

38321

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜTÜN VE PATATESTE
AGROBACTERIUM RHIZOGENES
İLE TRANSFORMASYON**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ercan ARICAN

Biyoloji Anabilim Dalı
(Moleküler Biyoloji - Genetik Programı)

Danışman : Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

MAYIS — 1995

ÖNSÖZ

In vitro koşullarda, steril ortamda bitki kısımlarının kültüre alınması ile bir çok bitkinin kısa sürede ve fazla miktarda üretimi sağlanmıştır. Doku kültürü ve gen transfer yöntemlerinin birlikte uygulanması ile de üstün özellikteki bitkiler kısa zamanda seçilebilmektedir.

Bu araştırmada, türevlendiği antikor molekülü ile aynı affinitede antijen bağlama kapasitesine sahip sentetik, tek zincirli ve antikor molekülünün sadece değişken bölgelerini içeren, scFv (single chain Fragment variable) genlerinin fazla miktarda üretimini sağlayacak, biyo-fabrikalar kurma amacına yönelik bir ön çalışma olarak; *Agrobacterium rhizogenes* 8196 yabancı suşunun R₁ plazmiti ile yurdumuzda yaygın biçimde ekimi yapılan *Nicotiana tabacum* ve *Solanum tuberosum* bitkilerinde gen transferi sisteminin optimizasyonu yapıldı.

Çalışmalarım sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım ve bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarıma, tezin hazırlanması ve yazımında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Şule ARI'ya, çalışma arkadaşlarım Araş.Gör. Gülruh ALBAYRAK, Araş.Gör. F.Gonca TOPOHAN, Araş.Gör. Serhat ALBAYRAK ve Araş.Gör. A.Filiz GÜREL'e , ayrıca TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nden Kasım BAYROVIÇ ve Rahmi BÜYÜKKESKİN'e, gerekli fotoğrafların hazırlanmasında emeği geçen Alaaddin ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Tüm yaşamımda olduğu gibi, tahsil hayatım boyunca da bana daima destek olan SEVGİLİ AİLEM'e çok teşekkür ederim.

İstanbul 1995

Ercan ARICAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZ VE ABSTRACT	IV
I. GİRİŞ	1
II. MATERYAL VE METOD.....	7
II.1. BİTKİ VE BAKTERİ MATERYALI	7
II.2. BAKTERİ ÜRETİMİ	7
II.3. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	8
II.3.1. <i>Tütün Doku Kültürünün Kurulması</i>	8
II.3.1.1. Tütün Tohumları Kullanılarak Doku Kültürünün Kurulması	8
II.3.1.2. Serada Yetiştirilen Tütün Bitkilerinin Doku Kültürünün Kurulması	8
II.3.2. <i>Patates Doku Kültürünün Kurulması</i>	9
II.4. A. RHIZOGENES İLE İNOKÜLASYON VE İNKÜBASYON ÇALIŞMALARI	9
II.4.1. <i>Tütün Yaprak Diskleri ve Patates Tuber Disklerinde İnokülasyon</i>	9
II.4.2. <i>Tütün ve Patates Internod Eksplantlarında İnokülasyon</i>	10
II.5. TRANSFORMASYONUN MOLEKÜLER DÜZEYDE ANALİZİ.....	12
II.5.1. <i>Transforme Tütün ve Patates Bitkilerinde Gelişen Saçak Köklerden DNA İzolasyonu</i>	12
II.5.2. <i>Plazmit İzolasyonu</i>	13
II.5.3. <i>Genomik DNA'ların ve Plazmit DNA'sının Restriksiyon Endonukleazları ile Kesimi</i> ..	15
II.5.4. <i>Elektroforez</i>	16
II.5.5. <i>Southern Blot Hibridizasyonu</i>	17
II.5.5.1. Prob'un Hazırlanması	17
II.5.5.2. Elektroblob	18
II.5.5.3. Prehibridizasyon	18
II.5.5.4. Hibridizasyon	19
II.5.5.5. Otoradyografi	19
III. BULGULAR	21
III.1. A. RHIZOGENES İLE TRANSFORME BİTKİLERDE SAÇAK KÖK ELDESİ.....	21
III.1.1. <i>Tütün Yaprak Disklerinde ve Patates Tuber Disklerinde Saçak Kök Oluşumu</i>	21
III.1.2. <i>Tütün ve Patates Internodlarında Saçak Kök Oluşumu</i>	24
III.2. İNOKÜLASYON SIRASINDA BAKTERİ YOĞUNLUĞUNUN TRANSFORMASYONA ETKİSİ	26
III.3. BAKTERİ ÜREMESİNİN DURDURULMASI İÇİN KULLANILAN ANTİBİYOTİK MİKTARININ TRANSFORMASYONA ETKİSİ.....	26
III.4. İNTERNOD BOYUTLARININ TRANSFORMASYON BAŞARISINA ETKİSİ	27
III.5. SAÇAK KÖKLERDEN İZOLE EDİLEN DNA'NIN JEL ELEKTROFOREZİ İLE BELİRLENMESİ	27
III.6. SOUTHERN BLOT HİBRİDİZASYON İLE TRANSFORMASYONUN KANITLANMASI	28

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
V. ÖZET VE SUMMARY.....	33
VI. KAYNAKLAR.....	35
VII. ÖZGEÇMİŞ.....	41



ÖZ

Tütün ve Patateste *Agrobacterium rhizogenes* ile Transformasyon

Bu çalışmada, *Nicotiana tabacum* Samsun NN ve *Solanum tuberosum* Yayla kızı varyeteleri yabani tip *Agrobacterium rhizogenes* 8196 ile transforme edildi ve transformasyon Southern blot hibridizasyonu ile kanıtlandı.

ABSTRACT

Transformation of Tobacco and Potato by *Agrobacterium rhizogenes*

In this study, *Nicotiana tabacum* Samsun NN and *Solanum tuberosum* Yayla kızı varieties were transformed by wild type *Agrobacterium rhizogenes* 8196 and transformation was confirmed by Southern blot hybridization.

I. GİRİŞ

Bitkilerin rekombinant proteinlerin, yeni karbonhidratların veya lipidlerin üretimi için kullanılmaları son yıllardaki en önemli araştırma konularından biridir. Dünyadaki en ucuz protein kaynaklarından olan bitkilerden bu yetenekleri nedeniyle besin endüstrisinin yanısıra çeşitli farmakolojik ürünlerin eldesi için de yararlanılabilmektedir (MOLONEY, 1995). Örneğin insan serum albumin geni (HSA) transgen teknolojisi ile patatese aktarılmış 12 kg HSA/hektar verim elde edilmiştir (SIJMONS ve ark., 1990). Moleküler biyo-üretim olarak tanımlanan bu alan bitki biyoteknolojisinde bitki ıslahı ve sekonder metabolit üretimlerinden sonra sınırsız yeni ufuklar açmıştır.

Patates (*Solanum tuberosum*), nişastalı yumruları için yetiştirilen dünyanın en önemli bitkisel besin kaynaklarından biridir. Anayurdu Güney Amerika'daki And Dağları olup 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir. 18. yüzyıldan itibaren pek çok ülkede ana besin kaynağı olarak ekmeğin yerini almıştır. Yurdumuzda da yüzyıldan fazla bir zamandan beri yetiştirilmektedir. Günümüzde başta gelen patates üreticileri; Bağımsız Devletler Topluluğu, Almanya, Fransa, İngiltere, Hollanda, İrlanda, İspanya ve Türkiye'dir. Bol miktarda nişastanın yanısıra kalsiyum ve C vitamini içeren patates, insan besini olduğu gibi hayvan yemi olarak da kullanılır. Solanin adı verilen alkaloidin, nişasta, glukoz ve alkol eldesinde de hammadde olarak patatesten yararlanılır. Patates bazı virüslerin (patates X ve Y virüsü) bakterilerin (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum*) ve mantarların (*Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*) neden oldukları hastalıklara karşı çok duyarlıdır (DESTAFANO-BELTRAN ve ark., 1990). Çeşitli zararlılardan (*Heliothis sp.*, *Spodoptera sp.*) da büyük ölçüde etkilenir (PEFERON ve ark., 1990).

Keyif verici yaprakları için yetiştirilen, ekonomik değere sahip olan tütünün (*Nicotiana tabacum*) anayurdu ise Orta ve Güney Amerika'dır. 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilen tütün, önceleri süs bitkisi olarak daha sonraları şifa bitkisi olarak kullanılmıştır. 17. yüzyıldan beri tütün ziraati yurdumuzda da yapılmaktadır. Günümüzde başta gelen tütün üreticileri; Çin, ABD, Hindistan, Brezilya, İtalya, Türkiye ve Yunanistan'dır. Çeşitli iklim ve toprak şartlarına kolayca uyum sağlayabilen tütün bitkisi, taşıdığı nikotin ve nornikotin adı verilen alkaloidlerinden dolayı hemen hemen her ülkede yetiştirilmektedir.

In vitro koşullarda, steril sentetik besiyerlerinde bitki parçalarının (hücre, doku veya organ) kültürlenmesinin yapılabilmesi; doku kültürü sistemlerinin kurulması; birçok bitkinin kısa sürede ve fazla miktarlarda üretilebilmelerini mümkün hale getirmiştir (MURASHIGE ve SKOOG, 1962).

Modern doku kültürü ve gen transferi yöntemlerinin patatese uygulanması ile üstün özellikteki bitkiler kısa zamanda seçilebilmektedir (LAWSON ve ark., 1990). Ancak, kullanılan bitki genotipi, doku kültürü ve gen transferi yöntemlerinin uygulanmasında sınırlayıcı olmaktadır (HIGGINS ve ark., 1992; BAYROVIÇ ve ark., 1995). Tuber oluşumu sürecinin gelişimsel olarak kontrol edilebilmesi patates bitkisinin doku kültürü sistemlerinde kullanılabilmesinde olumlu bir özellik kazandırırken rejenerasyon süresinin uzun olması bu bitki için olumsuz bir özelliktir (OOMS ve ark., 1985). Kültürü yapılan patates bitkisine, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi özelliklerin kazandırılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalar içinde virüslere dirençli bitkilerin elde edilmesi verim ve kaliteyi korumak açısından önemlidir (TIMMERMAN, 1991).

Tütün bitkisi ekonomik öneminin yanısıra doku kültürü ve moleküler düzeydeki çalışmalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Tütünden alınan eksplantlar kültür koşullarında kolayca rejenera olma yeteneğindedirler. Örneğin, yapraktan alınan somatik hücreler uygun doku kültürü koşulları sağlandığında 1-2 hafta içerisinde rejenera

olarak yeni bitkiler oluşturabilmektedirler. Benzer şekilde, tütün yapraklarından izole edilen protoplastlar da (hücre duvarları kaldırılmış hücreler) yüksek oranda yeni bir bitki oluşturma yeteneğindedirler. Tütünün gen transferi yöntemlerinde başarılı bir şekilde kullanılması, bu bitkiyi moleküler biyoloji çalışmaları için model organizma haline getirmiştir (HORSCH ve ark., 1985; GÖZÜKIRMIZI ve ark., 1995).

Bitkilerde gen transferi çalışmalarında kullanılan *Agrobacterium* türleri patojenik özelliğe sahip olan toprak bakterilerindedir. 330'un üzerinde dikotiledon bitkiyi yara bölgesinden infekte ederek düzensiz doku gelişimine neden olurlar. Bitkilerin önemli bir kısmının *Agrobacterium* ile transforme edilebilmesinin genetik mühendisliği açısından önemi, bu bakterinin kendi plazmit DNA'sının bir kısmını konak bitki hücrelerine doğal olarak aktarabilmesidir (MURRAY, 1993). Ancak, bitkilerde ortaya çıkan transformasyon frekansları, kullanılan bitki türüne, bakteri suşuna ve yönteme göre farklılık göstermektedir. *Agrobacterium* ile monokotillere gen transferi, bu bakterinin monokotil bitki hücre duvarına bağlanamaması, T-DNA promotörlerinin düşük düzeyde aktivite göstermesi, vir genlerinin yeterince çalışmaması ve monokotillerin değişik oksin/sitokin dengesine sahip olmalarından dolayı, dikotiledonlardakine göre daha düşük düzeyde başarılılabilmektedir (AN ve ark., 1985).

Değişik *Agrobacterium* türleri (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter*) farklı bitkilere gen transferi çalışmalarında kullanılmaktadırlar. *A. tumefaciens*'e ait plazmit DNA'sının bitki genomuna girişinin saptanması bitki ile patojenik bakteri arasındaki ilişkinin ortaya konulmasını sağlamıştır (KERR ve BRISBANE, 1983; KLEE ve ark., 1987). Bu plazmit DNA'sı bitkilerde tümör oluşumunu teşvik ettiği için T_i (tumor inducing) plazmit olarak tanımlanmakta ve taç tümör (crown gall) adı verilen farklılaşmamış hücre topluluklarının meydana gelmesine neden olmaktadır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *A. rhizogenes* türünün taşıdığı plazmitin

ise saçak kök (hairy root) oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiş ve bu özelliğinden dolayı R_i (root inducing) plazmit olarak isimlendirilmiştir (SIMPSON ve ark., 1986).

Her iki organizma arasında büyük benzerlikler olmasına rağmen *A. tumefaciens* tarafından oluşturulan infeksiyonun moleküler düzeyi, *A. rhizogenes*'inkinden daha iyi anlaşılmıştır (WEBB ve MORRIS, 1992). Her iki *Agrobacterium* türüne ait plazmitlerin bitki genomuna giren kısımları T-DNA (transfer olan DNA) bölgeleridir (GRANT ve ark., 1991). 14-42 baz çifti uzunluğundaki T-DNA her iki ucunda transformasyon için gerekli olan 25 baz çiftlik tekrar bölgeleri içerir (MELCHERS ve HOOYKAAS, 1987). R_i plazmidi üzerinde bulunan diğer bir bölge ise, T-DNA'nın kesilerek bitki hücresine transferinde rol oynayan enzimleri şifreleyen vir genlerini taşır.

R_i plazmidinin T-DNA bölgesi TL ve TR olmak üzere iki parçadan meydana gelir. Her iki segmentin bitki genomuna girişi stabildir. TR bölgesi oksin ve opin türevlerinden olan agropin biyosentezi ile ilişkilidir. TL bölgesi ise, saçak kök fenotipinin ortaya çıkmasından sorumlu olan, *rol* A,B,C,D olarak adlandırılan 4 gen lokusunu taşımaktadır (WHITE ve ark., 1985; SPENA ve ark., 1987; CAPONE ve ark., 1989; TEPFER, 1983; TEMPÉ ve CASSE-DELBORT, 1989; GELVIN, 1990).

Opin adı verilen nadir amino asitler *Agrobacterium* türlerinin karbon ve azot kaynağıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda 3 farklı opin tipi olan agropin, mannopin ve kukumopin ile ilgili R_i plazmitleri belirlenmiştir. *A. rhizogenes*'in sadece agropin tipinin *A. tumefaciens*'te tanımlanmış olan oksin biyosentezinden sorumlu *aux* 1 ve 2 (*tms*) genleri ile homoloji ve komplemantasyon gösterdiği saptanmıştır (WHITE ve ark., 1985; COSTANTINO ve ark., 1980).

R_i plazmiti ile transforme edilen köklerin gelişimi normal bitki büyümesine oranla daha yüksektir. Bu nedenle, günümüzde geniş bir sekonder ürün grubu (çeşitli alkaloidler, naftakinonlar, steroidler, protein yapısında olmayan amino asitler, allelokimyasal bileşenler,

terpenoidler, flavonoidler vb.) kök kültürlerinde sentezlenebilmektedir (PHILLIPSON, 1990).

Transforme kök kültürlerinin gelişimindeki başlıca hedefler; (1) *A. rhizogenes* aracılığıyla genetik manipulasyonu yapılacak konak organizma sınırını genişletmek, (2) çeşitli yöntemler ile üreme oranını yükseltmek, (3) biyosentez yollarında iş gören anahtar enzimleri kodlayan genlerin anlatımı yoluyla ürün birikimini arttırmak ve (4) bitkileri biyo-fabrikalar olarak kullanmaktır.

A. rhizogenes'in bitkilere gen transferinde kullanılabilmesi için bitki ve bakteri düzeyinde bazı faktörlerin optimizasyonu gereklidir. Çünkü aynı bakterinin değişik suşlarının, bir bitki türünün farklı varyetelerini infekte edebilme yetenekleri farklıdır. Aynı zamanda, doku kültürü ortamının bileşimi, kültürlerin tutulduğu ortamın fiziksel koşulları (sıcaklık, ışık, nem vb.) da bitki rejenerasyonunu ve gen transferinin başarısını etkilemektedir (HORSCH ve ark., 1985).

Son yıllarda antikor mühendisliğindeki gelişmeler ile, sentetik tek iplikli antijen bağlayan değişken parçalı proteinler (scFv=Single chain fragment variable) oluşturulabilmektedir. scFv molekülleri, immünglobulin molekülünün değişken kısımlarının (V_L ve V_H) bir peptid köprü ile birbirine bağlı olduğu tek iplikli polipeptidlerdir (WHITLOW ve FILUPA 1991; OWEN ve ark., 1992a). scFv teknolojisinin birçok uygulaması arasında scFv genlerinin bitki dokularındaki ekspresyonu; tarımsal biyoteknoloji ve bitki koruma amaçları açısından büyük önem taşımaktadır. Patojenitenin engellenmesi için antiviral scFv'lerin oluşturulması, bitki koruma alanındaki en modern uygulamalardandır (OWEN ve ark., 1992b; TAVLODORAKI ve ark., 1993).

Bu çalışmada; türevlendiği antikor molekülü ile aynı affinitede antijen bağlama kapasitesine sahip, sentetik, tek zincirli ve antikor molekülünün sadece değişken bölgelerini içeren, scFv genlerinin fazla miktarda üretimini sağlayacak, biyo-fabrikalar kurmak amacına yönelik bir ön çalışma olarak *A. rhizogenes* 8196 yabancı suşu R_i

plazmiti ile yurdumuzda yaygın biçimde ekimi yapılan *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN ve *Solanum tuberosum* L. cv. Yayla kızı bitkilerinde gen transfer sistemlerinin optimizasyonu amaçlandı.



II. MATERYAL ve METOD

II.1. Bitki ve Bakteri Materyali

Bu çalışmada kullanılan *Solanum tuberosum* L. cv. Yayla kızı, Zirai Araştırma Enstitüsü Bornova-İzmir'den, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN ise Tekel Araştırma Enstitüsü Cevizli-İstanbul'dan sağlandı. Her iki bitki varyetesi de *Agrobacterium rhizogenes* 8196 yabancı bakteri suşu ile transforme edildi.

II.2. Bakteri Üretimi

A. rhizogenes'in 8196 mannopin tip R_i plazmitini içeren yabancı suşunun; Luria-Broth (LB) sıvı besiyerinde (Tablo 1), 37°C'de 600 devir/dakika'daki çalkalayıcı inkübatör içerisinde bir gecelik kültürleri yapıldı.

Tablo 1. *A. rhizogenes* 8196 bakteri suşunun üretiminde kullanılan Luria-Broth (LB) sıvı besiyeri.

Maddeler	Miktarlar (g/l)	
Bactotrypton	10	
Yeast extract	5	
NaCl	10	pH 7.0

II.3. Bitki Doku Kùltùrlerinin Kurulması

Doku kùltùrleri; patates bitkisinde tuber diski, tütünde ise direkt steril ortamda yetiştirilen tohumlardan gelişen bitkiciklerin internod ve sera koşullarında yetiştirilmiş bitkilerin yaprak disk eksplantları kullanılarak kuruldu.

II.3.1. Tütün Doku Kùltürünün Kurulması

Tütünde doku kùltürlerinin kurulması amacıyla, tütün tohumları ve serada yetiştirilmiş olan bitkiciklerin yapraklarından yararlanıldı.

II.3.1.1. Tütün Tohumları Kullanılarak Doku Kùltürünün Kurulması

Tütün tohumları yüzey sterilizasyonu için, %70 etanolde 5 dakika tutulduktan sonra %1 sodyum hipoklorid solusyonunda 20 dakika bırakıldılar. Süre sonunda tohumlar en az 2 saat steril destile su ile yıkanarak hormonsuz Murashige ve Skoog (MS) (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (Tablo 2). 25°C'deki kontrollu bitki büyütme kabininde 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyodunda tutularak çimlenen bu tohumlardan alınan bitkicikler, 4 haftada bir alt kùltürleme yapılmak suretiyle hormonsuz MS besiyerlerinde çoğaltılarak doku kùltürleri kuruldu.

II.3.1.2. Serada Yetiştirilen Tütün Bitkilerinin Doku Kùltürünün Kurulması

Serada yetiştirilen tütün bitkilerinden elde edilen yaprakların yüzey sterilizasyonu için, %70 etanolde 5 dakika tutulduktan sonra %1 sodyum hipoklorid solusyonunda 20 dakika bırakıldılar. Süre sonunda yapraklar en az 2 saat steril destile su ile yıkandılar. Steril tütün yapraklarından 0.5 cm çapında yaprak diskleri çıkarıldı ve tütün rejenerasyon besiyeri olan Naftalen Asetik Asit (NAA) ve Benzil Amino

Purin (BAP) hormonlarını içeren, MSD₄ olarak adlandırılan besiyerine (Tablo 2) aktarıldılar. Yaklaşık 20-25 gün sonra yaprak disklerinden gelişen bitkiciklerin, 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyodunda 25°C'deki kontrollü bitki büyütme kabininde 4 haftada bir alt kültürlemeleri yapılarak doku kültürleri kuruldu.

II.3.2. Patates Doku Kültürünün Kurulması

Patates tuberleri yüzey sterilizasyonu amacıyla kabukları soyulduktan sonra %70 etanolde 5 dakika tutulup ardından %1'lik sodyum hipoklorit solusyonunda 20 dakika bırakılan ve en az 2 saat steril destile su ile yıkanan tuberlerden 0.5 cm çapında kesilen diskler Zeatin Ribosid (ZR) ve İndol Asetik Asit (IAA) içeren MS (Tablo 2) besiyerine aktararak doku kültürü başlatıldı. Yaklaşık bir ay sonunda steril patates diskleri üzerinde gelişen bitkicikler kesilerek mikro çoğaltım ile çok sayıda bitkicik elde edildi. Bu kültürler 25°C'deki kontrollü bitki büyütme kabininde 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyodunda tutuldular. Alt kültürlemeler 4 haftada bir yapıldı.

II.4. *A. rhizogenes* ile İnokülasyon ve İnkübasyon Çalışmaları

Tütün ve patatesten transformasyonun gerçekleştirilmesi için kullanılan bitki parçaları *A. rhizogenes* ile inoküle edildiler.

II.4.1. Tütün Yaprak Diskleri ve Patates Tuber Disklerinde İnokülasyon

Steril tütün yaprak ve patates tuber diskleri (yaklaşık 45-50 adet), A₆₀₀= 0.1, 0.2 ve 0.4 olacak şekilde sıvı LB besiyeri ile sulandırılmış, bir gecelik taze *A. rhizogenes* 8196 solusyonunda 15'er dakika tutularak inoküle edildiler. Tuber ve yaprak diskleri daha sonra hormonsuz MS besiyerinde 2 gün karanlık şartlarda ko-kültüre edildiler. Bu süre sonunda fazla miktarda üremiş olan bakterileri

uzaklaştırmak amacı ile tuber ve yaprak diskleri 500 mg/l Cefotaxime (Cx) içeren steril destile suda 4-5 saat yıkandılar. Diskler, daha sonra değişik Cx konsantrasyonlarını (250, 350, 500 ve 650 mg/l) içeren MS+ 1 mg/l NAA besiyelerinde 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyodunda, 25°C'deki kontrollü bitki büyütme kabininde kök oluşturmak üzere tutuldu ve alt kültürlemeler 4 haftada bir yapıldı. İstatistiksel analizler khi-kare testi ile yapıldı.

II.4.2. Tütün ve Patates Internod Eksplantlarında İnokülasyon

Doku kültüründe gelişen patates ve tütün gövdelerinin farklı bölgelerinden alınan yaklaşık 1-2 mm çapındaki internodlar, $A_{600} = 0.1, 0.2$ ve 0.4 olacak şekilde sıvı LB besiyeri ile sulandırılmış, bir gecelik taze *A. rhizogenes* 8196 solusyonunda 15 dakika tutularak inokule edildiler. Bu internodlar 2 gün karanlık koşullarda hormonsuz MS besiyerinde tutuldular, bu süre sonunda, ortamda fazla miktarda üremiş olan bakterileri uzaklaştırmak amacı ile 500 mg/l Cx içeren destile suda 4-5 saat yıkandılar. Internodlar, farklı konsantrasyonlardaki (250, 350, 500 ve 600 mg/l) Cx ve 1 mg/l NAA içeren MS besiyerlerinde 16 saat ışık / 8 saat karanlık şartlardaki kontrollü bitki büyütme kabininde saçak kök oluşturmak üzere tutuldular.

Her bir deney serisi için bakteri inokülasyonu yapılmaksızın yetiştirilen kontrol kültürleri ve inokule edilerek yetiştirilen kültürler morfolojik olarak izlendiler ve transgenik kök oluşumu gösteren eksplantlar moleküler çalışmalar için ayrıldı. İstatistiksel analizler khi-kare testi ile yapıldı.

Tablo 2. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan besiyerleri.

1) Hormonsuz besiyeri, 2) Tütün yaprak disklerinde rejenerasyon besiyeri, 3) Tuber disklerinde rejenerasyon besiyeri.

(*: mg/l, **: g/l, ***: ml/l)

İÇERİK	1	2	3
Amonyum Nitrat*	1650.0	1650.0	1650.0
Borik asit*	6.2	6.2	6.2
Kalsiyum Klorit*	332.2	332.2	332.2
Kobalt klorit•6H ₂ O*	0.025	0.025	0.025
Kuprik Sülfat•5H ₂ O*	0.025	0.025	0.025
Etilendiamintetraasetikasit•2H ₂ O*	37.26	37.26	37.26
Demir Sülfat•7H ₂ O*	27.8	27.8	27.8
Magnezyum Sülfat*	180.7	180.7	180.7
Manganez Sülfat•1H ₂ O*	16.9	16.9	16.9
Molibdik Asit•2H ₂ O*	0.25	0.25	0.25
Potasyum İyodid*	0.83	0.83	0.83
Potasyum Nitrat*	1900.0	1900.0	1900.0
Potasyum Fosfat*	170.0	170.0	170.0
Çinko Sülfat•7H ₂ O*	8.6	8.6	8.6
Agar**	11	11	11
Sukroz**	30	30	30
Glisin***	2.0	2.0	2.0
myo-Inositol***	100.0	100.0	100.0
Nikotirik Asit***	0.5	0.5	0.5
Pridoksin•HCl***	0.5	0.5	0.5
Tiamin•HCl***	0.1	0.1	0.1
Benzil amino purin*		1.0	
2,4-Diklorofenoksiasetikasit*			
Gibberellik Asit ₃ *			
İndol Asetik Asit*			1.5
Naftalen Asetik Asit*		0.1	
Zeatin ribozid*			0.5

II.5. Transformasyonun Moleküler Düzeyde Analizi

Tütün ve patates bitkilerine *A. rhizogenes* ile yapılan transformasyon, morfolojik gözlemlerin yanısıra moleküler düzeyde genoma giren *A. rhizogenes* T-DNA'sının Southern blot hibridizasyonu ile de araştırıldı.

II.5.1. Transforme Tütün ve Patates Bitkilerinde Gelişen Saçak Köklerden DNA İzolasyonu

Bitki DNA'sı, WALBOT (1988) yöntemine göre izole edildi. Transforme kökler, 1.5 ml'lik mikrotüp içerisinde sıvı azot ile dondurulduktan sonra özel bir cam pipet ile toz haline getirildi. Daha sonra 0.5 ml'lik ezme tamponu (Tablo 3) içerisinde bulamaç olana dek ezildi. Mikrotüp buz içerisine 5 dakika oturtuldu. 4°C'de 5000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı. Çökelti 0.3 ml süspansiyon tamponunda (Tablo 3) süspanse edildi. Bu tüplere hücre çeperi ve zarının parçalanması amacıyla 20 µl %20 Sodyum Dodesil Sülfat (w/v) (SDS) eklendi ve tüp birkaç kez karıştırıldı. 70°C'deki su banyosunda 15 dakika bırakıldı. Mikrotüpe proteinleri çöktürmek için 150 µl 7.5M amonyum asetat eklendi. 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 15000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjleme yapılarak amonyum sülfat çöktürüldü. Süpernatant yeni mikrotübe alındı. Üzerine 0.7 ml izopropanol eklendi ve 15 dakika buz içerisinde bırakıldı. DNA 4°C'de 5 dakika 14000 devir/dakika'da santrifüjleme ile çöktürüldü. Süpernatant atıldı. Tüp içerisindeki çökelti kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Çökelti 25 µl Tris-EDTA (TE) tamponu (Tablo 3) içerisinde çözündürüldü. RNA'nın uzaklaştırılması amacıyla 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37°C'deki su banyosunda 15 dakika bırakıldı. Solusyona eşit hacimde fenol-kloroform (kloroform:izoamilalkol 24:1) eklenerek 14000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjleme ile proteinler ortamdaki uzaklaştırıldı. Üst faz yeni bir mikrotübe alındı. Solusyona tekrar eşit

hacimde fenol-kloroform eklendi ve mikrotüp 14000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlendi. Üst faz yeni bir mikrotübe alındı. Final konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde 3 M sodyum asetat (pH 5.2) eklendi. İki hacim soğuk etanol (%99.5) eklendi ve -70°C'deki derin dondurucu içerisinde 30 dakika tutuldu. Tüpler 15000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı ve çökelti 1 ml %70'lik soğuk etil alkol ile yıkanarak 15000 devir/dakika'da santrifüjleme yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra pellet kurutuldu ve 25 µl TE tamponunda çözündürüldü.

Tablo 3. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar.

Tamponun İsmi	İçeriği	Miktarlar
Ezme Tamponu	Sukroz	%15
	Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	250 mM
Süspansiyon Tamponu	Tris-HCl, pH 8.0	20 mM
	EDTA	10 mM
Tris-EDTA Tamponu	Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

II.5.2. Plazmit İzolasyonu

Bakterilerden plazmit izolasyonu BIRNBOIM ve DOLY (1979) yöntemine göre yapıldı. *A. rhizogenes* 8196 suşu, LB besiyerinde 27°C'deki çalkalayıcı inkübatörde üretildi. Mikrotüpler içerisine bakteri solusyonununun 1.5 ml'si kondu. Hücrelerin toplanması amacıyla 12000 devir/dakika'da 2 dakika santrifüjleme yapıldı ve süpernatant

atıldı. Hücrelerin üzerine çeperlerinin parçalanması amacıyla 100 µl lizis solusyonu (Tablo 4) ilave edildi (Lizis solusyonu lizozimsiz hazırlandı ve kullanımdan hemen önce bu solusyona lizozim eklendi.) ve 5 dakika buz içinde bekletildi. Mikrotübe 200 µl alkalın-SDS solusyonu (Tablo 4) eklendi ve süspansiyon berraklaşınca kadar hafifce karıştırıldı. Proteinleri çöktürmek için tüplere 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 4.8) eklenerek 10 dakika buzda bekletildi. 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjleme yapıldı. Süpernatant yeni mikrotübe alındı. DNA'yı çöktürmek amacıyla 1 ml soğuk etanol (%99.5) süpernatant üzerine eklendi ve karıştırıldı. 15 dakika -70°C'deki derin dondurucuda bekletildikten sonra 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjleme yapıldı. Süpernatant atıldı ve pellet RNA'nın uzaklaştırılması amacıyla 1.2 µg RNaz içeren 100 µl TE tamponunda çözündürüldü. Protein ekstraksiyonu için 100 µl fenol-kloroform eklendi ve 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjleme yapıldı. Yeni mikrotübe alınan üst faza 10 µl 2M sodyum asetat (pH 5.6) eklendi. Üzerlerine 1 ml soğuk etanol (%99.5) konarak -70°C'deki derin dondurucuda 15 dakika tutuldu. Tüpler 12000 devir/dakika'da santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Çökelti 2 defa %70 soğuk etanol ile yıkandı. DNA, oda sıcaklığında 15 dakika tutularak kurutulduktan sonra 25 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. İzole edilen plazmit DNA'ları -20°C'de saklandı.

Tablo 4. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar.

Solusyonun İsmi	İçerdiği Maddeler	Miktarlar
Lizis Solusyonu	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	EDTA	10 mM
	Glukoz	0.5 mM
	Lizozim	1 mg/ml
Alkalin-SDS Solusyonu	NaOH	0.2 M
	SDS	%1

II.5.3. Genomik DNA'ların ve Plazmit DNA'sının Restriksiyon Endonukleazları ile Kesimi

İzole edilen genomik DNA ve plazmit DNA'sının miktar tayinlerinin yapılması için, Tris-EDTA tamponu kullanılarak 1/200'lük sulandırımın UV-spektrofotometresinde (MiltonRoy, 601) 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakıldı ve çift zincirli DNA moleküllerinin konsantrasyonu aşağıdaki formül (MANIATIS ve ark., 1989) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme katsayısı}$$

Genomik DNA'ların ve *A.rhizogenes* 8196 plazmit DNA'sının restriksiyon endonukleazları ile kesimi için kullanılan tampon ve enzimler aşağıda belirtilen oranlarda mikrotüplerde biraraya getirildiler:

Genomik DNA	10 µl (5 µg)	Plazmit DNA'sı	10 µl (5 µg)
Enzim tamponu	2 µl	Enzim tamponu	2 µl
EcoR I*	1 µl (10 U)	EcoR I*	1 µl (10 U)
Hind III**	1 µl (10 U)	Hind III**	1 µl (10 U)
Steril destile su	6 µl	Steril destile su	6 µl
Toplam hacim	20 µl	Toplam hacim	20 µl

Bu tüpler, 37°C'deki su banyosunda 3 saat boyunca tutularak restriksiyon endonukleazları ile kesim yapıldı. (*EcoR I, EC 3.1.23.13; **Hind III, EC 3.1.23.21)

II.5.4. Elektroforez

Restriksiyon endonukleazları ile kesilen genomik DNA'lar ve plazmit DNA'sı %0.8'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez ile analiz edildi. 0.8 g agaroz tartılıp 100 ml 1xTris-Borat tamponunda (Tablo 5) eritildi. 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml) ilaveli jel elektroforez tankına alındı. Kesilmiş olan bitki DNA örneklerinin tamamı (20 µl), plazmit DNA'larının ise 15 µl'si 3 µl yükleme tamponu 6x (Tablo 5) ile karıştırılarak jeldeki ceplere yüklendi. Markır DNA örneği olarak Pst I enzimi ile kesilmiş λ DNA'sı kullanıldı. Örnekler jelde 2 saat süresince sabit 65 Volt'ta yürütüldü.

Tablo 5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Tampon ismi	İçeriği	Miktarlar
Tris-Borat		
Tamponu (5x)	Tris bazı	90 mM
	Borik asit	90 mM
	EDTA, pH 8.2	2 mM
Elektroforez Yükleme		
Tamponu (6x)	Bromofenol mavisi	% 0.25
	Sukroz	% 40 (w/v)

II.5.5. Southern Blot Hibridizasyonu

Transformasyonun moleküler düzeyde saptanabilmesi için Southern hibridizasyon yapıldı.

II.5.5.1. Prob'un Hazırlanması

İzole edilen ve restriksiyon endonukleazları ile kesime uğratılan *A.rhizogenes* 8196 plazmit DNA'sı aşağıda oranları verilen Random Primed DNA Labeling Kit kullanılıp $\gamma^{32}\text{P}$ ile işaretlendi.

DNA parçaları	2 μl (25 ng plazmit DNA'sına karşılık)
dATP, dGTP, dTTP	3 μl
Reaksiyon karışımı	2 μl
50 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$] dCTP	2 μl

Steril destile su ile hacim 19 μl 'ye tamamlandı ve 1 μl Klenow enzimi ilavesi ile toplam hacim 20 μl olarak ayarlandı.

Prob olarak kullanılacak DNA parçalarının işaretlenmesi amacıyla, karışım 30 dakika 37°C'deki su banyosunda bekletildi ve bu süre sonunda reaksiyon 2 µl 0.2 M EDTA eklenerek durduruldu. Radyoaktif olarak işaretlenmiş proplar -20°C'ye kaldırıldı.

II.5.5.2 Elektroblot

Bitki genomik DNA'larını ve plazmit DNA'larını içeren agaroz jel bir küvet içersine konuldu. Jelin üzerini örtecek kadar denatürasyon solusyonu (Tablo 6) eklenerek 20 dakika bekletildi. Süre sonunda, küvet içerisindeki solusyon ortamdan uzaklaştırıldı. Agaroz jel, üzerine benzer şekilde 4xTris-Glasiyalasetikasit-EDTA (TAE) tamponu (Tablo 6) eklenerek 15 dakika bu solusyonda tutuldu. Daha sonra 4xTAE tamponu atıldı. Jel boyutlarında kesilmiş bir nitrosellüloz kağıt, jel ile birlikte 1xTAE tamponu içerisinde 15 dakika bekletildi.

Nitrosellüloz kağıt agaroz jelin üzerine gelecek şekilde, iç yüzeyinde Whatman kağıtları bulunan ve iki parçadan oluşan elektroblot kasedi içersine yerleştirildi. Kaset soğuk odada bulunan ve içi 1xTris-Borik asit-EDTA (TBE) (Tablo 6) ile dolu tank içersine konularak 60 Volt'ta 4 saat bekletildi. Süre sonunda nitrosellüloz kağıt UV ışık altında incelenerek agaroz jeldeki tüm DNA parçalarının kağıt üzerine geçip geçmediği gözlemlendikten sonra kağıt UV ışık altında kurutuldu.

II.5.5.3. Prehibridizasyon

Nitrosellüloz kağıt, ağzı kapaklı cam bir tüp içersine alınıp üzerini örtecek şekilde hibridizasyon solusyonu eklendi. Cam tüp hibridizasyon etüvü içerisinde 2 saat süresince 65°C'de yıkandı.

II.5.5.4. Hibridizasyon

Prehibridizasyon işlemi bittikten sonra, DNA parçalarını taşıyan nitrosellüloz kağıt aynı şekilde ağzı kapaklı bir cam tüp içersine alındı ve üzerini örtecek şekilde 20 µl radyoaktif prob içeren hibridizasyon solusyonu (Tablo 6) eklendi. 65°C'de 5 saat hibridizasyon fırınında yıkandıktan sonra nitrosellüloz kağıt 5 dakika süresince %5'lik sodyum klorür-sodyum hipofosfat-EDTA (SSPE) (Tablo 6) solusyonunda bekletildi.

II.5.5.5. Otoradyografi

Nitrosellüloz kağıt jelatin ile her tarafı örtülecek şekilde kaplandı. Karanlık odada, içerisinde otoradyografi filmi bulunan kasete yerleştirildi ve ışık almaması için kaset siyah bir zarf içersine konuldu. -70°C'de 3 gün bekletildikten sonra film banyo edildi ve bantların varlığı araştırıldı.

Tablo 6. Southern Blot Hibridizasyonunda Kullanılan Solusyonlar.

Solusyon ismi	İçeriği	Miktarlar	pH
Denatürasyon	NaOH	20 g	
	NaCl	87.65 g	
Denhart (x1)	Ficoll	20 g	
	Polivinil prolidon	20 g	
	Bovin serum albumin	20 g	
TAE (x50)	Tris base	247 g	
	Glasiyalasetikasit	57.1 g	
	EDTA (0.5 M)	100 ml	8.0
SSPE (x20)	NaCl	174 g	
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27.6 g	
	EDTA (0.5 M)	100 ml	7.4
TBE (x5)	Tris base	54 g	
	Borik asit	27.5 g	
	EDTA (0.5 M)	100 ml	8.3
Hibridizasyon solusyonu (30ml)	SSPE (x20)	7.5 ml	
	Denhart (x50)	3 ml	
	SDS (%20)	0.75 ml	

III.BULGULAR

III.1. *A. rhizogenes* ile Transforme Bitkilerde Saçak Kök Eldesi

A. rhizogenes ile inoküle edilen tütün ve patates bitkilerinde transformasyonun morfolojik belirtisi olarak saçak kök gelişimi gözlemlendi.

III.1.1. Tütün Yaprak Disklerinde ve Patates Tuber Disklerinde Saçak Kök Oluşumu

Kontrollü bitki büyütme kabininde 16 saat ışık / 8 saat karanlık şartlarda 25°C'deki 1 mg/l NAA içeren antibiyotikli MS besiyerindeki patates tuber diskleri üzerinde yaklaşık 15 gün sonra, tütün yaprak disklerinde ise aynı besiyerinde yaklaşık 10 gün sonra saçak kök oluşumları gözlenirken (Şekil 1) hormon içermeyen antibiyotikli MS besiyerinde benzer sonuçlar ancak 25-30 gün sonra elde edilebildi. En yüksek oranda kök oluşumu tuber disklerinde %25 ve yaprak disklerinde %55.6 ile 1 mg/l NAA içeren antibiyotikli MS besiyerlerinde gözlemlendi (Tablo 7).

Tablo 7. *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN yaprak ve *Solanum tuberosum* L. cv. Yayla kızı tuber disklerinde saçak kök oluşumu üzerine NAA'in etkisi.

Besiyerleri	Eksplant sayısı		Saçak kök taşıyan disk sayısı		Frekans (%)	
	Patates	Tütün	Patates	Tütün	Patates	Tütün
MS+500 mg/l Cx	48	45	4	10	8.3	22.2
MS+500 mg/l Cx +1 mg/l NAA	48	45	15*	25**	25	55.6

* Patates tuber disklerinde 1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde saçak kök oluşumu anlamlıdır ($P < 0.05$). ** Tütün yaprak disklerinde 1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde saçak kök oluşumu anlamlıdır ($P < 0.05$).



Şekil 1. MS+500 mg/l Cx+1 mg/l NAA besiyerindeki 15 günlük
a) Tütün yaprak disklerinde ve b) Patates tuber disklerinde gözlenen
saçak kök oluşumları.

III.1.2. Tütün ve Patates Internodlarında Saçak Kök Oluşumu

Tütün ve patates gövdelerinin apikal uçlarına yakın bölgelerden alınmış internodlarda, 16 saat ışık/8 saat karanlık periyodunda 25°C'deki kontrollü bitki büyütme kabininde 1 mg/l NAA içeren ve içermeyen antibiyotikli MS besiyerlerinde yaklaşık 10-15 gün içerisinde saçak kök oluşumları gözlemlendi (Şekil 2). Tütün ve patates internodlarında saçak kök oluşum sürelerinin büyük farklılıklar göstermediği belirlendi. Bunun yanı sıra, NAA içeren antibiyotikli MS besiyerinde saçak kök oluşum frekansları patates için %20, tütün için ise %42 olarak saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN ve *Solanum tuberosum* L. cv. Yayla kızı internodlarında saçak kök oluşumu üzerine NAA'in etkisi.

Besiyerleri	Eksplant sayısı		Saçak kök taşıyan disk sayısı		Frekans (%)	
	Patates	Tütün	Patates	Tütün	Patates	Tütün
MS+500 mg/l Cx	25	25	3	4	12	28
MS+500 mg/l Cx +1 mg/l NAA	25	25	15*	16**	20	42

* Patates internodlarında 1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde saçak kök oluşumları anlamlıdır ($P < 0.05$). ** Tütün internodlarında 1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde saçak kök oluşumları anlamlıdır ($P < 0.05$).



Şekil 2. MS+500 mg/l Cx+1mg/l NAA içeren besiyerinde 15 günlük (a) tütün ve (b) patates internodlarında saçak kök oluşumları.

III.2. İnokülasyon Sırasında Bakteri Yoğunluğunun Transformasyona Etkisi

Bakteri yoğunluğunun transformasyona etkisini belirlemek amacıyla tütün yaprak ve patates tuber diskleri 600 nm dalga boyunda farklı absorbans (0.1, 0.2 ve 0.4) değerlerindeki bakteri solusyonları ile inoküle edildiler. Transformasyonun $A_{600}=0.2$ olduğu durumda, tütün yaprak disklerinde %65, patates tuber disklerinde ise %32.5 ile en yüksek değerlere ulaşıldığı belirlendi. Bu absorbansın altındaki 0.1 ve üstündeki 0.4 değerlerinde ise transformasyon frekansının düştüğü gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Bakteri konsantrasyonunun transformasyona etkisi.

Absorbans değerleri (A_{600})	İnoküle edilen tuber sayısı		Saçak kök taşıyan disk sayısı		Frekans (%)	
	Patates	Tütün	Patates	Tütün	Patates	Tütün
0.1	40	40	4	10	10	25
0.2	40	40	15*	26**	32.5	65
0.4	40	40	2	5	2.5	7.5

* Patates tuber disklerinde $A_{600}=0.2$ bakteri yoğunluğunda meydana gelen saçak kök oluşumları anlamlıdır ($P < 0.05$). ** Tütün yaprak disklerinde $A_{600}=0.2$ bakteri yoğunluğunda meydana gelen saçak kök oluşumları anlamlıdır ($P < 0.05$).

III.3. Bakteri Üremesinin Durdurulması için Kullanılan Antibiyotik Miktarının Transformasyona Etkisi

Ko-kültüvasyondan sonra ortamda fazla miktarda üremiş olan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla Cefotaxime antibiyotiğinin çeşitli konsantrasyonları (250, 350, 500, 650 mg/l) denendi. 500 mg/l'nin altındaki antibiyotik değerlerinde (250, 350 mg/l) bakteri

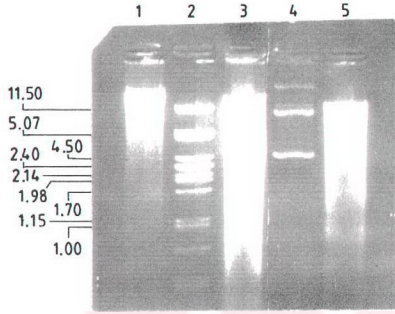
üremesi durdurulamadığı için transformasyon çalışmaları gerçekleştirilemedi. Konsantrasyonun 600 mg/l'ye yükseltildiği durumda ise antibiyotiğin eksplantlar üzerinde toksik etki gösterdiği belirlendi. Fazla miktarda üremiş bakterilerin ortamdaki kolayca uzaklaştırılabildiği 500 mg/l antibiyotik değerinde transformasyon gerçekleştirilebildi.

III.4. İnternod Boyutlarının Transformasyon Başarısına Etkisi

Tütün ve patatesten apikal bölgelerden alınan ve yaklaşık 1-2 mm çapındaki internodlarda transformasyon başarısının yüksek düzeyde olduğu saptandı. Bununla birlikte alt bölgelere inildikçe, internod çapının artması dolayısıyla bakteri ile bitki arasındaki etkileşim yüzeyinin artmasına karşılık apikal bölgelere nazaran transformasyon başarısının azaldığı gözlemlendi.

III.5. Saçak Köklerden İzole Edilen DNA'nın Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

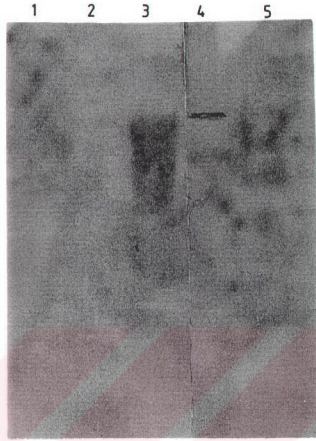
Tütün yaprak ve patates tuber disklerinde oluşan saçak köklerden izole edilen genomik DNA ve *A. rhizogenes* 8196 suşundan izole edilen R_i plazmiti, EcoR I ve Hind III endonukleazları ile kesildi. Elde edilen DNA parçalarının %0.8'lik agaroz jelle uygulanmasıyla elde edilen bantlar UV ışık altında incelendi (Şekil 3).



Şekil 3. Hind III ve EcoR I restriksiyon enzimleri ile kesilmiş bitki genomik DNA'ları ve plazmit DNA'ları. 1) Kontrol DNA, 2) λ DNA, 3) Tütün bitkisinde transforme saçak köklere ait DNA, 4) *A. rhizogenes* 8196 suşunun plazmit DNA'sı, 5) Patates bitkisinde transforme saçak köklere ait DNA.

III.6. Southern Blot Hibridizasyon ile Transformasyonun Kanıtlanması

Agaroz jel elektroforezinde belirlenen, *A. rhizogenes* 8196 yabancı suşuna ait R₁ plazminin yaklaşık 12 baz çiftlik T-DNA bölgesinin bitki genomundaki varlığı Southern blot hibridizasyon sonuçlarının otoradyografik olarak gözlenmesi ile kanıtlandı (Şekil 4).



Şekil 4. Southern hibridizasyonundan sonra otoradyografi filminde 1) Kontrol DNA, 2) λ DNA, 3) Tütün bitkisinde transforme saçak köklere ait DNA, 4) *A. rhizogenes* 8196 suşunun plazmit DNA'sı, 5) Patates bitkisinde transforme saçak köklere ait DNA.

IV. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN ve *Solanum tuberosum* L. cv. Yayla kızı bitkilerine *A. rhizogenes* 8196 yabancı bakteri suşunun R_i plazmiti doku kültürü koşullarında aktararak transforme saçak kökler elde edildi. Saçak kök oluşumunun antibiyotikli MS besiyerine eklenen 1 mg/l NAA ile %100'ün üzerinde artış gösterdiği izlendi. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda çeşitli araştırmacı grupları da farklı bitki türlerinin *A. rhizogenes* ile transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir ve saçak kök oluşturmak amacıyla 1 mg/l NAA içeren MS besiyerlerini tercih etmişlerdir (OLIVER , 1986; BERCETCHE ve ark., 1987; KRSNIK-RASOL ve JELASKA, 1991). Bazı araştırmacı grupları ise benzer çalışmalarda hormon içermeyen MS besiyerlerini kullanmışlardır (OOMS ve ark., 1985; DAVEY ve ark., 1987; WEBB ve ark., 1990; OTANI ve ark., 1993). Bu çalışmada hormonsuz besiyerinde oluşan transforme saçak kök oranı düşük olarak gözlemlendi. Değişik bulgular, kullanılan bitki türü ve *A. rhizogenes* suşu farklılığı ile açıklanabilir.

Agrobacterium ile transformasyonu yapılacak olan bitki parçalarının ko-kültivasyondan sonra, fazla miktarda üremiş olan bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla, gram negatif bakteriler üzerine etkili Cefotaxime (Cx), Carbenicillin ve Amfisilin antibiyotikleri kullanılmaktadır (WEBB ve ark., 1990). Bu çalışmada patates ve tütün bitki parçacıkları *A. rhizogenes* 8196 ile 2 gün karanlık şartlarda ko-kültüre edildi. Bu süre sonunda ortamda fazla üremiş bakterilerin uzaklaştırılması için Cx antibiyotiğinin değişik konsantrasyonlarını (250, 300, 500 ve 600 mg/l) içeren solusyonlar kullanıldı. En iyi sonuç, 500 mg/l Cx içeren solusyonlar ile MS besiyerinde alındı. DAVEY ve ark. (1987) da tütün ve patates bitkileri

ile yaptıkları bir çalışma sırasında aynı amaçla 500 mg/l Cx içeren MS besiyerini kullanmışlardır.

Çalışmanın inokülasyon aşamasında kullanılan *Agrobacterium* yoğunluğu, transformasyon başarısını direkt olarak etkilediğinden optimum bakteri yoğunluğu spektrofotometrik ölçümlerle tayin edildi. Bu amaçla, 600 nm dalga boyundaki üç farklı absorbans değerini (0.1, 0.2 ve 0.4) veren bakteri solusyonları kullanıldı. Absorbans değerinin 0.1 olduğu durumda, ko-kültivasyon ortamdaki bakteri yoğunluğunun düşük olması nedeniyle istenilen transformasyon frekansı elde edilemedi. Absorbans değerinin 0.4 olduğu değerde ise ko-kültivasyon sırasında çok fazla bakteri ürediğinden bunlar ortamdaki uzaklaştırılmadı. Absorbans değerinin 0.2 olduğu durumda ise transformasyon frekansının yüksek olduğu saptandı ve transformasyon çalışmalarında bu değeri veren bakteri solusyonları kullanıldı.

Tütün ve patatesteki *Agrobacterium rhizogenes* 8196 yabancı suşu ile yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda, bu bakteriye ait Ri plazmitinin saçak kök oluşumundan sorumlu olan T-DNA bölgesinin bitki genomuna girip girmediği moleküler düzeydeki analizlerle test edildi. Bu amaçla, tütün ve patatesteki oluşan saçak köklerden izole edilen genomik DNA'ların EcoR I ve Hind III restriksiyon endonukleazları ile kesimleri yapıldı. Elektroforez analizi sonucunda, T-DNA bölgesini taşıdığı düşünülen DNA bantları radyoaktif işaretli problemlerin kullanıldığı Southern blot hibridizasyonu ile kesin olarak ispatlandı. DURAND-TARDIF ve ark. (1985) *N. tabacum*'da, OOMS ve ark. (1985) *S. tuberosum*'da, OWENS ve CIRESS (1985) *Glycine max*'ta, OTANI ve ark. (1993) *Ipomoea batatas*'da Ri plazmitine ait T-DNA bölgesinin bitki genomuna girişini kesin kanıtlamak için Southern blot hibridizasyonu kullanmışlardır.

A. rhizogenes ile bitki dokularının transformasyonu, ticari önemi olan metabolitleri üreten geniş organizma gruplarına uygulanabilmektedir. Günümüzde çok geniş bir sekonder ürün grubu

bitki köklerinde sentezlenebilmektedir. Bu tip köklerde çeşitli alkaloid tiplerine ilaveten, naftakinonlar, steroidler, tiofenler gibi diğer sekonder bileşikler de sentez edilebilmektedir. Transforme kök kültürleri genetik ve biyokimyasal açıdan son derece dengeli yapılardır. Sekonder ürünlerin üretimi kök kültürlerinin sürekli olarak devam ettirilmesine bağlıdır. Araştırma sonunda elde edilen saçak köklerde herhangi bir sekonder ürün analizi yapılmadı.

Bu çalışmada, *A. rhizogenes* 8196 yabancı suşu ile yapılan optimizasyon daha sonraki aşamada bitkilerde sentetik tek zincirli antikorların bol miktarda üretimi için yapılacak çalışmalara bir basamak teşkil edecektir.



V. ÖZET

Tütün ve Patateste *Agrobacterium rhizogenes* ile Transformasyon

Tütün (*Nicotiana tabacum*) ve patates (*Solanum tuberosum*) en önemli ürün bitkilerindedir. Bu bitkilerin hayvansal proteinlerin üretimi için biyo-fabrikalar olarak kullanılması ekonomimize büyük girdiler sağlayacaktır.

Bu çalışmada bol miktarda sentetik hayvansal protein üretimi için uygun gen aktarımı yöntemlerinin geliştirilmesi amacı ile *N. tabacum* Samsun NN ve *S. tuberosum* Yayla kızı varyeteleri *Agrobacterium rhizogenes* 8196 yabancı suşu ile transformasyonunun optimizasyonu yapıldı. İnokülasyon için bu bakterinin $A_{600}=0.2$ yoğunluktaki kültürü ve ko-kültivasyon için MS + 500 mg/l Cefotaxime + 1 mg/l Naftalen Asetik Asit besiyeri kullanıldı. Kültürler 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyodundaki kontrollu bitki büyütme kabiniinde tutularak transforme saçak kökler elde edildi. Bu köklerden DNA izolasyonu yapıldı ve bu DNA'lar EcoR I ve Hind III restriksiyon endonukleazları ile kesildi. Transformasyon, [$\gamma^{32}P$] CTP ile işaretli *Agrobacterium rhizogenes* 8196 R_i plazmit DNA'sının prob olarak kullanıldığı Southern blot hibridizasyon yöntemi ile kanıtlandı.

Optimize edilen yöntemler sonraki aşamalarda gen aktarımı çalışmalarına bir basamak teşkil etmektedir.

SUMMARY

Transformation of Tobacco and Potato by *Agrobacterium rhizogenes*

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) and potato (*Solanum tuberosum*) are the most important crop species. Using of these plants for production of animal proteins as a bio-factory is going to provide great amount of income for our economy.

In this study, for production large amount of synthetic animal proteins, in aim of developing appropriate gene transfer methods, transformation of *N. tabacum* Samsun NN and *S. tuberosum* Yayla kızı varieties with *Agrobacterium rhizogenes* 8196 wild strain were optimized. Culture of bacteria concentrated $A_{600}=0.2$ for inoculation and MS + 500 mg/l Cefotaxime + 1mg/l Naphthalen Acetic Acid media for co-cultivation were used. Transformed hairy root were obtained under the light for 16 hours and 8 hours dark period in the regulated plant growth cabinet. DNA was extracted from these roots and digested using EcoR I and Hind III restriction endonucleases. Transformation was confirmed by Southern blot hibridization method using [$\gamma^{32}\text{P}$] CTP labelled R_i plasmid DNA of *A. rhizogenes* 8196.

Methods which have been optimized in this study, are going to be first step for the further gene transfer studies.

VI. KAYNAKLAR

- AN, G., WATSON, B.D., STACHEL, S., GORDON, M.P., NESTER, E.W. (1985): New Cloning Veichles for Transformation of Higher Plants. *EMBO Journal*, 4, 227-284.
- BAYROVIÇ, K., ARI, Ş., ARICAN, E., KAZAN, K., GÖZÜKIRMIZI, N. (1995): Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Tuber Discs and Stem Explants. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*, 1, 29-32.
- BERCETCHE, J., CHRQUI, D., ADAM, S., DAVID, C. (1987): Morphogenetic and Cellular Reorientations Induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on Carrot, Pea and Tobacco. *Plant Science*, 52, 195-210.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979): A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- CAPONE, I., SPANO, L., CARDARELLI, M., BELLINCAMPI, D., PETIT, A., CONSTANTINO, P. (1989): Induction and Growth Properties of Carrot Root with Different Complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Molecular Biology*, 13, 43-52.
- COSTANTINO, P.L., HOOYKAAS, P.J.J., DEN DULK-RAS, H., SCHILPEROORT, R.A. (1980): Tumor Formation and Rhizogenicity of *A.rhizogenes* Carrying Ti Plasmids. *Gene*, 11, 79-87.
- DAVEY, M.R., MULLIGAN, B.J., GARTLAND, K.M.A., PEEL, E., SARGENT, A.W., MORGAN, A.J. (1987): Transformation of *Solanum* and *Nicotiana* Species Using an Ri plasmid Vector. *Journal of Experimental Botany*, 38, 1507-1516.

- DESTAFANO-BELTRAN, L., NAGPALA, P.G., ÇETİNER, M.S., DODDS, J.H., JAYNES, J.M. (1990): Enhancing Bacterial and Fungal Disease Resistance in Plants. Application to potato, the molecular and cellular biology of potato, 0-85198-654-4, Redwood Press Ltd. Melksham, United Kingdom, Ed: VAYDA, M.E., PARK, W.D., 205-221.
- DURAND-TARDIF, M., BROGLIE, R., SLIGHTOM, J., TEPFER, D. (1985): Structure and Expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum* Organ and Phenotypic Specificity. J. Mol. Biol. 186, 557-564.
- GELVIN, S.B. (1990): Crown Gall Disease and Hairy Root Disease. A Sledge Hammer and a Tack Hammer. Plant Physiology. 92, 281-285.
- GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., BAYROVIÇ, K., GÜREL, F. (1995): Determination of Transgenic Plant Using Polymerase Chain Reaction. Türk Biyoloji Dergisi (Baskıda).
- GRANT, J.E., DOMMISSE, E.M., CHRISTEY, M.C., CONNER, A.J. (1991): Gene Transfer to Plants Using *Agrobacterium*. Advanced methods in plant breeding and biotechnology. 0 85198 706 0, Redwood Press Ltd., Melksham, UK., 50-73.
- HIGGINS, E.S., HULME, J.S., SHIELD, R. (1992): Early Events in Transformation of Potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 82, 109-118.
- HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMANN, N.L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.G., and FRALEY, T. (1985): A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. Science. 227, 1229-1231.
- KERR, A., BRISBANE, P.G. (1983): *Agrobacterium*. Plant bacterial disease: a diagnostic guide. Ed: FALEY, P.C., PERSLEY, G.J. Academic Press. Sydney. 27-43.

- KLEE, H., HORSCH, R., ROGERS, S. (1987): *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation and Its Further Applications to Plant Biology. Annual Review of Plant Physiology, 38, 467-486.
- KRSNIK-RASOL, M., JELASKA, S. (1991): Peroxidases in Relation to Differentiation and Tumor Transformation in Plants. Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Ed: LOBARZEWSKI, J., GREPPIN, H., PENEL, C., GASPAR, T. University of Genova. 10-18.
- LAWSON, C., WAJDIEK, K., HALEY, L., ROZMAN, R., NEWELL, C., SUNDERS, P., TÜMER, N.E. (1990): Engineering Resistance to Mixed Virus Infection in a Commercial Potato Cultivar: Resistance to Potato Virus X and Potato Virus Y in Transgenic Russet Burbain. Biotechnology 8, 127-134.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition, 0 87969 309 6, Cold Spring Harbor, New York.
- MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P.J.J. (1987): Virulence of *Agrobacterium*. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 4, 167-220.
- MOLONEY, M.M. (1995): Molecular Farming in Plants: Achievements and Prospects. Biotechnology/Biotechnology Equipment 1, 3-9.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. Phsiol. Plantarum. 15, 473-497.
- MURRAY, R.D. (1993): Advanced methods in plant breeding and biotechnology. 0 85198 706 0. Redwood Press Ltd., Melksham, UK.
- OLIVER, J.L. (1986): Isozyme Gene Expression in Potato Tumors Incited by *Agrobacterium*. Theor. Appl. Genet. 72, 373-376.
- OOMS, G., KARP, A., BURRELL, M.M., TWELL, D., ROBERTS, J. (1985): Genetic Modification of Potato Development Using R₁ T-DNA. Theor. Appl. Genet. 70, 440-446.

- OTANI, M., MII, M., HANDA, T., KAMADA, H., SHIMADA, T. (1993): Transformation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science*, 94, 151-159.
- OWEN, M.R.L., GANDECHA, A., COCKBURN, B., WHITELAM, G.C. (1992 a): The Expression of Antibodies in Plants. *Chemistry and Industry*, 1, 406-408.
- OWEN, M.R.L., GANDECHA, A., COCKBURN, B., WHITELAM, G.C. (1992 b): Synthesis of a Functional Anti-Phytochrome Single-Chain Fv Protein in Transgenic Tobacco. *Bio/Technology*, 10, 790-794.
- OWENS, L.D., CRESS, D.E. (1985): Genotypic Variability of Soybean Response to *Agrobacterium* Strains Harboring the Ti or Ri Plasmids. *Plant Physiol.* 77, 87-94.
- PEFEROEN, M., JANSENS, S., REYNAERTS, A., LEEMANS, J. (1990): Potato Plants with Engineered Resistance Against Insect Attack. *The molecular and cellular biology of potato*, 0-85198-654-4, Redwood Press Ltd., Melksham, United Kingdom, Ed: VAYDA, M.E., PARK, W.D., 193-205.
- PHILLIPSON, J.D. (1990): Plants as Sources of Valuable Products. Secondary products from plant tissue culture. *Proceedings of the phytochemical society of Europe 30*. Ed: CHARLWOOD, B.V., RHODES, M.J.C., Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford, 1-21.
- SIMPSON, R.B., SPIELMANN, A., MARGOSSIAN, L., McNIGHT, T.D. (1986): A Disarmed Binary Vector from *Agrobacterium tumefaciens* Functions in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology*, 6, 403-415.
- SIJMONS, P.C., DEKKER, B.M.M., SCHRAMMEIJER, B., VERWOERD, T.C., van der ELZEN, P.J.M., HOEKEMA, A. (1990): Production of Correctly Processed Human Serum Albumine in Transgenic Plants. *Bio/Technology* 83, 217-221.

- SPENA, A., SCHMÜLLING, T., KONCZ, C., SCHELL, J. (1987): Independent and Synergistic activity of rol A,B and C Logi in Stimulating Abnormal Growth in Plants. *EMBO Journal* 6, 3891-3899.
- TAVLodorakí, P., BENVENUTO, E., TRINCA, S., DEMARTINIS, D., KATTANEO, A., GALEFFI, F. (1993): Transgenic Plant Expressing a Functional Single-Chain Fv Antibody are Specifically Protected from Virus Attack. *Nature*, 366, 469-472.
- TEMPÉ, J., CASSE-DELBORT, F. (1989): Plant Gene vectors and Genetic Transformation. *Agrobacterium Ri Plasmids. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, London, Vol. 6, 25-49.*
- TEPFER, D., (1983). The potential uses of *Agrobacterium rhizogenes* in the genetic engineering of higher plants: Nature got there first. In *Genetic engineering in Eukaryotes. (NATO ASI Series. Series A, Life Science) Volume 61. Eds. P. F. Lurquin ve A. Kleinhofs. Plenum Press, New York.*
- TIMMERMAN, G.M. (1991): Genetic Engineering for Resistance to Viruses. *Advanced methods in plant breeding ve biotechnology. Ed: MURRAY, D.R. CAB. International. 319-340.*
- WALBOT, V. (1988):Preparation of DNA from Single Rice Seedlings. *Rice Genet. Newslett., 5,149-151.*
- WEBB, K.J., JONES, S., ROBBINS, M.P., MINCHIN F. (1990): Chracterization of Transgenic Root Cultures of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus corniculatus* and Transgenic Plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Science*, 70, 243-254.
- WEBB, K.J., MORRIS, P. (1992): Methodologies of Plant Transformation. *Plant genetic manipulation for crop protection. Ed: GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, U.H., BOULTER, D. Biotechnology in Agriculture No.7 CAB International. (Biotechnology in Agriculture Series) 0-85198-707-9, 7-44.*

- WHITE, F.F, TAYLOR.B.H., HUFFMAN, G.A. GORDON, M.P.,
NESTER, E.W. (1985): Molecular and Genetic Analysis of the
Transferred DNA Regions of the Root Inducing Plasmid of
A. rhizogenes. *Journal of Bacteriology* 164, 33-34.
- WHITLOW, M., FILUPA, D. (1991): Single-Chain Fv Protein and Their
Fusion Proteins. *Methods Enzymol.* 2, 97.



VII. ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Malatya'da doğdum. 1984-1985 öğretim yılında Taksim ATATÜRK Lisesinden mezun oldum. 1988 yılında Yıldız Üniversitesi Kocaeli Meslek Yüksek Okulu Elektronik Bölümünü bitirdim. 1989 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1993 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Moleküler Biyoloji-Genetik Yüksek Lisans Programına girmeye hak kazandım. Halen İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda 21.02.1995 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Bilimsel Çalışmalar ve Yayınlar

- GÖZÜKIRMIZI, N., KAZAN, K., ARI, Ş., GÜREL, F., BAYROVIÇ, K., ÇOBANOĞLU, G., BÜYÜKKESKİN, R., ARICAN E. (1993): Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Moleküler Uygulamalar. Kurs Kitabı, 8-12 Kasım, 1993 Gebze-Kocaeli.
- ÇOBANOĞLU, G., GÜREL, F., ARI, Ş., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI N. (1994): Arpa Germplazmının Moleküler Düzeyde Tanımlanması. Tarla Bitkileri Kongresi. 25-29 Nisan, 1994, Bornova- İzmir. Bitki Islahı Bildirileri, 975-483-266-8, 93-98.
- BAYROVIÇ, K., ARI, Ş., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI, N., KAZAN K. (1994): High Percentage of Transformation and Plant Regeneration in Potato, VIII. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, (APTC, Firenze-Italy, June 12-17, 1994, 138.

- ARI, Ş., BAYROVIÇ, K., KAZAN, K., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI N. (1994): Tütün ve Patateste Gen Aktarımı. XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz, 1994. Edirne.
- ARICAN, E., BAYROVIÇ, K., OĞRAŞ, T., ARI, Ş., GÖZÜKIRMIZI. N. (1994): Transgenik Patateste Mikrotuber Eldesi. II. Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu, 22-23 Eylül, 1994. Ankara. Bildiri ve Poster özetleri s. 81.
- BAYROVIÇ, K., ARI, Ş., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI N.(1995): Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Tuber Discs and Stem Explants. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 1:29-32.
- BAYROVIÇ, K., ARICAN, E., GÖZÜKIRMIZI N. (1995): *Agrobacterium tumefaciens* ile Patates ve Tütünde Crown-Gall Oluşumu. Biyoteknoloji ve Bitki Islahı Workshop, 17-19 Nisan, 1995, Gebze-Kocaeli.