksel harita oluşturmaya ve arpa genlerinin dizilenmesine yönelik yoğun çabalara ek olarak arpa genomundaki ilerlemeler gen fonksiyonlarının anlaşılmasına büyük katkı sağlayacaktır. Arpadaki genomik çalışmalara ilişkin bilgi verici veritabanları Tablo 2.1 de verilmiştir.

2.2. ARPADA GEN AKTARIM YÖNTEMLERİ

Arpada doğrudan gen aktarım yöntemleri ile kararlı transformasyonun sağlandığı raporlar 1990'ların ilk yarısına kadar uzanmaktadır (Lazzeri *ve diğ.*, 1991; Jaehne *ve diğ.*, 1994; Wan ve Lemaux, 1994). Bu türe *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı 1997 yılında yapılmıştır (Tingay *ve diğ.*, 1997). Daha sonraları arpanın farklı dokularına (polen kültürleri, izole edilmiş ovüller) transformasyonu sağlamak için çeşitli prosedürler geliştirilmiştir. Transformasyon etkinliğinin artırılması, genotipe bağlılığın azaltılması, kararlı ("stable") transgen anlatımı ve belirli genlerin anlatımının kontrollu şekilde azaltılması transformasyonun başlıca hedefleridir.

Olgunlaşmamış embriyolara mikropartikül bombardımanı ile gen aktarımı çok sayıda transgenik arpanın eldesini sağlayabilmektedir (Wan ve Lemaux, 1994). Diğer yandan, bu yöntemde transgenlerin anlatımında, bitki genomuna entegrasyonunda ve kararlılığında çeşitli sorunlar olduğu bildirilmiştir. Genoma giren genlerin kopya sayısının kontrol edilememesi ve özellikle kopya sayısının çokluğu gen sessizleşmesiyle sonuçlanabilmektedir. *Agrobacterium* aracılığı ile yapılan gen aktarımında ise genellikle düşük transgen kopyalı bitkiler elde edilmektedir (Shrawat *ve diğ.*, 2007; Hensel *ve diğ.*, 2008). Aynı zamanda uygulama yapılan bitkinin dölllerinde ökromatik bölgelere entegre olmuş T-DNA kaynaklı genlerin kararlı olduğu belirlenmiştir (Shou *ve diğ.*, 2004).

Agrobacterium transformasyonu yapılan çeltik bitkileri, mikropartikül bombardımanı yöntemi ile elde edilenlerden daha yüksek verimlilik ("fertility") göstermişlerdir (Dai, 2001). Bu nedenlerden dolayı, T-DNA aracılı mutagenез gibi yöntemler son yıllarda tahıllarda *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonu tercih edilir kılmıştır. Bu

yöntemin başlıca olumsuz yönleri sadece belli doku ve çeşitlere uygulanabilmesi ve bakterinin enfeksiyon sonrası doku kararması ve nekrozuna neden olmasıdır (Cheng ve diğ. 2004). Arpada *Agrobacterium*-aracılığıyla transformasyonunun başarısında genotip önemli bir faktördür (Shrawat ve diğ. 2007). Özellikle, deneysel model olan Golden promise'in kullanıldığı çok sayıda çalışmada, bu genotipte transformasyon başarısının diğer ticari çeşitlerden daha fazla olduğu görülmektedir (Goedeke ve diğ. , 2007) (Tablo 2.2).

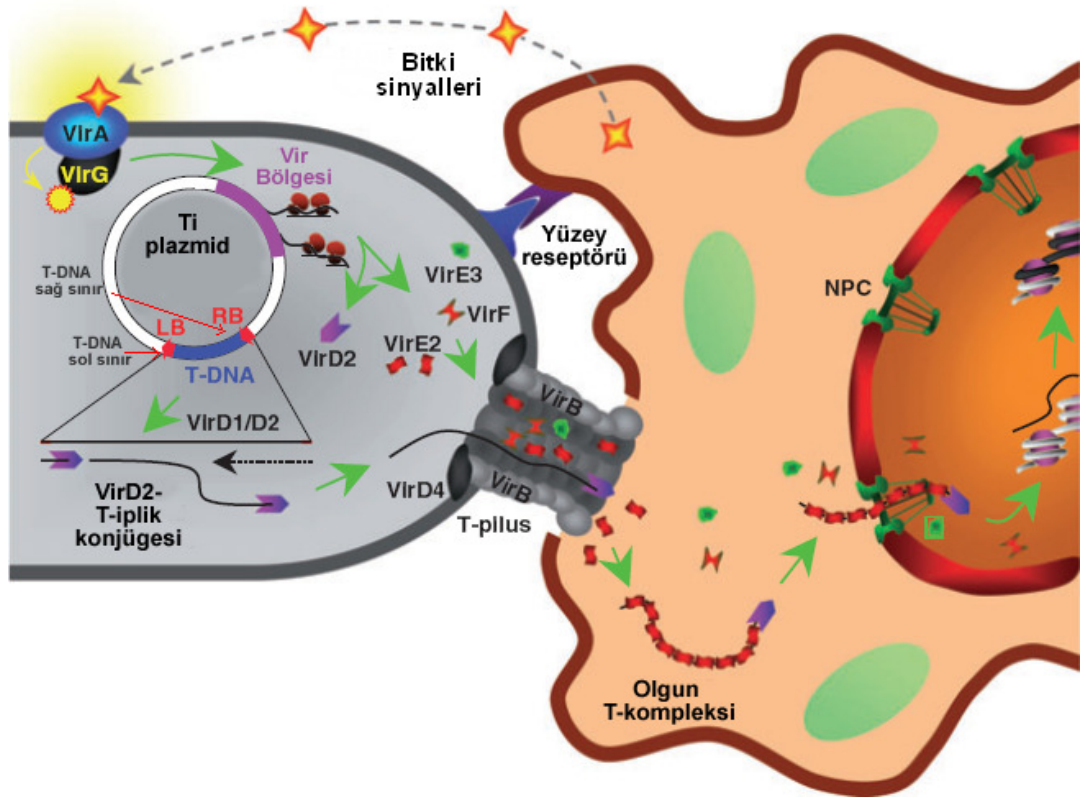
Agrobacterium ile transformasyon bakterinin taşıdığı Ti (Tümör indükleyici) plazmidi üzerindeki *vir* genlerinin anlatımı ile başlar. Bu süreçte yaralanmış bitki hücrelerinden salınan küçük fenolik bileşik ve şekerlerin yanısıra VirA/VirG proteinlerinin yönettiği hücre içi sinyal iletimi önemli rol oynar. Ti plazmidi üzerindeki bir DNA parçası (Transfer DNA; "T-DNA"), VirD2/VirD1 endonükleazları tarafından kesilerek tek iplikli DNA oluşur ve bu yapı proteinlerle bir kompleks oluşturur. T-DNA parçası 25 bazlık sınır dizileri arasında yer almaktadır ve bitki hücrelerine taşınması için bu sınır dizilerinin varlığı gereklidir (Şekil 2.2). 5' ucunda VirD2 ile kovalent bağ yaparak bir kompleks oluşturan T-DNA, Tip IV salgılama sistemi (T4SS) ile bitki hücrelerine taşınır (Christie ve diğ., 2005) ve konak genomuna entegre olur. T-DNA'nın taşınma süreci, *vir* proteinlerini de içeren bakteri kaynaklı faktörlerin yanısıra konak bitki sitoplazmasındaki proteinler tarafından da kontrol edilmektedir (Gelvin, 2000; Tzfira ve Citovsky 2002).

Tablo 2.1: Arpa genomik kaynakları Sreenivasulu'dan (2008) düzenlenmiştir

Veri tabanı	URL Web sayfası	Açıklama
Arpa Genetik Stok	http://ace.untamo.net/cgi-bin/ace/searches/basic	Arpa mutantlarının morfolojik ve genetik yapıları hakkında bilgi sağlamaktadır.
ABD Arpa Germplazm	http://barleyworld.org/northamericanbarley/germplasm.php	Arpa rekombinant kromozomları, Kuzey Amerika populasyonları ve gen haritaları hakkında bilgi içermektedir.
EBDB	http://pgrc-35.ipk-gatersleben.de/portal/page/portal/PG_BICGH/P_BICGH_RESOURCES/P_BICGHI_RESEBDB	BICGH/P Avrupa arpa veritabanı (EBDB) girişi sunmaktadır.
ICARDA varyeteleri	Arpa http://www.icarda.cgiar.org/Crops_Varieties.htm#Barley	1977-2005 yılları arasında ICARDA'nın tanımladığı arpa varyetelerinin listesini sağlamaktadır.
Arpa TILLING	http://www.scri.ac.uk/research/genetics/BarleyTILLING	Ters Genetik Platformu.
CR-EST	http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php	232.000'den fazla arpa EST'si sunan veritabanı.
HarvEST	http://harvest.ucr.edu	Unigene dizileri içeren Arpa EST veritabanı.
HvGI	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=barley	<i>Hordeum vulgare</i> gen endeksi ve fonksiyonel anotasyon bilgileri sunmaktadır.
NCBI arpa genomu	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapviewmap_search.cgi?taxid=4513	Arpa genomik araştırmaları sonucunda bulunan diziler hakkında genel bilgi sağlar.
IBSC	http://barleygenome.org	Uluslararası arpa genomu dizileme konsorsiyumu.
Arpa genomu	http://phymap.ucdavis.edu:8080/barley	Arpa fiziksel harita ve BAC klonları veritabanı.
Arpa fiziksel harita	http://pgrc.ipk-gatersleben.de/kuenzel/barleymap.html	Igri/Franka çeşitleri türevli RFLP bağlantı haritaları.
Arpa genomik	http://barleygenomics.wsu.edu	Arpa moleküler markırları, genetik haritalar, BAC'lar ve mutantlar hakkında bilgi içerir.
Arpa DB	http://ukcrop.net/perl/ace/search/BarleyDB	Arpa germplazmı, moleküler markır, genetik harita ve BAC'lar hakkında bilgi içerir.
Gramene	http://www.gramene.org	Güncel moleküler markır ve tahılların karşılaştırmalı haritalarını sunar.
GrainGenes	http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml	<i>Triticeae</i> veritabanı.
Arpa dbEST SSR	http://www.genome.clemson.edu/projects/barley/ssr.dbest.html	Arpa basit dizi tekrarları (SSR) ve SNP bağlantı haritası.
Arpa SNP veritabanı	http://bioinf.scri.ac.uk/barley_snpdb	SNP bağlantı haritası.
Arpa RFLP veritabanı	http://pgrc.ipk-gatersleben.de/rflp/rflp.html	RFLP markırlarına dayalı arpa haritası.
Barley DArT	http://www.triticarte.com/content/barley_diversity_analysis.html	SSR, RFLP ve STS lokusları ile bağlantılı Arpa DArT haritaları.

Tablo 2.2: Arpanın farklı genotipleri ile yapılan *Agrobacterium* aracılı transformasyon çalışmaları ve sonuçları (Goedeke ve diğ., 2007)'den düzenlenmiştir

Arpa Genotipleri	Kullanılan Eksplant	Etkinlik	Kaynak
cv. 'Golden promise'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	7 bitki/ 100 OE	Tingay ve diğ. 1997
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	12 bitki/ 100 OE	Matthews ve diğ. 2001
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	9.2 bitki/ 100 OE	Murray ve diğ. 2004
	Ovül	0.8 bitki/ 100 ovül	Holme ve diğ. 2006
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	17.9 bitki/ 100 OE	Coronado ve diğ. 2005
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	86.7 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
cv. 'Igri'	Androjenetik polen kültürü	2.2 bitki/ başak	Kumlehn ve diğ. 2006
cv. 'Schooner'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.9 bitki/ 100 OE	Wang ve diğ. 2001
cv. 'Sloop'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.6 bitki/ 100 OE	Murray ve diğ. 2004
cv. 'Chebec'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.6 bitki/ 100 OE	Murray ve diğ. 2004
cv. 'Tafeno'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	2 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
cv. 'Helium'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	2 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.3 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
PF17048-52	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	7 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	8 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
PF18147-52	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.3 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
W122/37.1	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	3.2 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007
cv. 'Optic'	Olgunlaşmamış embriyo (OE)	0.5 bitki/ 100 OE	Hensel ve diğ. 2007



Şekil 2.2: *Agrobacterium*'un enfeksiyonu sırasında rol oynayan faktörler ve hücresel olaylar (Citovsky ve diğ., 2007)

2.3. GEN AKTARILMIŞ BİTKİLERDE TRANSGEN DİZİLERİNİN ANALİZİ

Transgenlerin konak genomdaki organizasyonu bitkilerde derinlemesine araştırılmamıştır (Kohli ve diğ., 2003). Bu nedenle gerek *Agrobacterium* gerekse doğrudan DNA aktarımlarında yabancı DNA'nın entegrasyon mekanizması üzerinde yeterince bilgi yoktur. Transgenlerin entegre olduğu lokuslar transformantlar arasında farklılık gösterebilmekte ve bu durum gen anlatım seviyesi ve kararlılığını etkilemektedir. *Arabidopsis thaliana*, tütün, petunya, pirinç ve mısır gibi bitkilerde yapılan çalışmalar çoğunlukla Southern blot melezlemesine dayanmaktadır. Ek olarak, bilinen dizilere komşu bilinmeyen DNA parçalarının çoğaltılabilmesi için ters ("invers") polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Ochman ve diğ., 1988), adaptör bağlama aracılı PZR ve "TAIL" ("Thermal asymmetric interlaced") PZR yöntemleri geliştirilmiştir (Liu ve Chen, 2007).

2.3.1. “Thermal Asymmetric Interlaced” Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“TAIL” PZR)

“TAIL” PZR sadece polimeraz zincir reaksiyonunun kullanıldığı ve bundan dolayı çok sayıda genom bölgesinin kolayca çoğaltılabileceği bir yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve DNA melezlemede gereken uzun deneysel süreçleri içermemesi bakımından avantajlıdır. Ayrıca, genomda DNA melezlemede belirlenmesi olanaklı olmayan transgen giriş bölgelerini göstermesi açısından üstünlüğü vardır.

Yöntemin temeli entegrasyon bölgesinin çoğaltılabilmesi için vektör dizilerine özgün ve konak genomuna bağlanabilecek rastgele primerlerin kullanıldığı ve bu primerlerin DNA dizilerine bağlanmalarının sıcaklıkla kontrol edildiği üç ya da dört PZR reaksiyonuna dayanmaktadır. “TAIL” PZR için vektör dizisine özgü T_m (erime sıcaklığı) 65°C 'den büyük 3 ya da 4 tane yuvalanmış (“nested”) primer (spesifik primer) ile ardışık reaksiyonda T_m 'i yaklaşık 45°C olan kısa (15-16 bazlık) rastgele dejenere (RD) bir primer kullanılır. Böylece hedef ve hedef olmayan ürünlerin göreceli çoğaltım etkinlikleri sıcaklık ile kontrol edilebilir. Yöntem yüksek bağlanma sıcaklıklarında sadece yüksek T_m 'leri olan spesifik primerlerin hedef moleküle daha etkin şekilde bağlanabilmesi prensibine dayanmaktadır (Liu ve Chen, 2007).

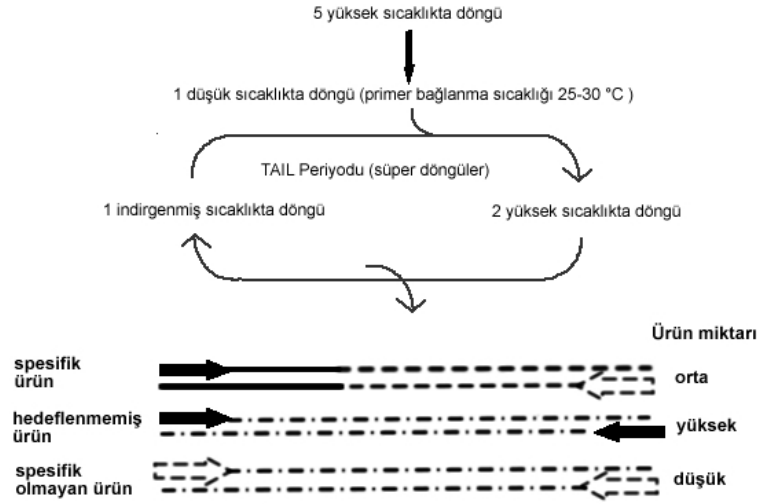
“TAIL” PZR birincil reaksiyonunda, hedef dizide RD primerinin bağlanabileceği bir ya da birden fazla bağlanma noktası yaratılması için düşük sıcaklıkta ($25\text{-}30^{\circ}\text{C}$) PZR döngüsü yürütülür. Daha sonra spesifik primerin etkin şekilde bağlanabileceği iki yüksek sıcaklık (65°C den büyük) döngüsü ve onu takip eden bir indergenmiş sıcaklık ($41\text{-}42^{\circ}\text{C}$) döngüsünün yürütüldüğü TAIL periyodu (süper döngüler) adı verilen, 15 defa tekrar edilen döngüler yürütülür. Bu döngülerde teorik olarak spesifik ürün rastgele çoğaltılan ürünlerden fazla üretilir. Birincil reaksiyon sonunda 3 farklı ürün ortaya çıkabilir; spesifik ürün (spesifik primer ile RD primerinin çoğalttığı), spesifik olmayan ürün (RD primerin çoğalttığı) ve hedeflenmemiş ürün (spesifik primerin çoğalttığı) (Şekil 2.3).

İkincil reaksiyon da birincil reaksiyon ürünü 20 kat sulandırılarak (final konsantrasyonu; 500 kat seyreltilmiş) kalıp DNA olarak kullanılır. Primer olarak 2. spesifik primer (vektörde birinci spesifik primere göre daha ileride konumlanmıştır) ile aynı RD primer kullanılır. İki yüksek sıcaklık döngüsü (63°C), bir indirgenmiş sıcaklık döngüsü (41 °C)'nden oluşan süper döngülerden 15 adet tekrarlanarak PZR yürütülür. Reaksiyon sonunda yüksek miktarda spesifik ürün ile çok düşük miktarda spesifik olmayan ürün ve seyreltilmiş hedeflenmemiş ürün oluşmaktadır.

Üçüncül reaksiyonda ikincil reaksiyon ürünü 10 kat sulandırılarak (final konsantrasyonu; 250 kat seyreltilmiş) kalıp DNA olarak kullanılır. Primer olarak 3. spesifik primer (vektörde ikinci spesifik primere göre daha ileride konumlanmıştır) ile aynı RD primeri kullanılır. 25 döngüden oluşan ve bağlanma sıcaklığı 40-42 °C olan klasik PZR döngüleri yürütülür. Üç reaksiyonun ürünleri jele yüklenerek jel analizi yapılır. Jel analiz sonuçlarına göre dizileme için "TAIL" PZR dördüncül reaksiyonu gerçekleştirilir. Dördüncül reaksiyonda üçüncül reaksiyon ürünü 10 kat sulandırılarak (final konsantrasyonu; 250 kat seyreltilmiş) kalıp DNA olarak kullanılır. Primer olarak 4. spesifik primer (vektörde üçüncü spesifik primere göre daha ileride konumlanmıştır.) ile aynı RD primeri kullanılır. PZR koşulları üçüncül reaksiyon ile aynıdır. Jel analizi ve saflaştırma işleminden sonra dizileme işlemine geçilebilir.

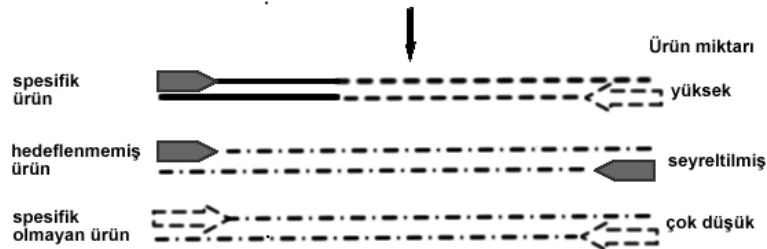


SP1 ve RD primeri ile yapılan Birincil TAIL-PZR



500 kat sulandırım

SP2 ve aynı RD primeri ile yapılan İkincil TAIL-PZR



250 kat sulandırım

SP3 ve aynı AD primeri ile yapılan Üçüncül TAIL-PZR

Jel analizi, saflaştırma ve SP4 primeri ile dizileme

Şekil 2.3: “TAIL” PZR yönteminin aşamaları. Yüksek sıcaklık döngülerinde, daha yüksek T_m 'i olan spesifik primer (SP) bağlanıp hedef molekülün doğrusal çoğaltımı gerçekleşirken spesifik olmayan ürünlerin çoğaltımı gerçekleşmemektedir. Düşük sıcaklıklı döngülerde RD (rastgele dejenere) primeri de bağlanabilmekte, çift iplikli moleküller oluşabilmekte ve hedef molekülün öncelikli çoğaltımı logaritmik olmaktadır. İkincil ve üçüncül PZR'lerde SP1 tarafından üretilen hedeflenmemiş ürünlerin çoğaltımı SP1 bulunmadığından gerçekleşmemektedir (Liu *ve diğ.* 2005)

Konak genomunda transgen giriş (entegrasyon) bölgelerinin anlaşılması bitki transformasyonunun doğasını anlamak açısından önem taşımaktadır. Arpa, buğday ve yulaf gibi tahıllarda transgenlerin fiziki konumları floresan *in situ* hibridizasyon (“FISH”) ile tespit edilebilmektedir (Pedersen *ve diğ.*,1997; Choi *ve diğ.*, 2002). Ancak, transgen konumlarının genetik haritalarının çıkarılması fiziki konumlarının belirlenmesi kadar önemlidir. Bu şekilde, transgenlerin bitki kromozomundaki kesin yerleşimleri, giriş şekilleri ve entegrasyonunun rastgele bir işlem olup olmadığı da anlaşılabilir (Salvo-Garrido *ve diğ.*, 2004). Tüm bu bilgiler ancak transgenlere komşu bölgelerin analizi ile elde edilebilir. “TAIL” PZR ile T-DNA girişi *Arabidopsis* (Forsbach *ve diğ.* 2003; Qin *ve diğ.* 2003 a,b) ve çeltikte (Sha *ve diğ.* 2004) yoğun olarak çalışılmıştır. Arpa ve diğer tahıl genomlarında ise *Agrobacterium* ile transgen entegrasyonunun doğası hakkında bilgiler henüz yetersizdir.

Bu tez çalışmasında *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktarılmış arpa dokularında transgenlerin bitki genomuna girdiği bölgelerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Çalışmada *Hordeum vulgare* cvs. Tokak 157/37 ve Golden promise kullanıldı. Bu çeşitlere ait olgun tohumlar İ.Ü. Biyoloji Bölümü Botanik Bahçesi'nde tarla ekimi yapılarak yetiştirilen bitkilerden elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: a) İ.Ü. Biyolojoloji Bölümü Botanik Bahçesi'nde tarla ekimi yapılan alan, b) Golden promise ve c) Tokak 157/37 'nin başak morfolojisi

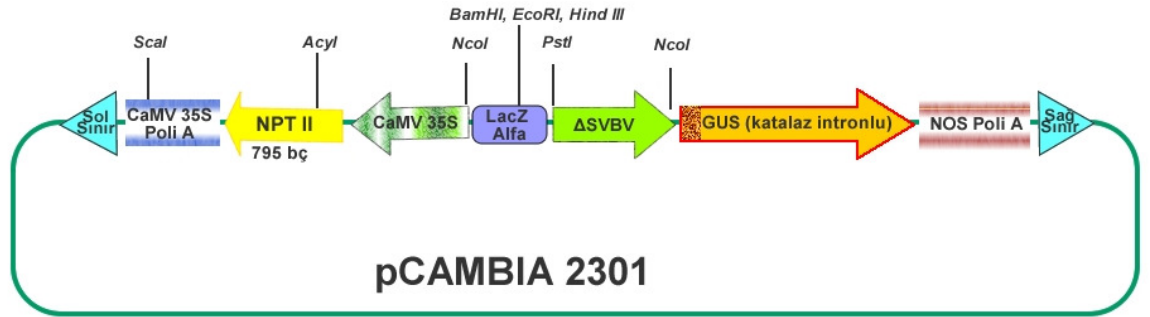
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ŞARTLARI

Arpa tohumları %20'lik ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit) çözeltisinde 20 dakika bekletilip, üç kez steril distile suda yıkandı. Pens ve bistüri yardımıyla tohumlarından çıkarılan embriyolar, saf etanol içerisinde 30 saniye tutularak tekrar distile su serisinden geçirildi. Embriyolar MS tuzu (Murashige & Skoog) ve vitamini içeren petrilere 15 adet olacak şekilde ekilerek, 25 °C, %60 nem ve 16 saat ışık/8 saat karanlık periyodundaki bitki büyütme kabinine (Angelantoni, EKOCHL 1500) aktarıldı. Kültürler 2 gün boyunca bu şartlarda bekletildi. Tüm doku kültürü çalışmaları laminar hava akımlı steril kabinlerde (Gelaire Flow Laboratories TC 48 ve Nüve) gerçekleştirildi.

3.3. *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

3.3.1. Kullanılan Irk ve Plazmidler

Gen aktarımında *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin EHA105 ırkı (Hood ve ark, 1993) kullanıldı. Bu ırk genel olarak C58 bakteri ırkının kromozomunu ve pTiBo542 yardımcı plazmidini taşımaktadır. İkili vektör olarak pCAMBIA2301 plazmidini katalaz intronu içeren β -glukuronidaz işaret geni (GUS, *gusA*) ve neomisin fosfattransferaz II (NPT II) seleksiyon markırını taşımaktadır (Şekil 3. 2).



Şekil 3.2: *Agrobacterium* aracılı gen aktarımında kullanılan pCAMBIA2301 vektöründe T-DNA bölgesindeki genlerin yerleşimi. (NPT II; neomisin fosfotransferaz II, Δ SVBV; “Strawberry vein banding caulimovirus“ promotörü , NOS Poli A; poli adenillenmiş nopalin sentazın terminatör bölgesi, CaMV 35S; “Cauliflower mosaic virus” promotörü , CaMV 35S poli A; poli adenillenmiş CaMV 35S dizisi, GUS; β -glukuronidaz, SolS ; T-DNA Sol Sınır ve SağS; T-DNA Sağ Sınır bölgeleri

Plazmid üzerinde NPT II geni, CaMV 35S promotörü önüne klonlanmıştır. Δ SVBV, çilek damar bantlaşma virüsü (“Strawberry vein banding caulimovirus“)’nden izole edilmiş ve amino asit dizisi CaMV 35S ile homoloji gösteren bir promotördür. pCAMBIA 2301 plazmidinde bu promotör, katalaz intronlu GUS geninin önüne klonlanmıştır.

3.3.2. Bakteri Üretimi ve Transformasyon Koşulları

200 μ l stok *A. tumefaciens* EHA105 ırkı 50 mg/L kanamisin ve 50 mg/L rifampisin içeren 5 ml Luria-Bertani (%1 tripton, %0.5 Maya özütü, %1 NaCl pH 7.0-7.2)

besiyerinde 28°C’de 180 rpm de çalkalanarak gece boyu üretildi. 2. gün kültürün OD₆₀₀ değeri 0.6-0.8 oluncaya kadar üretime devam edildi. OD₆₀₀ değeri istenilen aralığa geldiğinde bakteri kültürü 6.000 rpm de (Eppendorf, centrifuge 5810R, rotor; F-34-6-38) 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Çökelti inokülasyon solüsyonu (Tablo 3.1) ile süspanse edildi ve OD₆₀₀ değerinin 0.8-1.0 olması sağlandı. Karışım oda sıcaklığında (22-25 °C) 1 saat karanlıkta tutuldu. 2 günlük embriyolar 30 dk. *Agrobacterium* içeren inokülasyon solüsyonunda tutulduktan sonra, 15 dk desikatörde 400 mmHg basınçta vakum infiltrasyonu yapıldı. Daha sonra embriyolar steril dH₂O ile yıkanarak fazla bakteri uzaklaştırıldı. Bu embriyolar, kültivasyon (“co-cultivation”) besiyerine (Tablo 3.1) aktarılarak karanlıkta, 25°C’de 2 gece bekletildi. İki günün sonunda embriyolar 500 mg/L sefotaksim içeren distile suda 120 rpm de çalkalanarak yıkandı. Kurutma kağıdında kurutulan olası transformant embriyolar seçici besiyerine (Tablo 3.1) aktarılarak sürgün ve kök gelişimi sağlandı.

Tablo 3.1: *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında kullanılan besiyeri ve solüsyonların içerikleri

Besiyeri/solüsyon adı	İçeriği
Embriyo ön-kültivasyon besiyeri	4.3 g/L MS tuzu, % 0.1 MS vitamini, % 3 sükröz, % 0.9 agar pH=5.6-5.8
İnokülasyon besiyeri	4.3 g/L MS tuzu, % 0.1 MS vitamini, 200 µM asetosiringon, 10mM MES
Kültivasyon besiyeri	4.3 g/L MS tuzu , % 0.1 MS vitamini , % 3 sükröz, % 0.9 agar pH=5.6-5.8
Seçici besiyeri	4.3 g/L MS tuzu , % 0.1 MS vitamini , % 3 sükröz, 25 mg/L genetisin (G418), 200 mg/ L sefotaksim % 0.9 agar pH=5.6-5.8

3.3.3. Transformasyon Sonrası Gen Anlatımının Belirlenmesi

Doku örneklerinde gen aktarımından 48 saat sonra GUS geninin anlatımı histokimyasal olarak belirlendi. GUS gen anlatımının temeli, GUS boyama çözeltisinin içerisinde bulunan 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid’in (X-Gluc) sadece transformant hücrelerde üretilmesi beklenen β-glukuronidaz enzimi ile etkileşime girerek mavi renkteki ClBr-indigo maddesini açığa çıkarmasıdır (Tablo3.2).

Tablo 3.2: GUS boyama çözeltilisinin içeriği

Stok çözeltilisi	Final konsantrasyon
12.5 mM potasyum ferrisiyanid (Sigma P-8131)	1.5 mM
12.5 mM potasyum ferrosiyanid (Sigma P-9387)	1.5 mM
Triton X-100 (Sigma X-100)	% 0.8
40 mM 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glukuronid (Fluka 16666) [N,N-Dimetil formamidde (Sigma D-4254) hazırlandı]	6 mM

3.4. TRANSGEN DİZİLERİNİN GENOMDAKİ YERLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

3.4.1. Arpa Yapraklarından Genomik DNA İzolasyonu

Seçici besiyerinde gelişen 1 aylık bitkilerden CTAB (“Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”) maddesine dayalı bir izolasyon prosedürü (Weining *ve diğ.*, 1991) uygulanarak genomik DNA saflaştırıldı. Buna göre, en az 100 mg olarak tartılan yapraklar sıvı azot kullanılarak ezildi ve toz haline getirildi. Toz haline getirilen dokular, önceden sıvı azotta bekletilen 1.5 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere 65°C’de tutulan 2x CTAB tamponundan 350 μ l eklendi (Tablo 3.3.). Karışım 5 sn süre ile vortekslendi. 350 μ l 8 M LiCl eklendi ve tekrar vortekslendi. Tüplere 10 μ l 10 mg/ml RNaz ilave edildi ve pipetaj ile RNaz’ın homojen şekilde karışması sağlandı. 65°C’lik su banyosunda 30 dk tutulan tüplerde karışımın 2 faz haline gelmesi sağlandı. Tüpler sık aralıklarla ters yüz edilerek karıştırıldı. Tüplere 700 μ l kloroform:isomilalkol (24:1 v:v) eklendi ve hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm de (Beckman , Microfuge 18 centrifuge, Rotor; F241 5P) 30 sn süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Yeni tüpe alınan üst sıvının hacmi kadar kloroform:isomilalkol (24:1 v:v) tüpe eklendi ve 13.000 rpm de 30 sn süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Toplanan üst sıvıya 1/10 hacim olacak şekilde 3M Sodyum asetat ve 2 hacim soğuk saf etanol eklendi ve nazıkçe karıştırıldı. Tüpler -70 °C’de 1 saat tutuldu ve oda sıcaklığında 13.000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek DNA’nın çökmesi sağlandı. Üst sıvı atıldı. Dibe çöken DNA iki kere %70’lik etil alkol ile yıkandı. Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdının üzerine konuldu ve alkolün uçması

sağlandı. 65°C de ısıtılan 50 µl TE tamponu ile çökelti süspansiyonu edildi ve daha sonraki kullanımlar için -20 ° C' ye kaldırıldı.

Tablo 3.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Tampon	Bileşen	Konsantrasyon
2x CTAB Tamponu	CTAB	% 2
	Tris	100 mM
	EDTA (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	1.4 M
	PVP	% 1
Tris-EDTA (TE) Tamponu	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	EDTA (pH 8.0)	1 mM

DNA konsantrasyonu spektrofotometre (microquant, Biotech) kullanılarak şu formüle göre hesaplandı.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{katsayı (50)}$$

100 mg taze yapraktan DNA izolasyonu sonucu elde edilen en yüksek genomik DNA miktarı:

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = 0.159 \times 200 \times 50 = 1590 \mu\text{g/ml} \gg 1.59 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Total DNA miktarı= 50 x 1.59= 79.5 µg (50 µl TE tamponunda çözüldürülen total DNA miktarı). Buna göre izolasyon sonucunda 1 mg taze yapraktan elde edilen total DNA miktarı 0,795 µg /mg dır.

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Seçici besiyerinde 1 ay sonunda yeşilliğini koruyan transformant bitki örneklerinden saflaştırılan genomik DNA örneklerine klasik PZR yapıldı. PZR'de *β-glukuronidaz* (GUS) ve *neomisin fosfatransferaz II* (NPT II) genlerinin çoğaltımı Tablo 3.4 te gösterilen primerler ile yapıldı. GUS1 ve NPT II primerlerinin vektör kaseti üzerindeki konumları Şekil 3.3 te gösterilmiştir .

Tablo 3.4: β -glukuronidaz (GUS) işaret geni ve neomisin fosfattransferaz II (NPT II) genlerinin PZR ile çoğaltımında kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi	Ürün boyutu (bp)
GUS1F	5' GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG 3'	1200
GUS1R	5' GGT TAC GCG TTG CTT CCG CCA 3'	
NPTF	5' ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA 3'	700
NPTR	5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3'	

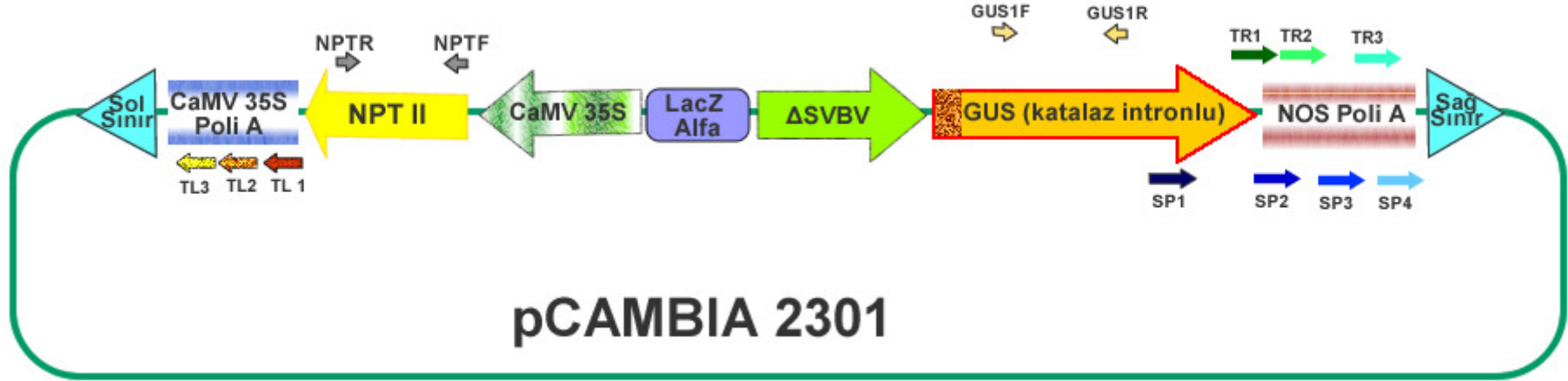
Transformant ve kontrol bitkilerinden izole edilen DNA örneklerinin çoğaltımı için yukarıda gösterilen primerler ile Tablo 3.5 te gösterilen şekilde polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. PZR döngüleri Tablo 3.6 da belirtildiği şekilde programlandı ve yürütüldü.

Tablo 3.5: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Stok konsantrasyonu	Hacim	Final konsantrasyonu
ddH ₂ O		12.4 µl	
Taq DNA polimeraz tamponu	10 x	2.5 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	2 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1 µl	0.4 mM
Doğru Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
Ters Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
DNA	10 ng/µl	5 µl	2 ng / µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.1 µl	0.02 U / µl
Toplam hacim		25 µl	

Tablo 3.6: Klasik PZR döngüleri

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	95°C	5 dk
Çoğaltım (30 döngü)	95°C	1 dk
	55°C	1 dk
	72°C	1 dk
Son uzama	72°C	10 dk



Şekil 3.3: Klasik PZR’da ve “TAIL” PZR’de kullanılan primerlerin pCAMBIA2301 vektör kasetindeki konumları. (NPT II; klasik PZR’da *neomisin fosfattransferaz* II geninin çoğaltımında kullanılan primer çifti , GUS 1; klasik PZR’de *β-glukuronidaz* geninin çoğaltımında kullanılan primer çifti, “TAIL” PZR ‘da birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül reaksiyonlarda kullanılan spesifik primerler; SP1, SP2, SP3, SP4, (sırasıyla, laboratuvarımızda tasarlanan primerler), TR1, TR2, TR3 (Liu ve diğ. nin (1995) çalışmasında kullanılan spesifik primerler), TL1, TL2, TL3 (Liu ve diğ. nin (1995) çalışmasında kullanılan spesifik primerler)

3.4.3. Aktarılan genlerin “Southern” DNA melezlemesi ile belirlenmesi

Transformasyon yapılan bitkilerin genomik DNA’larında GUS ve NPT II genlerinin problrarı ile DNA melezlemesi yapıldı. Bu amaçla klasik PZR’unda pozitif sonuç veren genomik DNA örnekleri *NcoI* ya da *BamHI* enzimleri ile kesilerek pozitif yüklü naylon membrana (Roche 1 209 272) aktarıldı. Bu uygulamalarda Digoksinin temelli işaretlemeye dayanan ticari bir kit (Roche 11 093 657 910) kullanıldı. Yöntem daha önce laboratuvarımızda optimize edildiği şekliyle (Karakaş, 2005) şu aşamaları içermektedir.

- Genomik DNA’nın *NcoI* ya da *BamHI* enzimleriyle 37°C’de gece boyu kesimi.
- Örneklerin %1’lik agaroz jelde, 35 V’de gün boyu yürütülmesi.
- Jelin 0.5 N NaOH ve 1.5 M NaCl ile 2 kez 15 dk yıkanarak örneklerin denatürasyonu ve ardından 0.5 M Tris-HCl ve 3M NaCl ile 30 dk nötralizasyonu.
- Jeldeki DNA’nın naylon mebrana aktarılması (Sambrook, 1989).
- Naylon membranın 80°C de 3 saat tutularak fikse edilmesi.
- Membranın melezleme tamponuna katılan problrar ile 68°C de 1.5 saat ardından gece boyunca melezleme fırınında inkübe edilerek melezlenmesi.
- Melezlenmeyen ancak membran yüzeyine bağlı kalan problrarın yıkama işlemi ile uzaklaştırılması.
- Membranın NBT-BCIP maddesi ile karanlıkta 1 saat tutularak immününolojik belirleme ile DNA’nın tespit edilmesi.

3.4.4. Aktarılan Genlerin “TAIL” (“Thermal Asymmetric Interlaced”) PZR ile Belirlenmesi

“TAIL“ PZR'nin çalışma prensibi Şekil 2.3 te, bu yöntemin 4 farklı reaksiyonunda kullanılan spesifik ve rastgele dejenere (RD) primerlerin dizileri Tablo 3.7 de verilmiştir.

Tablo 3.7: TAIL PZR da kullanılan spesifik ve rastgele dejenere (RD) primerler

	Primer adı ve dizisi
T-DNA sağ sınıra göre laboratuvarımızda tasarlanmış spesifik primerler	SP1 5'- TAA CAA GAA AGG GAT CTT CAC TCG -3' SP2 5'- AGC GCG CAA ACT AGG ATA AA -3' SP3 5' GCG CGG TGT CAT CTA TGT TAC T 3' SP4 5'AGG ATA TAT TGG CGG GTA AAC CTA 3'
T-DNA sağ sınıra göre tasarlanmış ve yayından alınan spesifik primerler (Liu ve diğ., 1995)	TR1 5' TGC ATG ACG TTA TTT ATG AGA TGG GTT 3' TR2 5' TAT GAT TAG AGT CCC GCA ATT ATA CAT 3' TR3 5' CTA GGA TAA ATT ATC GC 3'
T-DNA sol sınıra göre tasarlanmış ve yayından alınan spesifik primerler (Liu ve diğ., 1995)	TL1 5' TAG GGT TCC TAT AGG GTT TCG CTC 3' TL2 5' GTG TTG AGCATA TAA GAA ACC CTT AG 3' TL3 5' CCT AAA ACC AAA ATC CAG 3'
Rastgele primerler (Liu ve diğ., 1995)	RD1 5' ATC GAG TAT GGA GTT 3' RD2 5' AGT CGA CAG AAA TGA 3' RD3 5' TGA CGA GAG ATA TGA 3' RD4 5' TGA CGA CTG ATA TGA 3'

Tablo 3.8: “TAIL” PZR’de kullanılan döngü koşulları

Reaksiyon tipi	Döngü sayısı	Termal şartlar
Birincil Reaksiyon	1	93°C (1 dk), 95°C (1 dk)
	5	94°C (30 sn), 62°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
	1	94°C (30 sn), 25°C ‘den 72°C’ye rampa (3 dk), 72°C (2.5 dk)
	15	94°C (15 sn), 66°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
		94°C (15 sn), 66°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
		94°C (15 sn), 41°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
1	72°C (5 dk)	
İkincil reaksiyon	15	94°C (15 sn), 63°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
		94°C (15 sn), 63°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
		94°C (15 sn), 41°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
	1	72°C (5 dk)
Üçüncül Reaksiyon	25	94°C (40 sn), 41°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
	1	72°C (5 dk)
Dördüncül Reaksiyon	25	94°C (40 sn), 41°C (1 dk), 72°C (2.5 dk)
	1	72°C (5 dk)

Klasik PZR’de pozitif sonuç veren DNA örnekleri ile “TAIL” PZR yapıldı. “TAIL” PZR birincil reaksiyon karışımı 500 µl’lik PZR tüplerinde spesifik primer 1 (SP1, TR1 ya da TL1) ve RD primerlerinden biri kullanılarak Tablo 3.9 da belirtilen şekilde hazırlandı. Tablo 3.8 de gösterilen koşullarda “TAIL” PZR birincil reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.9: “TAIL” PZR birincil reaksiyon içeriği

Primer Reaksiyon Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Final Konsantrasyonu
ddH ₂ O		8.4 µl	
Taq DNA polimeraz tamponu	10x	2.5 µl	1x
MgCl ₂	2.5 mM	2.0 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1.5 µl	0.60 mM
Spesifik Primer1	10 µM	0.5 µl	0.20 µM
RD Primer	10 µM	5.0 µl	2 µM
DNA	10 ng/µl	5.0 µl	2 ng/µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.1 µl	0.02 U/µl
Toplam		25 µl	

“TAIL“ PZR ikincil reaksiyon karışımı 500 µl’lik PZR tüplerinde Spesifik Primer 2 (SP2, TR2 ya da TL2) ve birincil reaksiyonda kullanılan RD primeri kullanılarak Tablo 3.10 da belirtilen şekilde hazırlandı.20 kat sulandırılmış birincil reaksiyon ürünü (final konsantrasyonu; 500 kat seyreltik) kalıp DNA olarak kullanıldı. Tablo 3.8 de gösterilen koşullarda “TAIL” PZR ikincil reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: “TAIL” PZR ikincil reaksiyon içeriği

İkincil reaksiyon bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Final konsantrasyonu
ddH ₂ O		13.3 µl	
Taq DNA polimeraz tamponu	10 x	2.5 µl	1 x
MgCl ₂	2.5 mM	2.0 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1.5 µl	0.60 mM
Spesifik Primer2	10 µM	0.6 µl	0.24 µM
RD Primer	10 µM	4.0 µl	1.60 µM
DNA		1.0 µl	
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0.1 µl	0.02 U / µl
Total		25 µl	

“TAIL” PZR üçüncül reaksiyon karışımı 500 µl’lik PZR tüplerinde Spesifik primer3 (SP3, TR3 ya da TL3) ve birincil reaksiyonda kullanılan “RD” primeri kullanılarak Tablo 3.11 de belirtilen şekilde hazırlandı. Kalıp DNA olarak da 10 kat sulandırılmış ikincil reaksiyon ürünü (final konsantrasyonu; 250 kat seyreltik) kullanıldı. Tablo 3.8 de gösterilen koşullarda TAIL PZR üçüncül reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.11: “TAIL” PZR üçüncül reaksiyon içeriği

Reaksiyon bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Final konsantrasyonu
ddH ₂ O		14.8 µl	
Taq DNA polimeraz tamponu	10 x	2.5 µl	1x
MgCl ₂	2.5 mM	2.0 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1.0 µl	0.4 mM
Spesifik Primer 3	10 µM	0.6 µl	0.24 µM
RD Primer	10 µM	3.0 µl	1.20 µM
DNA		1.0 µl	
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0.1 µl	0.02 U/µl
Total		25 µl	

Birincil, ikincil, üçüncül ürünleri %0.9 luk agaroz jelde yanyana yüklenerek 70 voltta 60 dk yürütüldü. Spesifik primerlerin birbirine göreceli konumlarına göre jelde hedef bant belirlendi ve dizileme için aşağıda anlatıldığı şekilde dördüncül reaksiyon gerçekleştirildi.

“TAIL“ PZR dördüncül reaksiyon karışımı 500 µl’lik PZR tüplerinde Spesifik primer 4 (SP4) ve birincil reaksiyonda kullanılan RD primeri kullanılarak Tablo 3.11’de belirtilen şekilde hazırlandı. Kalıp DNA olarak da 10 kat sulandırılmış üçüncül reaksiyon ürünü (final konsantrasyonu; 250 kat seyreltik) kullanıldı.

Klasik ve ‘‘TAIL’’ PZR ürünleri % 0.9 agaroz jelde analiz edilerek jel görüntüleme sistemi (Avegene-Xlite 200R) ile fotoğraflandı. Tüm örnekler, 70 V / 50 mA elektrik akımında 50-60 dakika yürütüldü.

Tablo 3. 12: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

Tampon	İçeriği	Konsantrasyonu
Tris-Asetat (TAE) tamponu	Tris Baz	242gr
	Glasiyal Asetik Asit	57.1ml
	EDTA (pH 8.0)	0.5M (100ml)
6x Elektroforez Yükleme Tamponu	Yükleme boyası (Fermentas R061)	1x

3.4.5. Jelden Geri Kazanım ve Veritabanı Araştırması

‘‘TAIL’’ PZR üçüncül ya da dördüncül reaksiyonu sonucunda oluşan bazı bantlar seçilerek jelden geri kazanım kiti (Roche 11 732 668 001) ile saflaştırıldı ve dizilemeye gönderildi. Dizileme İontek AŞ tarafından yapıldı ve dizileme sonuçları Chromas 2.32 ve Bio edit yazılımıyla değerlendirildi. Dizi sonuçları önce FASTA formatına çevrilerek NCBI sayfasındaki BLAST (‘‘Basic Local Alignment Search Tool’’) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve Graingenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml>) veritabanları kullanılarak taramalar yapıldı. Sorgulanan dizinin nükleotid düzeyinde eşleşmesi için BLASTN seçeneği kullanıldı. Bu şekilde elde edilen dizilerde hem vektör hem de arpa genomuna ait diziler olup olmadığı araştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. ARPA EMBRİYOLARINA *Agrobacterium* ARACILIĞI İLE GEN AKTARIMI

Agrobacterium EHA105 ırkı kullanılarak Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı şekilde iki gün MS besiyerinde kültüre alınan arpa (*Hordeum vulgare* L.) cv.s Tokak 157/37 ve Golden promise olgun embriyolarına gen aktarımı yapıldı (Şekil 4.1).

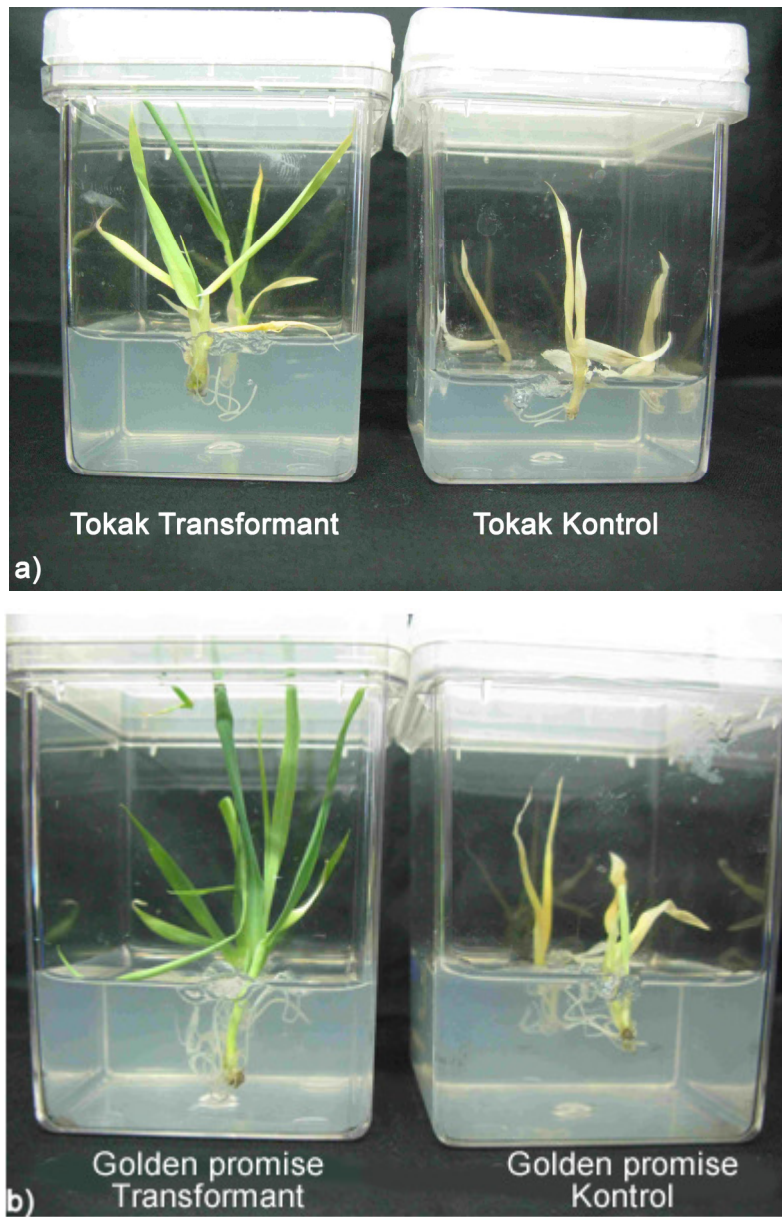


Şekil 4.1: (a) ve (b) İki günlük *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37 embriyolarının MS besiyerindeki görünümü, c) embriyoların *Agrobacterium* uygulamasından sonra seçici besiyerinde çimlenmesi ve gen aktarılmayan embriyolarla karşılaştırılması (7 günlük), bar:1mm

Tokak 157/37’den 276; Golden promise’den 155 embriyo gen aktarımı sonrası seçici besiyerlerine (25 mg/l genetisin (G 418) ve 200 mg/l sefotaksim) aktarıldı (Şekil 4.2). 40 gün sonunda kök vermiş, yeşilliğini koruyan bitkiler sayıldı. Buna göre, Tokak 157/37 ve Golden promise arpa çeşitlerinin seçici besiyerinde 40-45 gün sonundaki rejenerasyon durumları Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1: 40-45 gün sonunda seçici besiyerinde (SB) yaprakları yeşil kalan ve kök veren bitkilere ait veriler

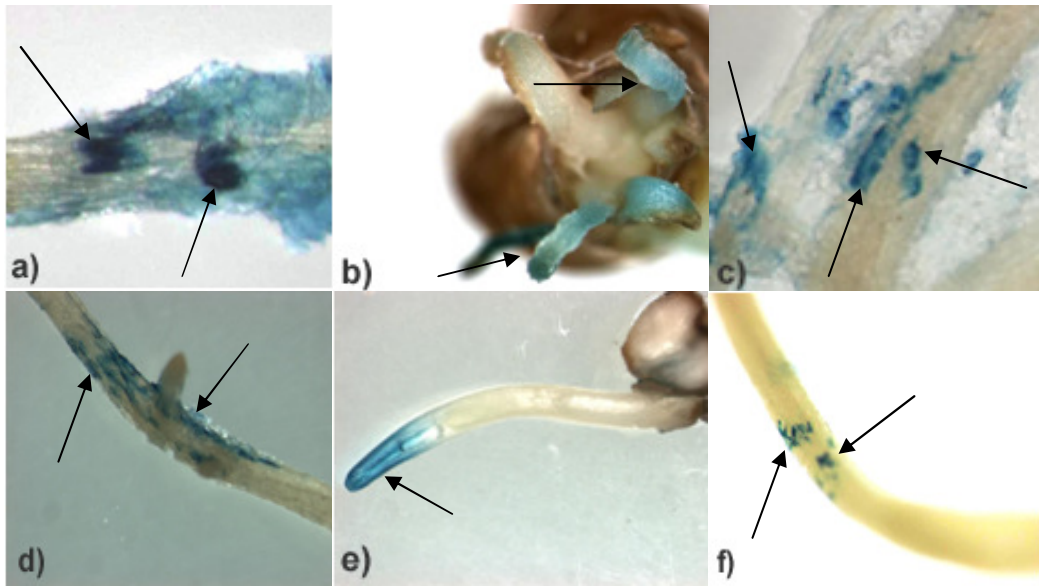
Arpa çeşitleri	Gen aktarılan embriyo sayısı	Transformant bitkilerin sayısı / %
Tokak 157/37	276	46 / 16.6
Golden Promise	155	16 / 10.3



Şekil 4.2: *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37 ve *Hordeum vulgare* cv. Golden promise çeşitlerinin gen aktarılmış ve kontrol embriyolarından gelişen bitkilerin 40 gün sonraki görünüşleri

4.2. ARPA EMBRİYOLARINDA GUS GEN ANLATIMININ HİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

Bölüm 3.3.3 te açıklanan şekilde *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarılan arpa embriyolarına histokimyasal analiz yapıldı. İki günlük 45 Tokak 157/37 transformant embriyosunun tamamında boyama sonrasında embriyoların sürgün ve kök uçlarında değişen oranlarda GUS aktivitesi gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Tokak 157/37 embriyolarında kök ve sürgün uçlarında tespit edilen GUS aktivitesine örnekler

30. gün sonunda çok iyi köklenemeyip sararan bitkilerde yapılan histokimyasal analiz sonucunda 25 bitkiden 22 tanesinin yapraklarında mavi renkte hücre kümeleri tespit edildi.

4.3. TRANSGEN ENTEGRASYONUNUN MOLEKÜLER ANALİZLERİ

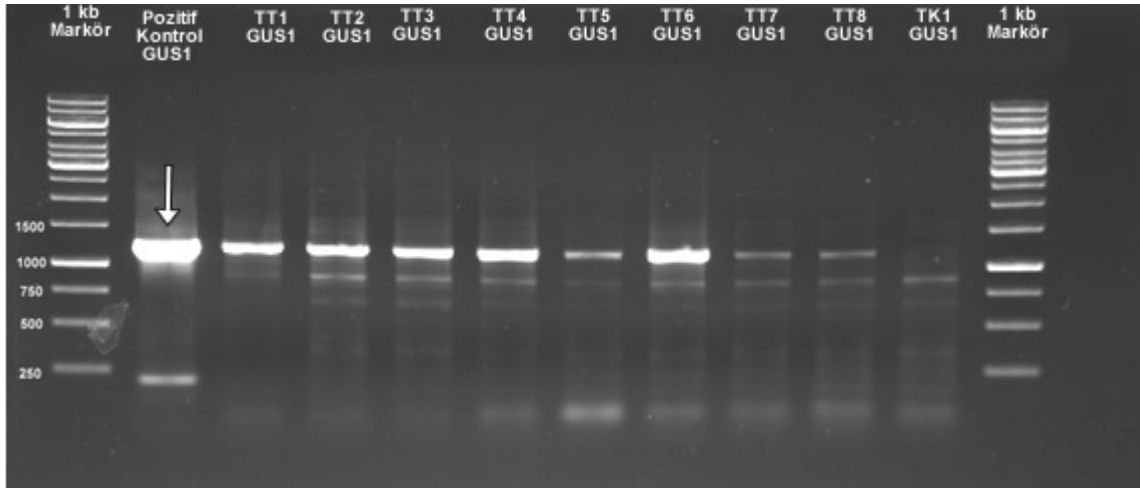
4.3.1. PZR ile Markır Genlerin Çoğaltımı

Agrobacterium aracılığıyla gen aktarımı yapılarak seçim koşullarında gelişmelerini sürdüren arpa bitkilerine yaklaşık 1 ay sonunda Bölüm 3.4.1 de anlatıldığı şekilde

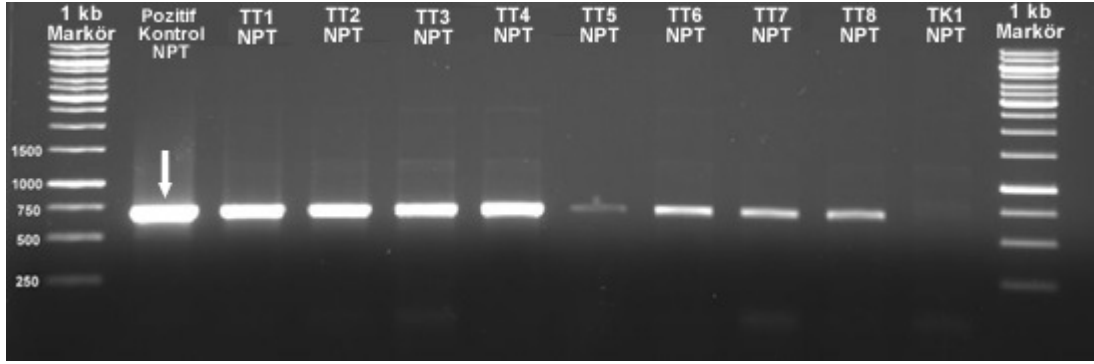
genomik DNA izolasyonları yapıldı ve PZR uygulandı. Yapılan deneylerin özeti Tablo 4.2 de özetlenmiştir. Buna göre, 39 Tokak bitkisinden 21'i GUS açısından, 18 bitkiden 14'ü NPT II genleri açısından pozitif sonuç vermiştir (Tablo 4.2). 18 Golden promise bitkisinde GUS1 primerleri ile PZR analizi yapılmış ve 8'inde GUS varlığı tespit edilmiştir. 11 örneğin 7'sinde ise NPT II tespit edilebildi.

Tablo 4.2. DNA izolasyonu yapılan bitki sayısı ve GUS ve NPT II geni tespit edilen gen aktarılan bitki sayısı.

Varyete	GUS1 primer çifti		NPT II Primer çifti	
	DNA örnek sayısı	GUS gen varlığı	DNA örnek sayısı	NPT II gen varlığı
Tokak 157/37	39	21	18	14
Golden promise	18	8	11	7



Şekil 4.4: Tokak 157/37 çeşidinde GUS geninin PZR ile çoğaltımı ve ürünlerin %0.9'luk jelde gösterilmesi: Pozitif kontrol olarak pCAMBIA2301 plazmidi, TT1-TT8; Tokak 157/37 transformant bitkiler, TK1; negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Okla gösterilen pozitif kontrol ürünü 1.2 kb boyutundadır



Şekil 4.5: Tokak 157/37 çeşidinde NPT II geninin PZR ile çoğaltımı ve ürünlerin %0.9'luk jelde gösterilmesi: Pozitif kontrol olarak pCAMBIA2301 plazmidi, TT1-TT8; transformant bitkiler, TK1; negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Okla gösterilen pozitif kontrol ürünü 0.7 kb boyutundadır

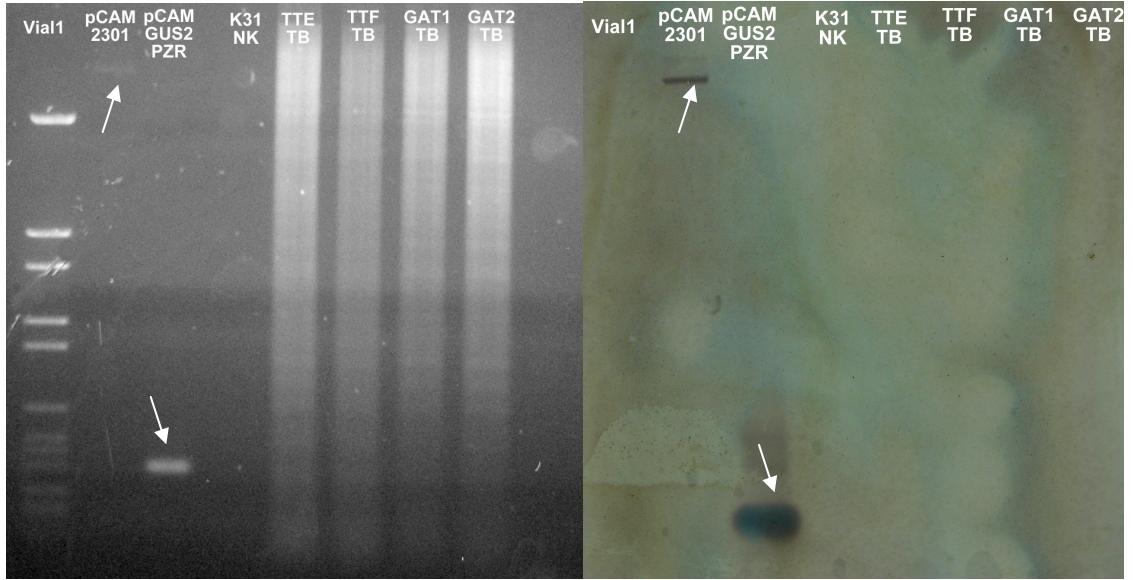
4.3.2. Southern DNA Melezlemesi Çalışmaları

Southern DNA melezlemesi için PZR'de pozitif sonuç veren genomik DNA örnekleri NPT II ve GUS geni problemleri açısından tarandı. Transformant ve kontrol bitkilerden saflaştırılan DNA örnekleri kesim yapıldıktan sonra uzun süreli yürütülerek, naylon membrana aktarıldı ve DIG ("Digoksinin") işaretleme ve tanıma yöntemine göre boyama yapıldı. Bu çalışmaların özeti Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: Tokak 157/37 ve Golden promise DNA örneklerinin *BamHI* ve *NcoI* ile kesildikten sonra farklı problemlerle yapılan southern melezleme çalışmaları. * GUS2, GUS geninin intron bölgesinde üretilen 0.4 kb'lik probdur.

Kullanılan Prob							
Arpa çeşidi	Taranan örnek sayısı	GUS1		GUS2*		NPT II	
		<i>NcoI</i>	<i>BamHI</i>	<i>NcoI</i>	<i>BamHI</i>	<i>NcoI</i>	<i>BamHI</i>
Tokak157/37	35	15		4	8	16	6
Golden promise	10			4	3	3	4

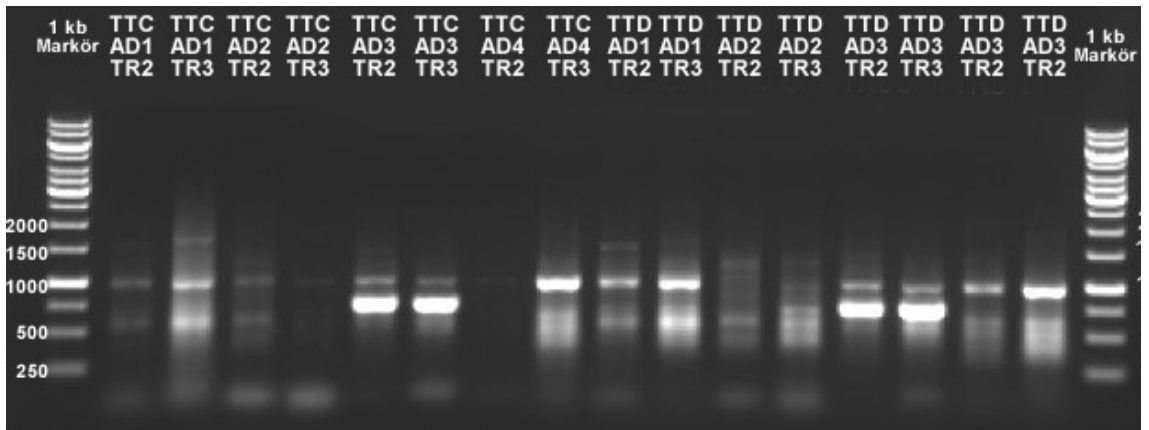
Southern DNA melezlemeleri sonucunda pozitif kontrol DNA dışında, proba eşleşme görülmedi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: (a) *Bam*HI ile kesilmiş ve 35 voltta gün boyu yürütülen DNA örnekleri %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Pozitif kontroller; pCAMB12301 plazmidi , pCAM GUS2PZR (pCAMBIA 2301 plazmidinin GUS2 primerleri ile çoğaltılmış ürünü), K31 NK (Negatif kontrol; gen aktarılmamış Tokak DNA örneği), TTE TB ve TTF TB; gen aktarılmış Tokak 157/37 DNA örnekleri, GAT1 TB ve GAT2 TB (gen aktarılmış Golden promise DNA örnekleri (b) southern blotlama sonucu

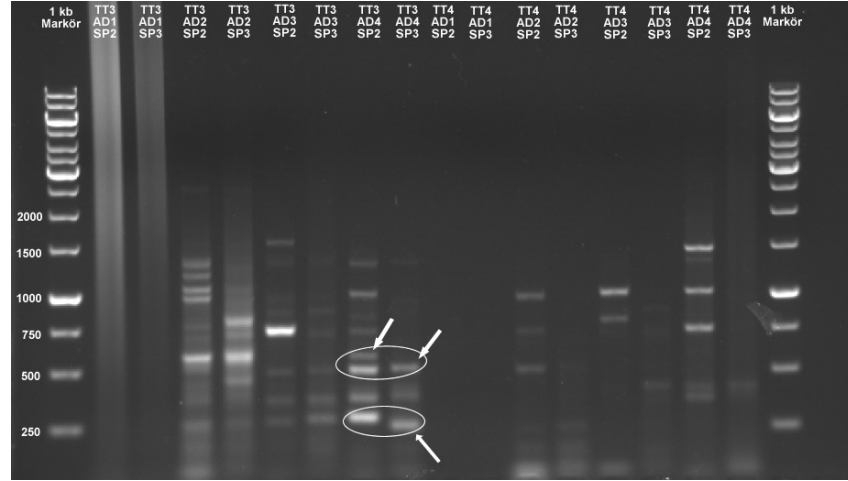
4.3.3. “TAIL“ PZR Analizleri

“TAIL“ PZR reaksiyonları için 21 bitkiden saflaştırılan genomik DNA kullanıldı. Başlangıç “TAIL“ PZR çalışmalarında elde edilen bant profilleri Şekil 4.7 de gösterilmiştir.



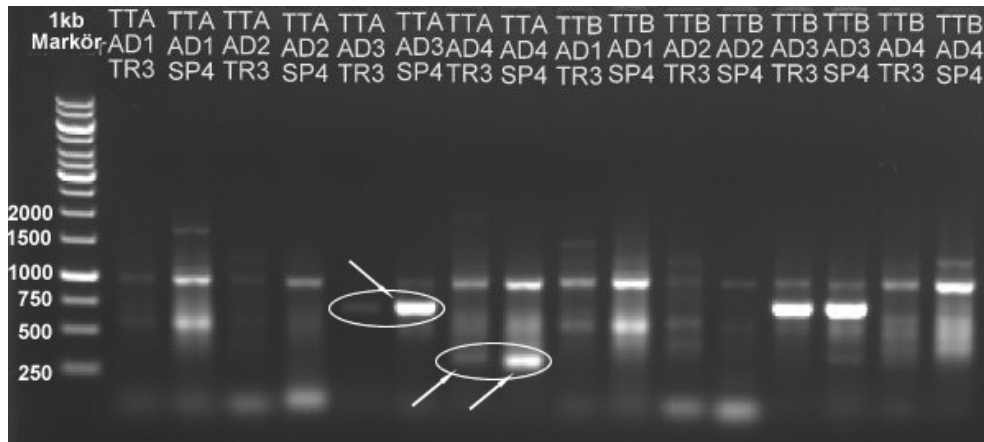
Şekil 4. 7: Tokak 157/37 transformantları; TTC ve TTD DNA'larının AD1, AD2, AD3 ve AD4 RD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen “TAIL“ PZR ikinci ve üçüncü reaksiyon çalışmalarında elde edilen bant profilleri. İkinci reaksiyonda TR2 ve üçüncü reaksiyonda TR3 spesifik primerleri kullanılmıştır.

TT3 ve TT4 DNA'larının farklı RD primeri ve spesifik primerler kullanılarak üç "TAIL" PZR reaksiyonu yapıldı. İkinci ve üçüncü reaksiyon ürünleri %0.9 luk agaroz jelde analiz edildi. Spesifik primerlerin vektördeki göreceli konumlarına göre (yaklaşık 90 bç'lik fark var) TT3'ün AD4 RD primeri ile yapılan TAIL PZR üçüncü reaksiyon sonucunda 2 bantın hedef ürün olabileceği belirlendi (Şekil 4.8).



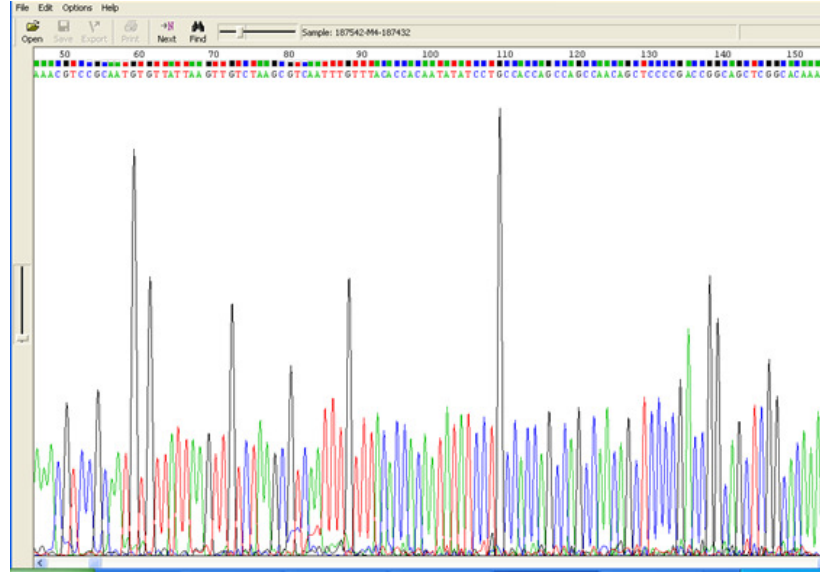
Şekil 4.8: TT3 ve TT4 transformant DNA'ların SP2 ve SP3 spesifik primerleri ve farklı RD primerlerinin kullanılmasıyla yapılan "TAIL" PZR ikinci ve üçüncü reaksiyon ürünleri. Okla gösterilen bantlar muhtemel hedef ürünleri göstermektedir.

TTA ve TTB DNA'larının farklı RD primeri ve spesifik primerler kullanılarak dört "TAIL" PZR reaksiyonu yapıldı. Spesifik primerlerin vektördeki göreceli konumlarına göre (yaklaşık 70 bç'lik fark var) TTA'nın AD3 RD primeri ve AD4 RD primeri ile yapılan "TAIL" PZR dördüncü reaksiyon sonucunda 2 bantın hedef ürün olabileceği belirlendi (Şekil 4.9). Bu bantlar dizileme için jelden izole edildi.



Şekil 4.9: TTA ve TTB transformant DNA'ların TR3 ve SP4 spesifik primerleri ve farklı RD primerlerinin kullanılmasıyla yapılan "TAIL" PZR üçüncü ve dördüncü reaksiyon ürünleri. Okla gösterilen bantlar hedef ürünleri göstermektedir.

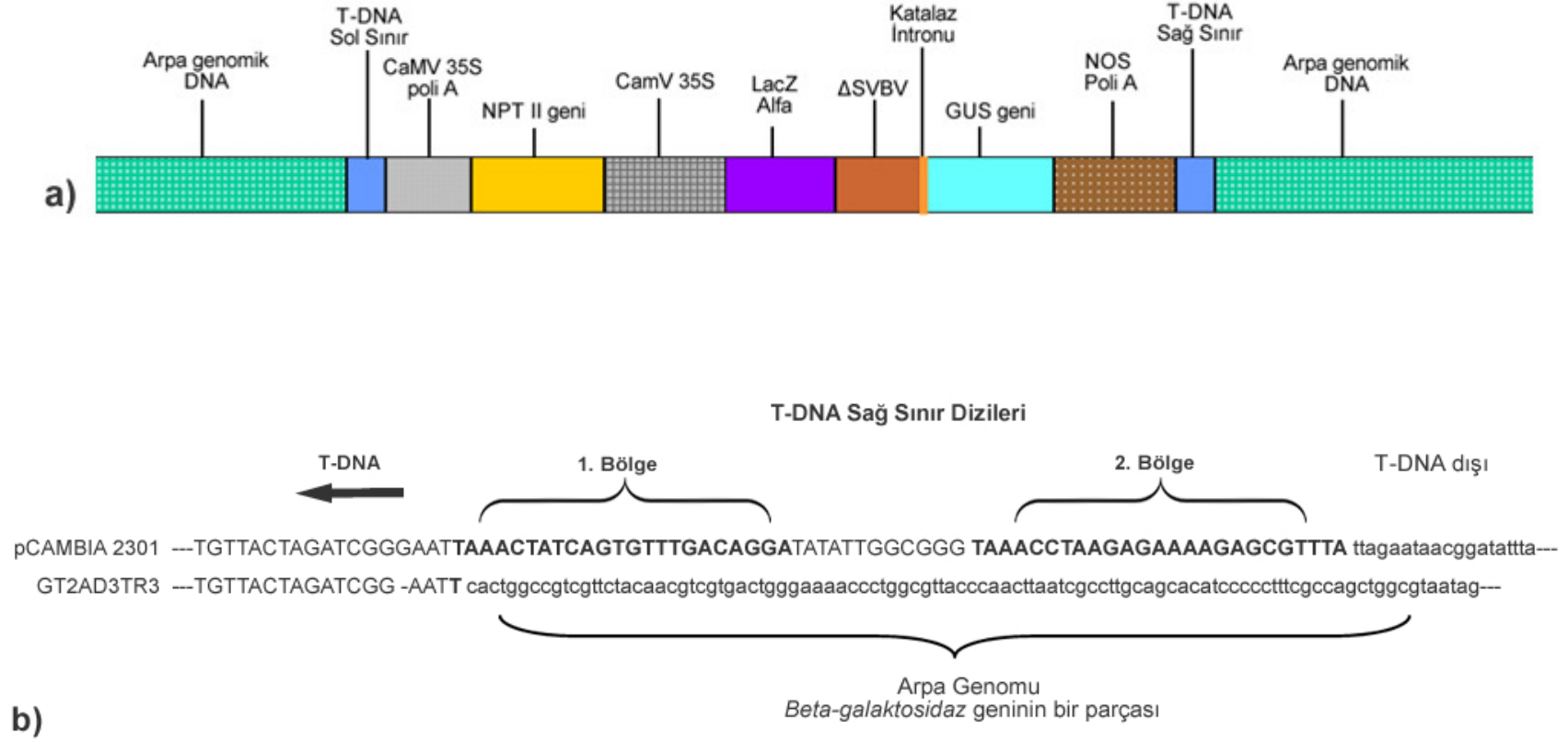
İkincil, üçüncül reaksiyonlarda ardışık çoğaltımın olabileceği düşünülen 28 örnek jelden geri kazanılarak dizilemeye gönderildi. Dizileme sonucunda Şekil 4.10'de gösterilen şekilde kromatogramlar elde edildi.



Şekil 4.10: “TAIL“ PZR sonrası elde edilen ve dizilenen bölgenin Chromas 2.32 programı ile incelenmesi.

Kromatogramda sinyallerin en güçlü olduğu aralık FASTA formatına çevrildi. FASTA formatına çevrilen diziler NCBI veritabanında BLASTN programı ile analiz edildi (Şekil 4.11).

Analiz sonucunda Golden promise GT2 transformantında ve Tokak 157/37 TT3 ve TTA transformantlarında T-DNA/arpa genom bağlantısı tespit edildi. GT2 transformantında TR3 spesifik primeri ile AD3 primeri (Şekil 4.13), TT3 transformantında SP4 spesifik primeri ile AD4 primeri (Şekil 4.14), TTA transformantında SP4 spesifik primeri ile AD4 primeri (Şekil 4.14) kullanılmıştır. Arpa veritabanları ile karşılaştırma yapıldığında GT2 de tespit edilen arpa genom parçasının *Beta galaktosidaz* genine, TT3'te tespit edilen arpa genom parçasının HSP (“heat shock protein) genine , TTA'da tespit edilen genom parçasınında *hbc8* genine ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12: (a) PCAMBIA2301 vektörüne ait T-DNA'nın arpa genomuna teorik olarak bağlanması (b) Golden promise GT2 transformantında tespit edilen T-DNA sağ sınır dizileri (kalın harf) ile T-DNA'ya ait diziler ve bu diziyeye bitişik arpa *Beta-galaktosidaz* genine ait dizi.



Şekil 4.13: (a) Tokak 157/37 TT3 transformantında tespit edilen sağ sınıra yakın T-DNA dizisi ve bu diziiye bitişik arpa ısı şok proteinine (*hsp*) ait dizi (b) TTA transformantında tespit edilen arpa genom/T-DNA bağlantısı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla 276 adet *Hordeum vulgare* cv. Tokak 157/37 ve 155 adet *Hordeum vulgare* cv. Golden promise olgun embriyosuna gen aktarımı yapılmıştır. Bu embriyolara bir haftalık süreçte yapılan histokimyasal analizler çeşitli oranlarda GUS gen anlatımı yapan hücre kümeleri oluştuğunu, dolayısıyla gen aktarımının gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 4.3). Bu dokular daha sonra seçici besiyerinde tutularak transformant olmayan hücrelerin elimine edilmesi sağlandı. 45 gün sonra yapılan skorlamada 46 Tokak 157/37 (%16.6) ve 16 (%10.3) Golden promise bitkisi iyi derece kök vermiş ve yeşilliğini korumaya devam etmiştir. Golden promise laboratuvarımızda daha önce çalışılmamış bir genotiptir. Bu çeşidin literatürde çoğunlukla olgunlaşmamış dönemdeki embriyoları kültürlenerek gen aktarımı yapılmıştır. İlgili kaynaklarda 100 Golden promise olgunlaşmamış embriyosu başına 7-86 transgenik bitki elde edilebilmektedir (Tablo 2.3). Bu sayısal farklılık kullanılan prosedürlerin farklılığına ve uygulama şekline bağlı olabilir. Seçici besiyerinde elde edilen transformant sayısı, *Agrobacterium* enfeksiyonu sonrası oluşan nekrozun ya da olgunlaşmamış doku yerine olgun doku kullanılması kaynaklı düşük hücre bölünmesinin bir sonucu olabilir.

Çalışmada, seleksiyon sonrası kazanılan bitkilerde transgenlerin varlığını araştırmada ilk olarak PZR kullanılmıştır. PZR ile Tokak 157/37 bitkilerinin %53'ünde GUS ve %78'inde NPT II genlerinin çoğaltımı yapılmıştır. Golden promise'de bitkilerin %44'ünde GUS ve %63'ünde NPT II genlerinin çoğaltımı yapılabilmektedir. Çalışmamızda, bazı örneklerde GUS varlığı tespit edilirken NPT II geni varlığı tespit edilememiştir. Bunun nedeni aktarım sürecinde primerlerin bağlanacağı bölgenin ya da *neomisin fosfattransferaz II* geninin tamamen kaybolması olabilir. Sha ve diğ. (2004) yaptıkları çalışmada 190 bitkinin tamamında *hpt* (*higromisin fosfotransferaz*) geni çoğaltımını sağlamalarına rağmen, 12 bitki örneğinde GUS genini çoğaltamamışlardır.

İkinci adım olarak, kararlı gen aktarımının ve bitki genomuna bağlanan transgen kopya sayısının belirlenebilmesi amacıyla Southern melezlemesi yapılmıştır. 39 Tokak 157/37 ve 18 Golden promise bitkisinin tarandığı çalışmalarda, genomik DNA'lar gen dışı bölgelerden kesim yapan *NcoI* ya da *BamHI* enzimleriyle kesildikten sonra GUS ve NPT II problemleriyle melezleme yapıldı. Çalışmalarda pozitif kontrol dışında, proba eşleşme görülmemiştir. Sha ve diğ.'lerinin (2004) yaptığı çalışmada transgen tek kopya oranı %59 olarak gösterilirken, Lange ve diğ. (2006) %52 olarak göstermişlerdir. Hensel ve diğ.'nin (2008) yaptığı kopya sayısı analiz çalışmalarında transformantların yaklaşık yarısında tek kopya halinde transgen varlığı tespit edilirken, %19'unda 2 den fazla kopya belirlenmiştir. Hatta aynı çalışmada tek kopyalı hatların oranının % 88'e kadar çıktığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında bitki genomuna T-DNA girişinin düşük frekansda olduğu görülür. Bu da, DNA-prob melezlemesi çalışmalarını zorlaştıran bir unsur olabilir.

Çalışmada üçüncü aşama olarak, "TAIL" PZR ile gen entegrasyon analizi yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda pCAMBIA2301 vektörünün sağ sınır dizileri ve arpa genomuna ait parçalar tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda toplam 21 bitki örneğinde PZR yapılarak çok sayıda bant şablonları elde edilmiştir (Şekil 4.8). Jel analizlerinde genom adımlamasına uygun ağırlıklarda bantlar görülmesine karşın; elde edilen toplam 28 bant örneğin dizilenmesi sonucunda, üç örnekte T-DNA sağ sınır bölgeleri tespit edildi. Tokak 157/37 çeşidine ait DNA örneğinde rastlanan bu dizilerden birinde entegrasyonun HSP (ısı şoku proteini) geninde diğ. ise *Hbc8* geninde, Golden promise örneğinde ise entegrasyonun *Beta galaktosidaz* geninde olduğu biyoinformatik araçlarla belirlendi. Çalışmamızda örneklerin taranmasında T-DNA sağ sınırındaki iki ayrı bölge ve sol sınır bölgesi kullanıldı. Arpada yapılan çalışmalarda bitki genomunda T-DNA sağ sınırında gerçekleşen girişlerde bu bölgenin çeşitli şekillerde eksilmiş olduğu saptanmıştır (Stahl ve diğ., 2002; Fang ve diğ.; 2002). Bu tez çalışmasında saptanan örneklerde de benzer olarak T-DNA dizilerinde eksiklik vardır. Ancak bir dizide T-DNA sağ sınır dizi motifleri (TGTT ve GACAGGA) net olarak görülebilmektedir.

Önceki yıllarda *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımında, sadece T-DNA sınırları arasındaki dizilerin bitki genomuna bağlandığı kabul ediliyordu. Ancak sonraki yıllarda incelenen transformantlarda, T-DNA'nın yanında vektör dizilerinin de bulunduğu gösterildi (Ramanathan ve Verluthambi, 1995). Bu tarz gen aktarım olayları sınırlı miktarda *virD* gen ürününden kaynaklanıyor olabilir (Tinland ve diğ., 1995). VirD gen üretiminin yetersiz olması sınır dizilerinin etkin şekilde kesilememesine ve hatta bazı durumlarda ikili vektörün tamamının bitki genomuna bağlanmasına neden olabilmektedir (Wenck ve diğ., 1997). *Agrobacterium* aracılı gen aktarımında T-DNA'nın yanında vektöre ait dizilerin de bitki genomuna bağlanmasının sıradan bir olay olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Cluster ve diğ. 1996). Ayrıca, T-DNA entegrasyonlarında *Agrobacterium* kromozomal DNA (AchrDNA) parçalarında bitki genomuna girdiği gösterilmiştir. Ülker ve diğ.'nin (2008) yaptığı çalışmada her 250 transgenik bitkiden birinin AchrDNA parçaları taşıdıkları gösterilmiştir.

Arpa'da benzer şekilde yapılan entegrasyon analizlerinde en fazla genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile parçalara ayrılmasına dayanan PZR temelli genom adımlama yöntemleri kullanılmıştır (Fang ve diğ., 2002 ; Stahl ve diğ., 2002, Cooper ve diğ.; 2004). Bu yöntemde bitki genomik DNA'sı restriksiyon enzimiyle parçalanarak farklı büyüklüklerde genomik DNA parçaları oluşturulmakta ve daha sonra bu parçalar ligaz enzimi kullanılarak dairesel DNA'ya dönüştürülmektedir. Hedef DNA bilinen bir endonükleaz ile kesilmekte ve dizisi bilinen doğrusal terminal diziler elde edilmektedir. Bu diziler daha sonra PZR yöntemi ile çoğaltılmaktadır. Ancak, bu şekilde yapılan PZR temelli genom adımlamasında genomik DNA parçalarından etkin şekilde dairesel DNA elde etmek zordur. Bu yöntemlerin diğer kısıtlamaları, restriksiyon bölgelerinin lokusa özgü primerlere çok yakın ya da uzak olmasından dolayı ya çok küçük DNA parçaları çoğaltılması ya da DNA çoğaltımının olmamasıdır. Ayrıca, bir çok durumda genom adımlaması deneyine başlamadan önce ilgilenilen bölgenin restriksiyon enzim bölgesinin dağılımı bilinmemektedir. Bu nedenle, PZR kullanılarak başarılı genom adımlamasının yapılması ve bilinmeyen dizilerin tanımlanması için gerekli uygun DNA parçalarının üretilmesi için çok sayıda farklı enzimin kombine şekilde denenmesi gerekmektedir

Arpa'da "TAIL" PZR ise ilk kez çalışmamızda denenmiştir. Bu yöntem zahmetli klonlama aşamaları ve yoğun laboratuvar çalışmalarına göre daha hızlı ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntemde spesifik primerlerin ve rastgele primerlerin tasarlanması önem taşımakta ve verimi artırmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda literatürde yayınlanmış primerlere (Liu *ve diğ.*, 1995) ek olarak vektör dizilerine özgü yeni primerler tasarlanmıştır. Elde edilen dizilerde SP4 ve TR3 spesifik primerleri ile AD3 ve AD4 RD primerleri ile verimli sonuçlar elde edilmiştir. Diğer yandan, çalışmamızda "TAIL" PZR ile elde edilen örneklerin çoğunun arpa genomuna rastgele bağlanmalar olduğu gözlenmiştir. Bu yöntemin en önemli dezavantajını oluşturmaktadır.

Dikotil bitkilerde yapılan daha önceki çalışmalarda T-DNA entegrasyonunun rastgele bir işlem olduğu ileri sürülüyordu (Wallroth *ve diğ.*, 1986; Chyi *ve diğ.*, 1986) ve bu görüş FISH analizleri ile de desteklenmişti (Fransz *ve diğ.*, 1996; Papp *ve diğ.*, 1996; Park *ve diğ.*, 1996; Iglesias *ve diğ.*, 1997). Ancak, sonraki detaylı çalışmalarda entegrasyonun sıklıkla transkripsiyon birimlerinde gerçekleştiği ve bazı çalışmalarda neredeyse bütün entegrasyon faaliyetlerinin genlerde olduğu gösterilmiştir (Feldmann, 1991; Lindsey *ve diğ.*, 1993). Örneğin *Arabidopsis*'te gen yoğunluğu fazladır oysaki çeltikte, genler genomun %10-25'ini yansıtan belirli bölgelerde sınırlandırılmıştır. *Arabidopsis*'te T-DNA girişinin dağılımı rastgele iken, çeltikte T-DNA entegrasyonu çoğunlukla gen alanı (gene space) adı verilen bu bölgelere karşılık gelmektedir. Bu çalışmada elde edilen T-DNA girişlerinin de gen bölgelerinde olması önceki sonuçlarla tutarlılık göstermiştir.

Arpadaki entegrasyon analizlerinde önemli bir konu biyoinformatikdir. Çok sayıda arpa genetik kaynakları bulunmasına karşın, bu bitkide genomik dizilemenin tamamlanmamış olması temel ve uygulamalı araştırmaları sınırlamaktadır. Yakın zamanda bu durumun çözümlenmesi beklenmektedir. Bu amaçla, Uluslararası Arpa Genomu Dizileme Konsorsiyomu (IBSC) kurulmuştur (<http://barleygenome.org>). Bu konsorsiyum arpa genomunun dizilenmesine önderlik etmektedir. Daha kapsamlı genomik dizi bilgilerinin yanısıra, TILLING ve T-DNA insersiyon mutant popülasyonlarının üretilmesi ve bir çok biyolojik mekanizmada görev alan genlerin

tanımlanmasını kolaylaştıracaktır. Bu dizi verileri gen entegrasyon analizlerinde de büyük katkı sağlayabilir.

Kararlı arpa transformasyonunun sağlanması temelde uygun doku kültürü şartlarının oluşturulması ve gen aktarım yöntemlerinin belirli genotiplerde optimize edilmesine dayanmaktadır. Yerli arpa varyetelerinde bu tipteki biyoteknoloji çalışmaları ilk kez Bölümümüzde başlatılmış ve halen devam etmektedir (Gözükırmızı *ve diğ.* , 1990; Arı, 1991; Gürel, 1997; Gürel ve Gözükırmızı, 2000; Karakaş, 2005; Gürel *ve diğ.*, 2009). Transformasyon çalışmaları genel olarak gen fonksiyonlarının etkin analizinde ve genetik mühendisliği ile yapılan arpa ıslahında önemli rol oynamaktadır. Bu tez çalışmasıyla ilk kez laboratuvarımızda elde ettiğimiz transformant bitkilerde aktarılan genlerin bitki genomundaki varlıkları kanıtlanmış ve giriş bölgeleri tespit edilmiştir. Bu yöntemlerin laboratuvarımızda işlerlik kazanması arpa ve diğer bitkilerde yapılacak transgen analizlerine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

ARI, Ş., 1991, *X ve gamma ışınlarının arpa doku kültürlerine etkileri*. Tez (Ph. D.), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

BACKES G., ORABI J. AND FISCHBECK G., JAHOR A., 2006, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 1 Cereals and Millets C. Kole (Ed.)© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006 .

BEHALL, K.M., SCHOLFIELD, D.J., HALLFRISCH, J., 2004, Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women, *Am. J. Clin. Nut.*, 80, 1185-1193.

CHENG, M., LOWE, B.A. , SPENCERT, M., YE, X., ARMSTRONG, C.L., 2004, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 40, 31–45.

CHOI, H.W., LEMAUX, P.G. CHO, M. J., 2002, Use of fluorescence *in situ* hybridization for gross mapping of transgenes and screening for homozygous plants in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.* 106, 92–100.

CHRISTIE, P.J., ATMAKURI, K., KRISHNAMOORTHY, V., JAKUBOWSKI, S., CASCALES, E., 2005, Biogenesis, architecture and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* ,59, 451–485.

CHYI, Y., JORGENSEN, R.A., GOLDSTEIN, D., TANKSLEY, S.D., LOAIZA-FIGUEROA, F., 1986, Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome, *Mol. Gen. Genet.*, 204, 64-69.

CITOVSKY, V., KOZLOVSKY, S.V., LACROIX, B., ZALTSMAN, A., DAFNY-YELIN, M., VYAS, S., TOVKACH, A., TZFIRA, T., 2007, Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection, *Cell. Mic.*, 9(1), 9–20.

CLUSTER, P.D., O'DELL, M., METZLAFF, M., FLAVELL, R.B., 1996, Details of T-DNA structural organization from a transgenic petunia population exhibiting co-suppression, *Plant Mol. Biol.*, 32, 1197-1203.

COOPER, L.D. , MARQUEZ-CEDILLO, L., SINGH, J., STURBAUM, A.K., ZHANG, S., EDWARDS, V., JOHNSON, K., KLEINHOF, A., RANGEL, S., CAROLLO, V., BREGITZER, P., LEMAUX , P.G., HAYES, P.M., 2004, Mapping *ds* insertions in barley using a sequence-based approach, *Mol. Gen. Genomics*, 272, 181-193.

DAI, S., ZHENG, P., MARMEY, P., ZHANG, S., TIAN, W., CHEN, S., BEACHY, R.N., FAUQUET, C., 2001, Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed.*, 7, 25–33.

FANG, Y.D., AKULA, C., ALTPETER, F., 2002, *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA::barley genomic DNA junctions, *J. Plant Physiol.*, 159, 1131-1138.

FELDMANN, K.A., 1991, T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* mutational spectrum, *The Plant J.*, 1, 71-82.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008, (Online), <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Ziyaret tarihi: 12 Mayıs 2010).

FORSBACH, A., SCHUBERT, D., LECHTENBERG, B., GILS, M., SCHMIDT, R., 2003, A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome, *Plant Mol. Biol.*, 52, 161–176.

FRANSZ, P.F., STAM, M., MONTIJN, B., TEN HOOPEN, R., WIEGANT, J., KOOTER, J.M., OUD, O., NANNINGA, N., 1996, Detection of single-copy genes and chromosome rearrangements in *Petunia hybrida* by fluorescence in situ hybridization, *Plant J.*, 9, 767–774.

GENE INDICES, 2010, (Online) <http://compbio.dfci.harvard.edu/temp/blastn-barley-22380-1275388025.html> (Ziyaret Tarih 25 Mayıs 2010)

GELVIN, S.B., 2000, *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration, *Annu. Rec. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 51, 223-256.

GENE INDICES, 2010, (Online) <http://compbio.dfci.harvard.edu/temp/blastn-barley-22380-1275388025.html> (Ziyaret Tarih 25 Mayıs 2010)

GOEDEKE, S., HENSEL, G., KAPUSI, E., GAHRTZ, M., KUMLEHN J., 2007, Transgenic barley in fundamental research and biotechnology, *Transgen. Plant J.l.*, 1, 104-117.

GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., ORALER, G., OKATAN, Y., ÜNSAL, N., 1990, Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley, *Acta. Bot. Neerl.*, 39(4), 379-387.

GRAINGENES, (Online) <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml> (Ziyaret tarihi: 10 mayıs 2010).

GÜREL, F., 1997, *Monokotil bitkilerde transformasyon çalışmaları*, Tez (Ph. D.), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- GÜREL, F., GÖZÜKIRMIZI, N., 2000, Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation, *Plant Cell Rep.*, 19,787-791.
- GÜREL, F., KARAKAŞ, Ö., ALBAYRAK, G., ARI, Ş., 2009, Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Acta Biol Hung.*, 60(3), 309-19.
- HENSEL, G., VALKOV, V., MIDDLEFELL-WILLIAMS, J., KUMLEHN, J., 2008, Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions, *J. Plant Physiol.*, 165, 71-82.
- HOOD, E.E., GELVIN, S.B., MELCHERS, S., HOEKEMA, A., 1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). *Transgen. Res.*, 2, 208-218
- IGLESIAS, V.A., MOSCONE, E.A., PAPP, I., NEUHUBER, F., MICHALOWSKI, S., PHELAN, T., SPIKER, S., MATZKE, M., MATZKE, A.J., 1997, Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco, *Plant Cell.*, 9,1251-1264.
- JAEHNE, A., BECKER, D., BRETTSCHEIDER, H., LOERZ, H., 1994, Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley, *Theor. and App. Genet.*, 89, 525-533.
- KARAKAŞ, Ö., 2005, *Arpada Gen Aktarım Frekansının Artırılmasına Yönelik Çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi.
- KASHA, K.J., 2007, Barley, *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 59 Transgenic Crops IV* ,© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.
- KIM, H., BEHALL, K.M., CONWAY, J.M., 2005, Consumption of whole grains containing beta-glucan altered short-term satiety and glycemic response in overweight women, *Cereal Food World*, 50, 276-277.
- KOHLI, A., TWYMAN, R.M., ABRANCHES, R., WEGEL, E., STOGER , E., CHRISTOU, P., 2003, Transgene integration, organization and interaction in plants, *Plant Mol. Biol.*, 52,247-258.
- LANGE, M., VINCZE, E., MOLLER, M.G., HOLM, P.B., 2006, Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Rep.*, 25, 815-820.
- LAZZERI, P.A., BRETTSCHEIDER, R., LUEHRS, R., LOERZ, H., 1991, Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts *Theor. and App. Genet.*, 81, 437-444.

- LEGGETT, M. J., PERRET, S. J., HARPER, J., MORRIS, P., 2000, Chromosome localization of co-transformed transgenes in the hexa-ploid cultivated oat *Avena sativa* L. using fluorescence *in situ* hybridization, *Heredity*, 84, 46–53.
- LIFSCHITZ, C.H., GRUSAK, M.A., BUTTE, N.F., 2002, Carbohydrate digestion in humans from a β -glucan-enriched barley is reduced, *J. Nut.*, 132, 2593-2596.
- LINDSEY, K., WEI, W., CLARKE, M.C., MCARDLE, H.F., ROOKE, L.M., TOPPING, J.F., 1993, Tagging genomic sequences that direct transfer expression by activation of a promoter trap in plants, *Transgen. Res.*, 2, 33-47.
- LIU, Y.G., CHEN, Y., ZHANG, Q., 2005, Amplification of genomic sequences flanking t-dna insertions by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction , *Transgenic Plants: Methods And Protocols*, 286, 341-348.
- LIU, Y.G., CHEN, Y., 2007, High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences, *Biotechniques*, 43, 649-656.
- LIU, Y.G., MITSUKAWA N, O., WHITTIER, R.F., 1995, Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR, *Plant J.*, 8, 457–463
- MICHIELS ,A., TUCKER, M., VAN DEN ENDE, W., VAN LAERE, A., 2003, Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-rich plant genomic DNA, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 21, 295–302.
- NCBI BLAST, (Online) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on, (Ziyaret tarihi: 10 mayıs 2010).
- OCHMAN, H., GERBER, A.S., HARTL, D.L., 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, *Genetics*, 120, 621–623.
- PAPP, I., IGLESIAS, V.A., MOSCONE, E.A., MICHALOWSKI, S., SPIKER, S., PARK, Y.D., MATZKE, M.A., MATZKE, A.J.M., 1996, Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy, *Plant J.*, 10, 469-478.
- PARK, Y.D., PAPP, I., MOSCONE, E.A., IGLESIAS, V.A., VAUCHERET, H., MATZKE, A.J.M., MATZKE, M.A., 1996, Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity, *Plant J*, 9, 183–194.
- PEDERSEN, C., ZIMNY, J., BECKER, D., GARTNER, A., J., LORZ, H., 1997, Localization of introduced genes in the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescent *in situ* hybridization, *Theor. Appl. Genet.*, 94, 749–757.
- QIN, H., DONG, Y., VON ARNIM A.G., 2003a, Epigenetic interactions between *Arabidopsis* transgenes: characterization in light of transgene integration sites, *Plant Mol. Biol.*, 52: 217–231.

- QIN, G., KANG, D., DONG, Y., SHEN, Y., ZHANG, L., 2003b, Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*, *Plant Sci.*, 165, 941–949.
- RAMANATHAN, V., VELUTHAMBI, K., 1995, Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA, *Plant Mol. Biol.*, 28, 1149–1154.
- SALVO-GARRIDO, H.G., TRAVELLA, S., SCHWARZACHER, T., HARWOOD, W.A., SNAPE, J.W., 2001, An efficient method for the physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization, *Genome*, 44, 104–110.
- SALVO-GARRIDO, H., TRAVELLA, S., BILHAM, L.J., HARWOOD, W.A., SNAPE, J.W., 2004, The Distribution of transgene insertion sites in barley determined by genetics physical and genetic mapping, *Genetics Soc. Am.*, 167, 1371-1379.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6.
- SCHULMAN, A.H., GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., 2004, Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, *Cereal Genomics*, 83–118.
- SHA, Y., LI, S., PEI, Z., LUO, L., TIAN, Y., HE, C., 2004, Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population, *Theor. Appl. Genet.*, 108, 306-314.
- SHEWRY, P.R., 1992, *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology (biotechnology in agriculture)*, The Alden Press, Oxford, s:549-571.
- SHOU, H., FRAME, B.R., WHITHAM, S.A., WANG, K., 2004, Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation, *Mol. Breed.*, 13, 201–208.
- SHRAWAT, A.K., BECKER, D., LORZ, H., 2007, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Science*, 172, 281–290.
- SREENIVASULU, N., GRANER, A., WOBUS, U., 2008, Barley Genomics: An Overview, *Journal of Plant Genomics*, Volume 2008, 1-13.
- STAHL, R., HORVATH, H., VAN FLEET, J., VOETZ, M., VON WETTSTEIN, D., WOLF, N., 2002, T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors, *PNAS*, 99, 2146–2151.
- SVITASHEV, S., ANANIEV, E., PAWLOWSKI, W.P., SOMERS, D.A., 2000, Association of transgene integration sites with chromosome rearrangements in hexaploid oat, *Theor. Appl. Genet.*, 100, 872–880.

- TINGAY, S., MCELROY, D., KALLA, R., FIEG, S., WANG, M., THORNTON, S., BRETTELL, R., 1997, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation, *Plant J.*, 11, 1369-1376.
- TINLAND, B., SCHOUMACHER, F., GLOECKLER, V., BRAVO-ANGEL, A. M., HOHN, B., 1995, The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome, *EMBO J.*, 14, 3585–3595.
- TRAVELLA, S., ROSS, S. M., HARDEN, J., EVERETT, C., SNAPE, J. W., HARWOOD, W. A., 2005, A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques, *Plant Cell Rep.*, 23, 780–789.
- TZFIRA, T., CITOVSKY, V., 2002, Partners-in-infection: host proteins involved in transformation of plant cells by *Agrobacterium*, *Trends Cell Biol.*, 12, 121-129.
- ULKER, B., LI, Y., ROSSO, M.G., LOGEMANN, E., SOMSSICH, I.E., WEISSHAAR, B., 2008, T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants, *Nat. Biotechnol.*, 26, 1015-1017.
- VON BOTHMER, R., VAN HINTUM, T., KNUPFFER, H., SATO, K., 2003, An introduction – diversity in barley (*Hordeum vulgare*), *Dev. Plant genetics and breeding*, 7, 3–8.
- WALLROTH, M., GERATS, A.G.M., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T., HORSCH, R.B., 1986, Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*, *Mol. and Gen. l Genet.*, 202, 6-15.
- WAN, Y., LEMAUX, P.G., 1994, Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants, *Plant Physiology*, 104, 37-48.
- WEINING, S., LANGRIDGE, P., 1991, Identificaiton and mapping of polymorphisms in cereals based on polymerase chain reaction, *Theor. Appl. Genet.*, 82(2), 209-216.
- WENCK, A., CZAKO, M., KANEVSKI, I., MARTON, L., 1997, Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Mol. Biol.*, 34, 913–922.
- ZOHARY, D., HOPF, M., 1993, *Domestication of Plants in the Old World: the Origin and Spread of Cultivated Plants in West,Asia, Europe, and the Nile Valley*, 2nd edn. Clarendon, Oxford.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Amasya’da doğdum. Orta ve lise öğrenimimi Merzifon Anadolu lisesinde tamamladım. 2005 yılında Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra Mikrogen İlaç’ ta bir yıl süre ile ürün müdür yardımcısı olarak çalıştım. 2007 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Yüksek lisans eğitimime başladım. 2009 yılından itibaren de İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.