

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

BOR TAŞIYICISI *HvBor1a* GENİNİN
TÜTÜNE (*Nicotiana tabacum*) AKTARILMASI
VE
TRANSGENİK BİTKİLERİN ANALİZLERİ

DOĞA SELİN GÜMÜŞEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

BOR TAŞIYICISI *HvBor1a* GENİNİN
TÜTÜNE (*Nicotiana tabacum*) AKTARILMASI
VE
TRANSGENİK BİTKİLERİN ANALİZLERİ

DOĞA SELİN GÜMÜŞEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ
EŞ DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ ÖKTEM

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05.03.2012 tarih ve 2012/24... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03.03.2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Doğ. Selin GÜNEŞ'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Yelken Özden Çiftçi

ÜYE

: Doç. Dr. Ayşe Filiz Gürel

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Cüneyt Hacımberci

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: BOR TAŞIYICISI *HvBor1a* GENİNİN
TÜTÜNE (*Nicotiana tabacum*)
AKTARILMASI VE TRANSGENİK
BİTKİLERİN ANALİZLERİ

YAZARIN ADI: DOĞA SELİN GÜMÜŞEL

Bitkilerin esas mikro elementlerinden olan borun topraktaki yüksek derişimlerinin bitkilerde toksik etkiye yol açması ve tarımsal verimi ciddi şekilde düşürmesi, toksik seviyede boru tolere edebilecek genotiplerin elde edilmesinin hedeflenmesine sebep olmuştur. Bu tez çalışmasında, bor taşıyıcısı olduğu bilinen arpa kökenli *HvBor1a* geni ilk defa model bitki tütüne aktararak, bor toksisitesine toleranslı bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. *HvBor1a* geninin “Samsun” ve “Petit havana” çeşitlerinde heterolog ekspresyonunu sağlamak üzere *HvBor1a* ve seçici ajan higromisine direnç geni olan *hpt* genini taşıyan bitki transformasyon vektörü, *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 soyu aracılığıyla yaprak eksplantlarına transforme edilmiştir.

Transgenik hatların seçiliminde, transformasyon öncesinde yabani tip tütün eksplantları için belirlenen letal higromisin derişimi kullanılmıştır. Seçilen 317 transgenik adayının (T0) 57 tanesi toprağa aktarılmıştır. Transgenik adaylardan 44 tanesine ait yaprak örneklerinden izole edilen genomik DNA’ların polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) pozitif sonuç veren 25 transgenik adayı belirlenmiştir. Bu adaylar arasından seçilen 14 örnekten izole edilen total RNA’lar kullanılarak gerçekleştirilen RT (Ters Transkriptaz)-PZR sonucunda, genin eksprese olduğu 6 transgenik adayı belirlenmiştir. Tüm adaylarda higromisin direnci görülmesiyle birlikte, adaylara ait eksplantlarda borik asit toksisitesine karşı belirgin bir tolerans gözlenmemiştir. Beş transgenik adayının tohumları (T1) higromisinsiz ve higromisinli besiyerinde çimlenip gelişme göstermiş; dolayısıyla transformasyonun gamet oluşumunu engellemediği belirlenmiştir. Borik asit toksisitesi uygulanan T1’ler ise genel olarak düşük çimlenme oranı göstermiştir. Bir transgenik adaya ait tohumların Mendel yasalarına uygun kalıtım özelliği gösterdiği belirlenmiştir.

Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda *HvBor1a* geninin boru hücre içine taşımada görevli olabileceği önerilmiştir. Genin olası bir tolerans mekanizmasındaki işlevinin belirlenmesinin ileride, bor stresinden etkilenen tahıl bitkilerinde bor toleransı geliştirmeye olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

THESIS TITLE: TRANSFORMATION OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) WITH *HvBor1a* AS A BORON TRANSPORTER GENE AND ANALYSIS OF TRANSGENIC PLANTS

AUTHOR: DOĞA SELİN GÜMÜŞEL

The development of boron tolerant genotypes is targeted as the high concentration of boron, which is an essential micronutrient for vascular plants, in soil causes toxicity for plants and limits crop production. The aim of this thesis was to develop boron-tolerant plants by transferring *HvBor1a*, known as a boron transporter originated from barley, first time to model tobacco plant. Therefore, plant transformation vector containing *HvBor1a* and resistant gene (*hpt*) for hygromycin as selective agent was transformed to leaf explants via *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 in order to provide the heterologous expression of *HvBor1a* in “Samsun” and “Petit havana” cultivars.

Already determined lethal hygromycin concentration in wild type explants was used for selection of transgenic lines. 57 of the selected 317 putative transgenic lines (T0) were transferred to the soil. 25 putative transgenic plants that gave positive result in PCR (Polymerase Chain Reaction) were identified from 44 tobacco samples. By using total RNAs of randomly selected 14 out of these samples, RT-PCR was performed and 6 putative transgenic lines that express *HvBor1a* were selected. Although all transgenic candidates had hygromycin resistance, boron tolerance was not significantly observed against boron toxicity. The germination and development of seeds (T1) of 5 transgenic candidates under control and antibiotic conditions showed that transformation did not cause an inhibition in the gamete formation. However, T1 had generally low germination rate under boron toxicity. Moreover, germination analysis showed that one of transgenics showed Mendelian inheritance.

As a result, *HvBor1a* is suggested to be responsible for boron influx transport through the cells. The determination of possible function of *HvBor1a* in boron tolerance mechanism would highly allow the development of boron tolerant crops in future.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİTÇİ'ye ve tez çalışmam süresince Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda tüm imkanları bana sunan eş danışmanım Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM'e teşekkür ederim. Ayrıca deney çalışmalarına başladığım andan itibaren bilgi birikimi ve yardımını esirgmeden hep yanımda olan Dr. Tufan ÖZ'e özel olarak teşekkür ederim.

ODTÜ Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarındaki çalışmalarım boyunca birlikte güzel vakit geçirdiğim Selin KÖSE, Derya GÖKÇAY, Ayten EROĞLU, Oya AKÇA'ya ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarım Hülya AKDEMİR, Veysel SÜZERER, İbrahim KOÇ, Emrah KIRDÖK ve Dr. Ergun KAYA'ya dostluklarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca yine dostluğu için Dr. Mine GÜL ŞEKER'e ve desteği için Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya teşekkür ederim.

Tezim sırasında her türlü koşulda daima yanımda olan ve gerek bilimsel gerekse manevi desteğini her an yanı başımda hissettiğim sevgili Ceyhun KAYIHAN'a varlığı, dostluğu, sabrı ve tüm içten özverileri için gönülden teşekkür ederim.

En zor günleri beraber göğüslediğimiz canım babama güveni, desteği ve gönülden adadığı varlığı için candan teşekkür ederim.

Benzersiz özveri ve sevgisinin sıcaklığında, eşsiz emeği, doğruluğu ve bilgeliğinin aydınlığında büyüdüğüm; hayatımdaki değerinin büyüklüğünü burada kelimelerle anlatamadığım en yakın dostum, öğretmenim, rehberim, canımın içi annem Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL'e ömrüm boyunca bana eşlik edecek sonsuz varlığı için teşekkür ediyorum.

Biricik annemin aziz hatırasına...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Transgenik Bitkiler ve Tarımdaki Uygulamaları	1
1.1.1 Bitkilere Gen Aktarım Teknikleri	1
1.1.2 Genetiği Değiştirilmiş Ekinlerde Tarımsal Uygulamalar	3
1.2 Bor ve Bitkilerdeki İşlevsel Rolü	5
1.2.1 Bor Taşıma Sistemi	8
1.2.2 Bor Toksisitesi	9
1.2.3 Bitkilerde Bor Tolerans Mekanizması ve Bor Toleransı	12
Geliştirmeye Yönelik Yaklaşımlar	12
1.3 Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı	14
2 MATERYAL VE YÖNTEM	16
2.1 MATERYAL	16
2.1.1 Bakteri Soyu ve Plazmidler	16
2.1.2 Bakteri Kültür Ortamı ve Kültür Koşulları	17
2.1.3 Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı	18
2.1.4 Kullanılan Kimyasal ve Kitler	20
2.1.5 Kullanılan Cihazlar	21
2.2 YÖNTEM	21
2.2.1 <i>HvBor1a</i> Geninin Bitki Transformasyon Vektörüne Klonlanması	21
2.2.1.1 <i>HvBor1a</i> Genini Taşıyan Plazmidin <i>E. coli</i> ’ ye Aktarılması	21
2.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
2.2.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi	24
2.2.1.4 Plazmid İzolasyonu	24

	<u>Sayfa</u>
2.2.1.5 Gen Dizisinin Doğrulanması	25
2.2.1.6 Bitki Transformasyon Vektörünün Hazırlanması	25
2.2.1.7 Plazmidlerin <i>Agrobacterium</i> ’ a Aktarılması	26
2.2.2 Bitki Materyalinin Hazırlanması	27
2.2.2.1 Tütün Bitkilerinin Mikroçoğaltımı	27
2.2.2.2 Lethal Higromisin Derişiminin Belirlenmesi	27
2.2.2.3 Letal Bor Derişiminin Belirlenmesi	28
2.2.3 Tütün Bitkilerinde Yaprak Diski Transformasyonu	28
2.2.4 Aday Transgenik Tütün Bitkilerin Seçilimi	29
2.2.5 Aday Transgenik Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi	30
2.2.5.1 Kullanılan Malzemelerin Dekontaminasyonu	30
2.2.5.2 “Samsun” ve “Petit havana” Yapraklarından DNA Ekstraksiyonu	30
2.2.5.3 DNA Miktar Tayini	31
2.2.5.4 “Samsun” ve “Petit havana” Yapraklarından Total RNA Ekstraksiyonu	31
2.2.5.5 Total RNA’lara DNaz ve NaOAc Uygulaması	32
2.2.5.6 Total RNA Miktarının Tayini	32
2.2.5.7 Total RNA’dan Tek Zincir cDNA Sentezi	33
2.2.5.8 Aday Transgenik Bitkilerde PZR Analizleri	33
2.2.6 Transgenik Tütünlerin Toprağa Aktarılması	34
2.2.7 Seçici Ajan ve Bor Uygulamaları	35
2.2.7.1 Transgenik Adayı Tütün Yapraklarının Yüzey Sterilizasyonu	35
2.2.7.2 Tütün Yapraklarından Rejenerasyon Analizi	35
2.2.8 T1 Transgenik Bitkilerin Eldesi	35
2.2.9 T1 Transgenik Bitki Analizleri	36
2.2.9.1 Borik Asit ve Seçici Ajanda Çimlenme Testleri	36
2.2.10 İstatistiksel Analizler	36
3 BULGULAR	37
3.1 <i>HvBor1a</i> Geninin Doğrulanması ve Bitki Transformasyon Vektörünün Hazırlanması	37
3.2 Letal Higromisin Derişiminin Belirlenmesi	40

	<u>Sayfa</u>
3.3 Letal Bor Derişiminin Belirlenmesi	44
3.4 Transgenik Tütün Hatlarının Eldesi	44
3.4.1 Tütün Eksplantlarından Kallus Oluşumu	48
3.4.2 Kallus Sonrası Gövde ve Kök Gelişimi	49
3.4.3 Transgenik Tütün Bitkilerinin Toprağa Aktarılması	50
3.5 Aday (T0) Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri	51
3.6 Aday (T0) Transgenik Bitkilerde Higromisin ve Bor Toksisite Uygulaması	55
3.7 T1 Transgenik Bitki Analizleri	60
3.7.1 T1 Tohumlarında Canlılık	62
3.7.2 T1 Tohumlarında Mendel Kalıtımının İncelenmesi	62
3.7.3 T1 Tohumlarına Toksik Seviyede Bor Uygulaması	64
4 TARTIŞMA	65
4.1 Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde PZR ve RT-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	67
4.2 Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde Letal Higromisin Uygulamaları	68
4.3 Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde Bor Toksisitesi Uygulamaları	68
4.4 Transgenik (T1) Tütünlerde Çimlenme Analizleri	69
5 SONUÇ	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	:	Deoksiribonükleik asit
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	:	Ters transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RG-II	:	Ramnogalakturonan II
B	:	Bor
RNA	:	Ribonükleik asit
LB	:	Luria Bertani
MS	:	Murashige ve Skoog besiyeri
Hpt	:	Higromisin fosfotransferaz
YA	:	Yaş ağırlık
H	:	Higromisin
H ₃ BO ₃	:	Borik asit
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA
YT	:	Yabani tip
DEPC	:	Dietilprokarbonat
CTAB	:	Setil trimetil-amonyum bromid
w/v	:	Ağırlık/Hacim
mg	:	Miligram
mg/L	:	Miligram/Litre
mM	:	Milimolar
dH ₂ O	:	Distile su

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 pENTR–dTOPO vektörünün haritası	16
2.2 pIPKb004 vektörünün haritası	17
3.1 pENTR-dTOPO plazmidinde bulunan <i>HvBor1a</i> geninin koloni PZR sonucu	37
3.2 <i>HvBor1a</i> gen dizisi	38
3.3 LR reaksiyonu sonrasında pIPKb004 plazmidine aktarılan <i>HvBor1a</i> geninin koloni PZR sonucu	39
3.4 pIPKb004- <i>HvBor1a</i> ’nın <i>Agrobacterium</i> ’a transferi sonrasında yapılan koloni PZR sonucu	40
3.5 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında değişik konsantrasyonlarda higromisin (H) uygulaması altında zamana bağlı yaş ağırlık (YA) değişimi	41
3.6 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında değişik konsantrasyonlarda higromisin (H) uygulaması altında yaş ağırlıktaki (YA) zamana bağlı artış yüzdesi	42
3.7 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında 0-50 mg/L higromisin (H) uygulamasının 3 haftalık etkileri	43
3.8 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında 0-50 mg/L higromisin (H) uygulamasının 6 haftalık etkileri	43
3.9 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında değişik konsantrasyonlarda borik asit (B) uygulaması altında zamana bağlı yaş ağırlık (YA) değişimi	44
3.10 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında değişik konsantrasyonlarda borik asit (B) uygulaması altında yaş ağırlıktaki (YA) zamana bağlı artış yüzdesi	45
3.11 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarına 0-20 mM derişimlerde borik asit uygulanmasının 3 haftalık etkileri	46
3.12 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarına 0-20 mM derişimlerde borik asit uygulanmasının 6 haftalık etkileri	47
3.13 Transforme edilmiş ve dört hafta süreyle higromisinli seçici besiyerinde (MSB) bulunan yaprak eksplantlarında kallus ve mikrogövde oluşumu	48

Sekil**Sayfa**

3.14 MSB seçici besiyerinde büyüyen transgenik adayı mikrogövdelerin higromisin içeren MSC seçici besiyerine aktarılması ve alt kültürlenmesi	50
3.15 Toprağa aktarılan transgenik adayı tütünler	51
3.16 Transgenik adayı tütün yapraklarından izole edilen genomik DNA'ları kullanılarak <i>hpt</i> ve <i>HvBor1a</i> genleri için yapılan PZR sonucu	53
3.17 Transgenik adayı tütün yapraklarından total RNA izolasyonu	54
3.18 Transgenik adayı tütün yapraklarından izole edilen total RNA'lar kullanılarak yapılan Ters Transkriptaz-PZR sonucu	54
3.19 T0-T2P-91 ve T0-T2P-110 yaprak eksplantlarına letal seviyede (30-50 mg/L) higromisin uygulamasının 3 haftalık etkileri	56
3.20 T0-T2P-91 ve T0-T2P-110 yaprak eksplantlarına toksik seviyede (10-20 mM) borik asit uygulamasının 3 haftalık etkileri	57
3.21 T0 transgenik adaylardan T0-T2P91 ve T0-T2P110'a ait yaprak eksplantlarına higromisin ve bor uygulamaları	58
3.22 T0 transgenik adaylardan T0-T2P109 ve T0-T2P156'ya ait yaprak eksplantlarına higromisin ve bor uygulamaları	59
3.23 T1 tohumlarının letal derişimde higromisin ve toksik seviyede borik asit uygulamasının çimlenmeye etkileri	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 MS besiyeri içeriği (Murashige ve Skoog, 1962)	19
2.2 Mikro-çoğaltım ve transformasyon sonrası seçim besi ortamları	20
2.3 PZR’de kullanılan kimyasalları	23
2.4 Sıcaklığa bağlı PZR döngü koşulları	23
2.5 pENTR-dTOPO plazmidinde bulunan <i>HvBor1a</i> genini koloni PZR ile çoğaltmada kullanılan primer dizileri	24
2.6 <i>E. coli</i> ’de pIPKb004- <i>HvBor1a</i> ’nın varlığını göstermede kullanılan primer dizileri	26
2.7 <i>A. tumefaciens</i> ’te pIPKb004- <i>HvBor1a</i> ’nın varlığını göstermede kullanılan primer dizileri	27
2.8 İnfiltrasyon ortamı için kullanılan bileşenler	29
2.9 Transgenik aday tütünlerde <i>HvBor1a</i> geninin varlığını PZR ile belirlemede kullanılan primerler	34
2.10 Transgenik aday tütünlerde <i>HvBor1a</i> geninin ekspresyonunu RT-PZR ile belirlemede kullanılan primerler	34
3.1 Çalışmada elde edilen toplam transgenik aday sayıları	48
3.2 Transgenik adaylarına ait yapraklardan izole edilen total DNA ve RNA miktarları	52
3.3 Transgenik adaylarının moleküler analizi ve elde edilen tohum sayısı	55
3.4 T1 tohumlarının MS besiyerinde çimlenme ve gelişme oranları	62
3.5 T1 tohumlarının higromisinli besiyerinde çimlenme, gelişme oranları ve Mendel yasalarına göre kalıtım özellikleri	63
3.6 T1 tohumlarının toksik derişimde borlu besiyerinde çimlenme ve gelişme oranları	64

1 GİRİŞ

1.1 Transgenik Bitkiler ve Tarımdaki Uygulamaları

1.1.1 Bitkilere Gen Aktarım Teknikleri

Günümüzde bitkilere gen aktarımı, doğrudan ve dolaylı transformasyon teknikleri olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Doğrudan transformasyon teknikleri mikropartikül bombardımanı, protoplast füzyonu, elektroporasyon ve mikroenjeksiyon; dolaylı transformasyon teknikleri ise viral vektör veya *Agrobacterium* aracılığı ile yapılan gen aktarım tekniklerini içermektedir. Bunlar arasında en sık kullanılanlar mikro partikül bombardımanı ve *Agrobacterium* sistemidir.

Doğal olarak gen aktarma yeteneğine sahip toprak bakterisi *Agrobacterium tumefaciens*, günümüzde dikotil bitkilerin çoğunun gen transformasyonu için en sık kullanılan araçtır. *Agrobacterium*, toprakta çok bulunan, çubuk-şekilli ve gram-negatif bir bakteri olup *Rhizobiaceae* ailesindeki *Rhizobium* cinsi altında sınıflandırılır. *A. tumefaciens*, üzerinde yaşadığı bitki hücrelerine, tümör uyarıcı (Ti) genlerin bulunduğu T-DNA'yı (transfer DNA) aktarır. Bu genler, bitki genomuna entegre olarak taç tümörü hastalığına yol açarlar. Horsch ve ark. (1985) tümör uyarıcı genleri T-DNA'dan uzaklaştırarak *Agrobacterium*'un hastalık yapıcı özelliğini kaldırmışlardır. Bunun yerine, gen aktarılan bitkilerin seçilimini sağlayan ve bitki hücrelerinde eksprese olabilen bakteriyel antibiyotik direnç genlerini yerleştirmişlerdir. Aktarılacak geni, modifiye edilmiş *Agro*-soyu aracılığı ile domates, petunya ve transformasyon çalışmalarında model bitki olan tütüne transfer etmişlerdir. Bu yöntemle neredeyse kültürü yapılan her türün transgenik bitkileri geliştirilmiştir. Başlangıçta monokotiledon türler için yüksek verimli sonuçlar elde edilemese de ikili vektörlerin geliştirilmesiyle, *Agro*-transformasyonu mısır (Ishida ve ark., 1996), pirinç (Hiei ve ark., 1997), arpa (Tingay ve ark., 1997) ve buğdayda (Cheng ve ark., 1997) etkin sonuçlar vermiştir. *Agrobacterium* sistemi, aktarılan genin konak bitki kromozomuna kalıcı entegrasyonunu sağlaması, transgenlerin

düşük kopya sayısına sahip olması ve büyük DNA parçalarının aktarılmasına olanak vermesi ile diğer birçok yöntemle göre, daha çok tercih edilmektedir (Park, 2006).

Dolaylı gen transformasyonunda kullanılan etkin yöntemlerden bir diğeri olan bitki virüsü yoluyla gen aktarımı, *Agrobacterium* yönteminden daha kolay, protoplast transformasyonundan daha basit ve partikül bombardımanından daha ucuzdur. Bunun yanı sıra, tüm bitki hücrelerinin doğal olarak enfekte olması ve çok sayıda transgen kopyasının oluşması sonucu yüksek ekspresyon seviyeleri elde edilmektedir. Buna karşın, bitki virüsleri ile aktarılan genler, genomu entegre olmazlar ve gamet yoluyla aktarılmazlar; dolayısıyla etkileri mayozla kalıcı hale gelmez (Twyman ve ark., 2002).

Agrobacterium'a dayalı gen aktarım sisteminin etkin bir biçimde kullanılamadığı bitki türlerine gen aktarımı için çoğunlukla doğrudan gen aktarım teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikte, plazmid veya virüs gibi biyolojik vektörlere gereksinim duyulmaksızın, çıplak DNA doğrudan aktarılmaktadır. Enzimatik veya kimyasal yolla hücre duvarları uzaklaştırılmış bitki hücreleri olan protoplastların kullanıldığı protoplast füzyonu, doğrudan gen transferlerinin en yaygın kullanılan yöntemlerinden birisidir. Hücre duvarlarının uzaklaştırılması, özel kimyasalların kullanılması ve yüksek voltajlı elektrik şoku uygulaması, protoplast füzyonunda yabancı DNA'nın aktarımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca yüksek pH'da, polietilen glikol (PEG) ve polivinil alkol, Ca^{+2} gibi divalent katyonlarla bir arada kullanıldığında çıplak DNA'nın protoplastlara girişi daha etkin olmaktadır (Paszowski ve ark., 1984). Protoplasttan tam bir bitki elde edilmesinin 6 ay kadar uzun sürmesi, gelişen bitkilerde mutasyon ve kromozomal anomalilerin görülmesi ve uygulanabilecek tür sayısının sınırlı olması, bu yöntemin dezavantajlarıdır (Horsch ve ark., 1985).

Bir başka doğrudan gen aktarım tekniği, başta memeli hücresi transformasyonuna yönelik olarak geliştirilmiş, günümüzde ise hem monokotil hem de dikotil bitki türlerine uyarlanmış olan elektroporasyon yöntemidir. Bu teknikte genlerin girişi, yüksek voltajlı elektrik akımı uygulanan bir solüsyonda bulunan hücrelerin zarlarında geri dönüşlü porların oluşturulmasıyla sağlanmaktadır (Fromm ve ark., 1985).

Mikroenjeksiyon yöntemi, mekanik yolla çıplak DNA moleküllerinin tüm bitki hücresine veya protoplastlara aktarılması esasına dayanan önemli bir doğrudan transformasyon tekniğidir. Bitkiye aktarılması istenen genleri taşıyan DNA parçası, çok ince kılcal pipetlerle ve enjektörlerle, immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem veya mikrospor içerisine steril şartlarda, mikroskop altında doğrudan enjekte edilir. Bu şekilde genin sitoplazmaya veya doğrudan hücre çekirdeğine transferi sağlanmaktadır (Crossway ve ark., 1986). Ancak, çok iş gücü gerektiren ve yüksek maliyetli olan bu yöntemde elde edilen transformantların sayısı diğer yöntemlere göre daha düşüktür.

Biyolistik veya gen tabanca yöntemi olarak da bilinen mikropartikül bombardımanı, ilgili geni içeren genetik materyalin hücre duvarından doğrudan geçişini sağlayan bir yöntemdir. Bu teknikte, altın veya tungsten ile kaplanmış plazmid DNA'sı (mikropartikül) kullanılmaktadır. Makro-taşıyıcılar üzerine yerleştirilen bu mikropartiküller, petri içerisindeki bitki dokularına hava basıncı yardımıyla fırlatılır (Gan, 1989). Bombardıman sırasında perfore edilmiş plakaların makro taşıyıcıları durdurması, bitki hücrelerine sadece mikropartiküllerin ulaşmasını sağlamaktadır. Hücre içerisine giren mikropartiküller, kaplı olduğu yüzeyden kurtulur ve bitki hücresinin kromozomal DNA'sına entegre olur. Buna karşın mikropartikül bombardımanı, rekombinasyona ve genlerin susmasına sebep olabilecek karmaşık, büyük ve çok kopyalı transgenik lokuslar oluşturur (Yao ve ark., 2006). Sonuç olarak, *Agrobacterium* transformasyonu, mikropartikül bombardımanına göre daha az mutasyona sebep olmakta ve daha basit entegrasyonu sağladığı için daha avantajlı görülmektedir (Tzfira ve Citovsky, 2006).

1.1.2 Genetiği Değiştirilmiş Ekinlerde Tarımsal Uygulamalar

Tarım bitkilerinde, seçilen üstün bir özelliğin geleneksel bitki ıslah yöntemleri ile kalıcı ve yaygın hale getirilmesi hem uzun yıllar almakta hem de tercih edilmeyen başka özelliklerin de ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Belirli bir özellik açısından daha üstün bitkiler geliştirilmesinde birçok yöntem sunan Bitki Biyoteknolojisi'nin bir alt dalı olan Transgenik Bitki Teknolojisi, genlerin bir türden ilgili veya ilgisiz başka bir türe aktarılmasını hedeflemektedir. Bir genin bir

organizmaya rekombinant DNA teknolojisi yoluyla aktarılması işlemi transformasyon olarak bilinmekte ve bu şekilde yeni özellik kazanmış bitkiler transgenik veya genetiği değiştirilmiş (GD) bitkiler olarak adlandırılmaktadır.

Transforme edilen ilk bitki olan tütün kullanılarak bugüne kadar rekombinant proteinler, antikorlar ve ilaç endüstrisinde kullanılmak üzere özel kimyasallar üretilmiştir. Tütün (*Nicotiana tabacum* L.; $2n=4x=48$) yaklaşık 6 milyon yıl önce diploid olan *N. sylvestris* ve *N. tomentosiformis*'in çaprazlanması sonucu gelişen doğal bir allotetraploiddir. Tütün bitkisi, hızlıca çoğaltılabilmesi ve genetik olarak kolayca manipüle edilebilmesinden dolayı bitki biyoteknolojisinde model organizma haline gelmiştir (Ganapathi ve ark., 2004).

Başlangıçta genlerin yapı ve işlevlerini analiz etmek için yapılan ve 1980'lerin başından beri (Lamb ve Beachy, 1989) süre gelen bitki transformasyon çalışmaları; daha sonra ürün verimi ve kalitesini arttırma, hastalık ve nematod, böcek ve mantar gibi biyotik streslere ve topraktaki kuraklık, yüksek tuz konsantrasyonu ve ağır metal gibi abiyotik stres faktörlerine karşı direnci arttırma amaçlarına da yönelmiştir.

Ekin verimini önemli ölçüde azaltan bu stres faktörlerine karşı, gen düzeyindeki modifikasyon ve değişiklikler ile yüksek toleranslı transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Bu transgenik bitkilerin üretimine sadece 25 yıl önce başlanmasına karşın, günümüzde soya fasülyesi, mısır, pamuk ve kanola gibi birçok transgenik zirai bitki geniş alanlarda ekilmeye başlanmış ve bunların ürünleri marketlere kadar çoktan ulaşmıştır (James, 2005).

Diğer canlılar tarafından üretilen koruyucu protein ya da enzimleri kodlayan genlerin transferi, bitki verimliliğini etkileyen stres faktörlerine karşı toleranslı bitkilerin yetiştirilmesi için izlenen biyoteknolojik yöntemlerden birisidir (Ölçer, 2001). Bunun yanı sıra, çevresel faktörlere karşı toleransa sahip transgenik bitki geliştirme çalışmaları, ozmotik dengeleyici rolü olan maddeler, membrandaki yağ asitlerinin doymuşluk seviyesi veya oksijenli radikal grupların yok edilmesi gibi konuların daha çok araştırılmasına sebep olmuştur. Bu çalışmalar ışığında, bitkilerin uygun olmayan çevre koşullarından korunmak için kullandığı temel stratejilerden birinin çeşitli organik maddelerin biriktirilmesi yoluyla yaptığı metabolik düzenleme

olduğu belirlenmiştir. Örneğin; stres koşullarında betain birikiminin bitki hücresinde bulunan bazı protein kompleksleri ve zarın korunmasında rol aldığı düşünülmektedir. Bundan yola çıkılarak kolinden betain biyosentezinin, genetik mühendisliği yoluyla arttırılması ile strese hassasiyet gösteren ve bu maddeyi sentezleyemeyen bitkilerin de strese karşı toleransının arttırılması sağlanmıştır (Huang ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1998). Bir başka çalışmada ise kolin dehidrogenaz enzimini kodlayan genin *Escherichia coli*'den izolasyonu ve bu genin tütün ve patates bitkilerine aktarımı sonucunda sırasıyla tuza ve soğuğa toleranslı transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Sakamoto ve ark., 2000; Holmström ve ark., 2000). Ayrıca transgenik bitkilerde mannitol üretiminin arttırılması (Thomas ve ark., 1995; Shen ve ark., 1997) ve mutant tütün bitkilerinde prolin birikiminin sağlanması ile tuz stresine karşı dayanıklı bitkiler elde edilmiştir (Roosens ve ark., 1999). Bir başka çalışmada ise transgenik tütün bitkilerinde sorbitolün yüksek seviyede sentezlenmesi sonucu floemde bor taşınımı artmış, sonuçta bor eksikliği olan ortamlarda bitki gelişimi ve bor eksikliğine karşı bitkinin toleransı artırılmıştır (Brown ve ark., 1999).

1.2 Bor ve Bitkilerdeki İşlevsel Rolü

Periyodik tablonun üçüncü grubunun başında bulunan ve atom numarası 5 olan bor elementinin, kütle numaraları 10 ve 11 olan iki farklı izotopu bulunmaktadır. Bor, yeryüzünde toprak, kaya ve suda yaygın olarak bulunan bir elementtir. Toprağın bor içeriği genelde ortalama 10-20 ppm olmakla birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) batı bölgeleri ve Akdeniz'den Kazakistan'a kadar uzanan bölgede yüksek derişimlerde bulunmaktadır. Deniz suyunda 0,5-9,6 ppm; tatlı sularda ise 0,01-1,5 ppm aralığındadır. Yüksek derişimde ve ekonomik boyutlardaki bor yatakları, borun oksijen ile bağlanmış bileşikleri olarak daha çok Türkiye ve ABD'nin kurak, volkanik ve hidrotermal aktivitesi olan bölgelerinde bulunmaktadır. Dünya tahmini bor rezervi 1,2 milyar ton olup; bu rezervin % 72,2'si Türkiye'de (851 milyon ton B₂O₃), % 8,5'i Rusya'da ve % 6,8'i ABD'de bulunmaktadır (DPT Bor Madenleri Raporu, 2007).

Topraktaki borun büyük kısmı, boraks, kolemanit, üleksit, turmalin ve borat mineralleri olarak bulunur ve bitki tarafından kullanılabilir halde değildir. Bitkinin

faaydalanabildiği, suda nr borik asit (H_3BO_3) ise zayıf bir monobazik asit (pK_a 9.24) gibi davranarak topraktaki çoğu pH koşullarında ayrışmaz. Diğer elementlerden farklı olarak bor, toprak solüsyonunda iyonize formda bulunmaz. Toprakta H_3BO_3 formunda bulunan bor, yüksek yağış alan bölgelere (Japonya, in, Brezilya) ait topraklarda kolaylıkla akabilmekte ve bu durum bitki büyümesi için gerekli olan borun eksikliğine sebep olmaktadır (Shorrocks, 1997). Buna karşın az yağış alan bölgelerde bor, yeteri miktarda akamayıp toprakta birikmekte ve bitkilerde toksik etkiye sebep olmaktadır (Reid, 2007b). Ayrıca toprak niteliği ve nemi, sıcaklık, pH ve kil mineralojisi gibi fiziksel faktörler borun bitki tarafından alınımını etkilemektedir (Goldberg, 1997; Mengel ve Kirkby, 2001). Örneğin; toprakta kil miktarı arttıkça bitki tarafından bor emilimi de artmaktadır (Goldberg, 1997).

Borun yüksek bitkiler için mutlak gerekli bir besin elementi olduğu yaklaşık 80 yıl önce belirlenmesine karşın (Warington, 1923), bitkideki işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Mevcut bilgilere göre bitki hücresinde borun, karbonhidrat ve protein metabolizmasında, şeker taşınımında, hücre duvarı sentezi ve yapısal sürekliliğinde, lignifikasyon, respirasyon ve RNA metabolizmasında önemli roller aldığı belirlenmiştir (Parr ve Loughman, 1983). Ek olarak bor, nitrojen fiksasyonu, doku farklılaşması, oksin ve fenol metabolizmasında, hücre zarı geçirgenliğinde, polen çimlenmesinde ve polen tüpü büyümesinde de önemli roller üstlenmektedir (Marschner, 1995). Son dönemde yapılan çalışmalarda, borun hücre duvarında pektik bir polisakkarit olan ramnogalakturonan-II (RG-II)'ye tutunduğunun doğrulanması, bitkide önerilen fizyolojik birçok rolünü açıklamaktadır (O'Neill ve ark., 2004). Örneğin, borun hücre duvarındaki işlevsel rolü, turp kök hücre duvarlarından bir bor-polisakkarit kompleksinin izolasyonu ve karakterizasyonu ile gösterilmiştir (Matoh ve ark., 1993). Glikozil analizleri bu kompleksin polisakkarit bileşeninin, borat diol ester ile çapraz olarak bağlı ve bir dimer olarak bulunan RG-II olduğunu göstermiştir (Kobayashi ve ark., 1996). RG-II, içerdiği apioz şekeri sayesinde boru, kovalent bağ ile hücre duvarındaki pektinin polisakkarit zincirlerine bağlamaktadır.

Birçok biyolojik molekülün yapısında bulunan ve cis-diol grubuna sahip riboz şekerlerinin de kolaylıkla bora bağlandığı gösterilmiştir (Landers ve ark., 1992). Örneğin riboz içeren biyomoleküller arasında nikotinamid adenzin dinkleotidin (NAD^+) bora bağlanma afinitesi yüksektir (Hunt, 2002). Malat dehidrogenaz ile

yapılan aktivite çalışmalara göre, borun NAD^+ ile kompleksler oluşturarak metabolizmayı bozabildiği gösterilmiştir (Reid ve ark., 2004). Apioz ve riboz dışında bor ile güçlü bir etkileşime giren biyolojik moleküller arasında sorbitol ve diğer şeker alkolleri, fenoller ve serin gibi amino asitler de bulunmaktadır (Brown ve ark., 2002).

Mısır (Pollard ve ark., 1977) ve ay çiçeği (Schon ve ark., 1990) kök uçlarında bor eksikliği ve borun yeniden uygulanması sonrasında iyon akışı değişikliklerinden yola çıkılarak, borun belirli bir rolünün de plazma zarı bütünlüğünün sağlanması olduğu önerilmiştir (Cakmak ve Römhelde, 1997). Ayrıca başka çalışmalarda bor eksikliği uygulanmış hücre veya köklerde, plazma zarına bağlı H^+ pompalayan ATPazların aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir (Pollard ve ark., 1977; Blaser-Grill ve ark., 1989). Borun yeniden uygulanmasıyla ATPaz aktivitesinin geri kazanılması, zar potansiyelindeki hiperpolarizasyon ve proton salınımının artması ile gösterilmiştir. Bundan dolayı, borun iyon akışındaki etkilerinin, doğrudan veya dolaylı olarak zara bağlı ATPazlardan kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ise, borun plazma zarındaki glikoprotein ve glikolipidlerin hidroksil gruplarına bağlanmasının, borun zara bağlı ATPazlara uyarıcı etkilerinin ve zar geçirgenliğindeki değişimin asıl nedeni olduğu önerilmiştir. Ayrıca, borun glikoprotein ve glikolipid komplekslerine bağlanması, zar yapısının kararlılığını sağlayarak zardaki enzim ve kanalları optimum konformasyonda tutmaktadır (Cakmak ve ark., 1995; Cakmak ve Römheld, 1997; Brown ve ark., 2002; Goldbach ve Wimmer, 2007).

Bitki büyüme ve gelişimi için esas elementlerden olması ile birlikte, diğer elementlerle karşılaştırıldığında borun toksisite ve eksikliğe yol açan seviyeleri arasındaki fark çok azdır. Ayrıca bitkilerin bor gereksinimi, türler ve tür içindeki genotipler arasında dahi oldukça değişiklik göstermektedir. Örneğin, arpa ve buğday gibi otsu monokotillerin en düşük gereksinimi 4-10 $\mu\text{g B/g}$ kuru ağırlık iken, dikotiller için bu 20-55 $\mu\text{g B/g}$ kuru ağırlıktır (Hu ve ark., 1996; Mengel ve Kirkby, 2001). Çoğu türün bor gereksinimindeki farklılıkların hücre duvarındaki pektin (Hu ve ark., 1996) veya şeker ve polifenol miktarlarıyla (Mengel ve Kirkby, 2001) ilişkili olduğu önerilmiştir.

Tarlada bor eksikliğine olan olumsuz cevaplar veya bor uygulamasına olan olumlu cevaplar, ekinlerin bor gereksinimlerini belirlemede kullanılmıştır (Shorrocks, 1997). *Brassicaceae* familyasından bazı dikotiller, örneğin lahanalar, şalgam ve karnıbahar bor eksikliğine çok hassas olup bor uygulamasına en duyarlı cevabı verirler. Kereviz, kahve, pamuk, ayçiçeği, zeytin ve üzüm bor eksikliğine duyarlı olan diğer bazı ekinlerdir. Yonca, bezelye ve fasulye de yüksek seviyede bora ihtiyaç duyar (Mengel ve Kirkby, 2001). Çoğu bitki türü için reproduktif büyümede gerekli olan bor gereksinimi vejetatif büyüme için gerekli olandan çok daha yüksektir. Bununla birlikte, borun polen tüpü büyümesi, polen oluşumu ve polen ömründe kritik olduğu bildirilmiştir (Dugger, 1983; Blevin ve Lukaszewski, 1998).

1.2.1 Bor Taşıma Sistemi

Bitki kökleri, toprak solüsyonunda bulunan boru, topraktaki toplam borun yaklaşık % 10'unu oluşturan ve ayrılmamış halde hücre zarlarından geçen H_3BO_3 formunda alırlar (Power ve Woods, 1997). İlk zamanlarda borik asitin hücre içine alınımının sadece pasif difüzyon ile olduğu düşünülmekteydi. Borik asite karşı hücre zarındaki çift katlı lipid tabakasının yüksek geçirgenliği, bu hipotezin ortaya atılmasında en büyük etkendi (Raven, 1980). Marschner'in 1995'te yaptığı çalışmada da bor eksikliği belirtisinin genç dokularda; toksisite belirtisinin ise yaşlı dokularda görülmesi, bor taşınımının pasif difüzyon ile yapıldığı hipotezini doğrulamaktaydı. Fakat fizyolojik çalışmalar ve zar geçirgenliğinin doğrudan ölçümü, bor taşıma sistemlerinin, hem pasif difüzyonu hem de kanal-yoluyla difüzyonu içerdiğini göstermiştir (Stangoulis ve ark., 2001). Ayrıca spesifik bor taşıyıcı protein ve kanallarının ilk olarak *Arabidopsis thaliana*'da belirlenmesi bor taşınımının sadece pasif difüzyon ile olmadığını ortaya koymuştur.

Bugüne kadar iki tip bor taşıyıcı protein tespit edilmiştir. Bunlar, borik asit kanalları olarak ifade edilen nodulin-26-benzeri proteinler (NIP'ler) ve bor taşıyıcılarıdır (BOR). *Arabidopsis thaliana*'da BOR1 ve NIP5;1 olarak tanımlanan iki tip bor taşıyıcısının, bor eksikliği altında plazma zarından borun geçişinde etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir (Takano ve ark., 2002; 2006). Bu taşıyıcılardan BOR1, biyolojik sistemlerde belirlenen ilk bor taşıyıcısıdır. Yapılan çalışmalarda bor

toksisitesi altında BOR1 protein seviyesinin düştüğü tespit edilirken; bor eksikliği altında BOR1'in özellikle hücre zarında biriktiği gözlenmiştir. İlginç bir şekilde yüksek bor konsantrasyonu altında BOR1'in endozom yapısına dahil olduğu ve parçalanmak üzere vakuollere taşındığı belirlenmiştir (Takano ve ark., 2005). Filogenetik analizler kullanılarak yapılan bir çalışmada ise çeltik köklerinin uzama bölgesindeki ekzodermal ve endodermal hücrelerde eksprese olan *OsBOR1* adlı BOR1-benzeri bir gen belirlenmiştir (Nakagawa ve ark., 2007).

Diğer bir bor taşıyıcısı olan NIP5;1 borun kök hücrelerine alınımını kolaylaştıran bir borik asit kanalıdır. *A. thaliana* köklerinde düşük bor derişimi altında yapılan mikroyarray çalışmalarında 24 saat sonunda NIP5;1 mRNA seviyesinin 15 kat arttığı tespit edilmiştir (Takano ve ark., 2006).

Sonuç olarak bor taşıyıcılarının belirlenmesi, borun hücre zarından geçişinin sadece pasif difüzyon ile değil, aynı zamanda çevresel bor koşullarına cevaben düzenlenen taşıyıcı kanallar ile aktif şekilde yapıldığını ortaya koymuştur (Miwa ve Fujiwara, 2010).

Bitki bünyesinde hareketi sınırlı olan borun, bitkide yapraklara taşınmasında transpirasyonun etkili olduğu saptanmıştır (Michael ve ark., 1969). Bitkiler tarafından bor alımı ve farklı organlara taşınmasının bitkinin su alımı ve suyun ksilemdeki hareketi ile yakından ilişkili olduğu ve ayrıca bu taşınmanın bitki türleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (Marschner, 1976). Bor taşınmasının daha çok transpirasyona bağlı olması, yaprak uçları ve kenarlarında bor birikiminin nedenini de açıklamaktadır. Borun yapraklarda bu şekilde birikmesi toksik etkilere neden olabilmektedir.

1.2.2 Bor Toksisitesi

Balıkesir, Kütahya, Eskişehir gibi orta ve batı Anadolu şehirlerinde yer alan dünyanın en büyük sodyum borat kaynakları, Türkiye'yi bor kaynakları açısından dünyada lider duruma getirmiştir (Kar ve ark., 2006). Bu durum, bölgede borun su kaynakları ve tarım alanlarını etkileyen önemli bir problem olmasına sebep olmaktadır (Nebiler ve ark., 1999; Öztürk, 2000). Benzer şekilde, topraktaki yüksek

bor derişimi, Güney Avustralya, Kaliforniya ve şili gibi dünyanın kurak ve yarı-kurak bölgelerinde tarımsal üretimi ciddi şekilde sınırlamaktadır (Nable ve ark., 1997; Cartwright ve ark., 1984). Diğer yandan, az yağış alan ve volkanik olayların meydana geldiği çoğu bölgede ekinler bor toksisitesine maruz kalabilmektedir (Power ve Woods, 1997). Ayrıca bor toksisitesi çoğunlukla direnaja eksikliği olan tuzlu topraklarda grlmektedir (Goldberg, 1997).

Tahıl bitkileri için toprakta çözülebilir bor miktarının 5 mg/L zerine çıktığı durumlar toksisite olarak kabul edilir (Mengel ve Kirkby, 2001). Ancak bu değer tahılların çeşitlerine, fizyolojik büyüme koşullarına ve sulamaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Nable ve ark., 1997). Bora karşı duyarlı olan tahılların Türkiye topraklarında yüksek oranda bora maruz kalması tahılların veriminin azalmasına yol açmaktadır (Kalaycı ve ark., 1998; Torun ve ark., 2001; 2003).

Yüksek seviyede bor, kök ve gövdede büyümeyi azaltır, yaprak uçlarında ve olgun yaprakların kenarlarında nekroza yol açar (Nable ve ark., 1997; Reid ve ark., 2004; Reis ve Fitzpatrick, 2009). Nekrozun nedeni, daha çok transpirasyona bağlı bor taşınması ve dolayısıyla yaprak uçları ve kenarlarında bor birikimi olarak gösterilmektedir. Yaprak kenarlarından başlayan bora bağlı semptomlar, sonrasında lateral damarlardan orta damara yayılır (Mengel ve Kirkby, 2001). Klorosis sonrası nekroz oluşumunun yanı sıra, borun floemdeki hareketliliğinin de belirlendiği bitki türlerinde (Brown ve Hu, 1996) toksisite semptomları arasında meyve çürümesi, kuru madde kaybı, kök uzamasının engellenmesi, kabuk nekrozları ve kambiyum ölümüne bağlı gövde ölümü yer almaktadır (Nable ve ark., 1997; Marschner, 1995). Bor toksisitesinin bir başka morfolojik semptomu olan yaprak kıvrılması belli bitki türlerinde görülmüş ve bu durumun hücre duvarının genişlemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Loomis ve Durst, 1992).

Bitki türleri arasında olduğu gibi, aynı türün eşitleri arasında bora duyarlılıkta büyük farklılıkların bulunduğu ve bu farklılıkların nedeninin bitkilerin bor toksisitesinden bitkilerin fizyolojik olarak aynı derecede etkilenmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Paull ve ark., 1988; Nable, 1991). Örneğin, bor toksisitesine direnç gösteren buğday eşitleri 150 mg B/kg uygulanan toprakta yetiştirildiklerinde üründe önemli bir azalma

gözlenmezken, aynı derişimde yetiştirilen bora duyarlı çeşitlerde ise büyük ürün kayıpları olmakta ve hatta bu çeşitlerde 25 mg B/kg uygulamasında dahi verim azalması görölmektedir (Paull ve ark., 1988).

Doku bor içeriklerine göre, duyarlı ve toleranslı genotiplere ait yaprak bor derişim farkının 10 kata kadar değişebileceği belirlenmiştir (Furlani ve ark., 2003). Bor derişiminin aynı zamanda bir bitkinin farklı kısımları veya dokularında ve farklı gelişim evrelerinde dahi büyük değişiklik gösterebildiği tespit edilmiştir. Arpa ve buğdaydaki kritik değerler kilogram başına düşen kuru ağırlıkta sırasıyla 10 ve 130 mg bor olarak belirlenmiştir (Kludge ve Podlesak, 1985; Riley ve ark., 1994; Mengel ve Kirkby, 2001). Bununla birlikte, buğday yaprağında kritik bor derişimi 700 mg B/kg kuru ağırlık olarak belirlenmiştir (Ayars ve ark., 1993). Bor toksisitesine en duyarlı bitkiler arasında elma, şeftali, üzüm, fasulye ve incir; yarı toleranslılar arasında arpa, mısır, patates, tütün ve domates; ve de en toleranslılar arasında şeker pancarı, turp, havuç ve pamuk yer almaktadır (Mengel ve Kirkby, 2001).

Gereksiniminden fazla bora maruz kalan yüksek bitkilerde, çeşitli enzimlerin aktivitelerinde ve sonrasında metabolizmalarında önemli değişiklikler belirlenmiştir. Örneğin yapılan bir proteom çalışmasında (Atik ve ark., 2011), bor toksisitesi uygulanan toleranslı arpa çeşidinde, ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCo) enziminin uzun zinciri, thaumatin-benzeri bir protein (TLP5), patojenite ile ilgili bir protein (PR5), RNaz S-benzeri bir protein, PSI tip III klorofil a/b bağlanma proteini, ışık-hasat kompleksi I (LHC I) ve vakuolar proton-translokasyon ATPaz alt birimi E proteini olmak üzere 7 proteinin ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Wimmer ve ark., 2003).

Literatürde borun nitrojen bileşenlerinin metabolizmasını etkilediğinin rapor edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Bonilla ve ark., 1980; Kastori ve Petrovic, 1989). Örneğin arpa ve buğdayda, bor toksisitesi altında yaprak ve kök dokularında nitrat redüktaz ve glutamat dehidrogenazın aktivitelerinin değiştiği belirlenmiştir (Mahboobi ve ark., 2002).

Bitkilerde tuzluluk, kuraklık, patojen enfeksiyonu ve ekstrem sıcaklık gibi çevresel stresler altında sükröz gibi çeşitli karbonhidratların seviyesinin değiştiği

gözlenmiştir (Rosa ve ark., 2009) Benzer şekilde borun şekerden nişasta yapımını inhibe ettiği ve toprak bor derişimi yüksek olduğunda kök ucunda şekerlerin azaldığı tespit edilmiştir (Marschner, 1995).

Biyokimyasal ve fizyolojik analizlerin yapıldığı bir çalışmada (Karabal ve ark., 2003) arpada bor toksisitesinin antioksidan enzim mekanizmaları ile olan ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre; bor toksisitesi altında osmotik koruyuculardan prolin seviyesinde herhangi bir değişim tespit edilmemiştir. Çalışma sonucunda, bor toksisitesinin arpa yapraklarında hücre zarı hasarına neden olduğu ancak bu durumun genel stres cevaplarında olduğu gibi aktif oksijen çeşitlerini artırmadığı ve antioksidan enzim aktivitelerinin toksisite koşulları altında kritik bir rol oynamadığı görülmüştür.

1.2.3 Bitkilerde Bor Tolerans Mekanizması ve Bor Toleransı Geliştirmeye Yönelik Yaklaşımlar

Vasküler bitkilerde bor tolerans mekanizmasını çözmeye yönelik, borun topraktan emilimi, bitki içinde hareketi, transpirasyon sonunda birikimi, yaprakta görülen derişim gradienti, toksisite belirtileri, dokulardaki bor miktarları ve tür ile çeşitler arasındaki bor toksisite toleransı çeşitliliği incelenmiştir (Reid ve ark., 2004).

Bitkilerde bor toksisitesi veya eksikliğine karşı toleransla ilgili mekanizmalar henüz tam anlaşılmamakla birlikte tolerans mekanizmalarıyla ilgili önerilen birkaç model bulunmaktadır. Bunlardan ilki, hücre içi bor derişimi toksik seviyelere ulaştığında bora bağlanan bileşenlerin varlığını (Reid ve ark., 2004); ikinci model, borun bölgesel birikimini ve bir başka model ise borun bir taşıyıcı ile aktif taşınımını önermektedir (Hayes ve Reid, 2004). Dolayısıyla tolerans mekanizması farklı taşıma sistemlerini kullanarak borun bitki dokularında düşük derişimlerde kalmasını sağlamaktadır. Buna göre bor alınımı azalmakta veya köklerden aktif bor akışı olmaktadır. Toleranslı çeşitlerde bor birikiminin hassas çeşitlere göre düşük miktarlarda tespit edilmesi, borun kompleks yapılara bağlanması veya vakuollerde kompartmentasyonundan ziyade; boru dışarı atma mekanizmasının daha geçerli olabileceğini önermiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Arabidopsis*, çeltik, arpa ve buğdayda önemli birkaç bor taşıyıcısı belirlenmiştir (Miwa ve Fujiwara, 2010). Örneğin; *Arabidopsis*’te *AtBOR1* ve *AtNIP5;1* genlerinin bor eksikliğinde borun etkin şekilde taşınımı için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Takano ve ark., 2002; 2006). Buna göre *BOR1*’in, kök hücreleri ile toprak arasında konsantrasyon gradiyenti oluşturduğu ve bu gradiyent farkının kök hücrelerine borun *NIP5;1* tarafından alınması için kullanıldığı düşünülmektedir (Miwa ve Fujiwara, 2010). Aynı zamanda bor toksisitesi altında bor alınınının *AtNIP5;1*’in transkripsiyonel regülasyonu veya *AtBOR1*’in endositoz ve degradasyonu ile düzenlendiği de gösterilmiştir (Takano ve ark., 2005).

Karakterize edilen ilk bor taşıyıcısı olan *BOR1*’e ait homolog genler *Arabidopsis thaliana* dışındaki diğer bitki türlerinde tespit edilmiştir. Örneğin Sutton ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada, bor toleransları farklı 2 arpa çeşidinde yapılan kantitatif özellik lokusu (QTL) analizinde haritalanan bölgede *BOR1* homologue bulunmuştur ve bu gen *Bot1* olarak isimlendirilmiştir. Aynı dönemde Reid (2007) arpa ve buğdaydan sırasıyla *Hv-BOR2 (Bot1)* ve *Ta-BOR2* genlerini klonlamış ve bu genlere ait ürünlerin *BOR1* gibi yüksek bor toleransından sorumlu olduklarını tespit etmiştir. Ayrıca *AtBOR1* ortoloğu olan *Oryza sativa* *BOR1*’in, borun köklerle alınımı ve gövdede taşınımında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Nakagawa ve ark., 2007). *BOR1* paralogu olan *BOR4* geninin ekspresyon seviyesi artırılarak *Arabidopsis thaliana*’da toksik bor koşullarına karşı yüksek seviyede tolerans sağlanmıştır (Miwa ve ark., 2007). Bu çalışmada *BOR1*’in aksine *BOR4*’ün toksik bor koşulları altında degrade olmadığı belirlenmiştir. Bor taşıyıcılarının bor koşullarına bağlı ekspresyon ve protein seviyelerindeki değişim, bitkilerin bor stresine karşı tolerans mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (Miwa ve Fujiwara, 2010). Ayrıca *At-BOR1* geni ve *At-BOR1* ortologları olan, arpadaki *HvBOR2* ile çeltikteki *OsBOR1* genlerinin mayada ekspresyonu, hücre içi bor derişimini azaltmıştır (Takano ve ark., 2002; Sutton ve ark., 2007; Nakagawa ve ark., 2007). Son dönemde yapılan bir çalışmada, *Arabidopsis* bor taşıyıcısı *AtBOR4* geninin *Oryza sativa*’daki ekspresyonu yüksek derişimde bora tolerans sağlamıştır (Kajikawa ve ark., 2011).

Son dönemde buğdayda bor taşıyıcısı olarak belirlenen Ta-BOR2'nin mRNA dizisinin, arpada *HvBor1a* geninin kodlanan dizisine (CDS) yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu genin kodlanan dizisinin *HvBot1* ve *OsBOR3* ile sırasıyla %89 ve %83 oranlarında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Öz, 2012). Bu çalışmada Clipper ve Sahara arpa çeşitleri kullanılarak bor toksisitesi altında *HvBor1a* geninin ekspresyon seviyeleri kök ve yaprak dokularında belirlenmiştir. Buna göre her iki çeşitte de yaprak dokularında *HvBor1a* ekspresyon seviyesi, kök dokularına göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu nedenle *HvBor1a*'nın borun yapraklarda dağılımından sorumlu olduğu düşünülmüştür. Buna ek olarak, arpa köklerinde *HvBor1a* ekspresyon seviyesinin düşük olmasına rağmen, kök dokularından alınan farklı segmentlerdeki ekspresyon seviyeleri araştırıldığında en yüksek ekspresyonun kök uçlarında olduğu tespit edilmiştir.

1.3 Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı

Son zamanlarda *BOR1* ve *NIP5;1* gibi genlerin belirlenmesi, yaşayan organizmalarda bor taşıyıcıları ile ilgili moleküler seviyede çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır. Özellikle *AtBOR1* ile ilgili çalışmalar hem bor eksikliği hem de bor toksisitesine karşı tolerans mekanizmalarının anlaşılması için yeni kapılar açmıştır. *A. thaliana*'da yapılan bu çalışmalar temel alınarak *Saccharomyces cerevisiae* ve insanda bor taşıyıcıları belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalar bitkilerin, çevresel bor koşullarına karşı, bor taşıyıcılarının ekspresyon ve protein seviyelerini düzenleyerek cevap verdiğini de göstermiştir. Bu nedenle günümüzde bor eksikliği ve toksik koşullar altında, bor taşıyıcıları manipüle edilerek bitkilerin daha iyi büyümesi sağlanabilmektedir (Miwa ve ark., 2007; Kajikawa ve ark., 2011). Buna karşın bor taşıyıcılarının düzenlenme mekanizmaları hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Sonuç olarak model organizmalarda bor taşıyıcıları ve kanallarının moleküler mekanizmalarının belirlenmesi ve bu taşıyıcıların yapılarının anlaşılmasının, bor stresinden etkilenen tahıl bitkilerinde bor toleransı geliştirmeye olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tezin amacı bor stresine dayanıklı bitkiler geliştirilmek üzere; diğer bor taşıyıcılarıyla yapısal benzerliği bulunan ve bu yüzden bor tolerans mekanizmasında

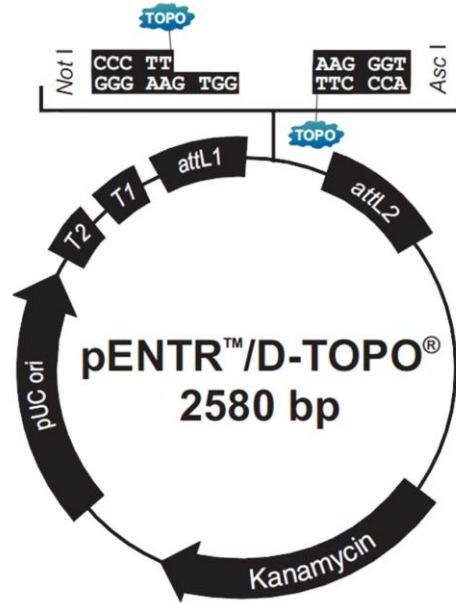
taşıyıcı rolü ile etkin olduğu düşünölen arpa kökenli *HvBor1a* 'nın model organizma olan tütüne transformasyonudur. Böylece ilk defa, bor taşıyıcısı bir proteini kodladığı düşünölen bir genin, kaynağından farklı ve model organizma olan tütünde heterolog ekspresyonu sağlanmışır.

2 MATERYAL ve YÖNTEM

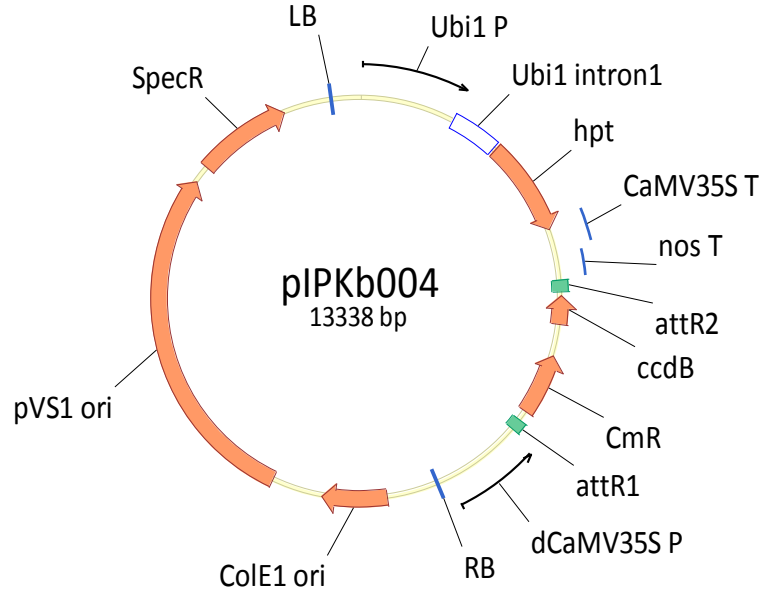
2.2 MATERYAL

2.2.3 Bakteri Soyu ve Plazmidler

Bu çalışmada, arpaya ait “Clipper” çeşidinden pENTR–dTOPO plazmidine (Şekil 2.1) klonlanmış olan *HvBor1a* geni kullanılmıştır (Öz, 2012). *HvBor1a* genini taşıyan pENTR–dTOPO plazmidi, *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) soyuna ait kompetan hücreler aracılığıyla çoğaltıldı. Bitki transformasyonunu gerçekleştirmek üzere ilgili gen, ekspresyon vektörü pIPKb004 plazmidine (Şekil 2.2) klonlandı. Gen, vektör içinde *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 soyuna aktarıldı.



Şekil 2.1 pENTR–dTOPO vektörünün haritası (*attL1* ve *attL2*: rekombinasyon bölgeleri; TOPO: Topoizomeraz I; T1 ve T2: *rrnB* transkripsiyon terminasyon dizileri; Kanamycin: bakteriyel kanamisin direnç geni; pUC ori: pUC orijini; Tüm hakları Invitrogen’e aittir).



Şekil 2.2 pIPKb004 vektörünün haritası (LB: T-DNA sol sınırı; RB: T-DNA sağ sınırı; Ubi1 P: ubikütün 1 gen promotoru; hpt: higromisin fosfotransferaz; CaMV35S T: CaMV35S terminatörü; nos T: nopalin sentaz terminatörü; attR1 ve attR2: rekombinasyon bölgeleri; CmR: Kloramfenikol direnç geni; ccdB: letal gen; dCaMV35S P: iki kat güçlendirilmiş CaMV35S promotoru; ColE1 ori: ColE1 orijini; pVS1 ori: pVS orijini; SpecR: bakteriyel spektinomisin direnç geni; Vektör IPK'den sağlandı).

2.2.4 Bakteri Kültür Ortamı ve Kültür Koşulları

E. coli TOP10 hücreleri, sahip oldukları plazmide göre seçici antibiyotikleri içeren Luria Bertani (LB) sıvı besiyerinde, yaklaşık 100 rpm'de (revolutions per minute) çalkalanarak ya da yarı katı besiyerinde 37°C sıcaklıkta gece boyu inkübe edilerek büyütüldü. Plazmidlerin hücrelere aktarımı sonrası, kompetan hücreler S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolic repressor) ortamında iyileştirildi. *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 soyu, seçici antibiyotikli YEB (Yeast Extract Broth) sıvı besiyerinde 180 rpm'de çalkalanarak ya da yarı katı YEB'de 28°C sıcaklıkta büyütüldü. Kültür ortamları pH 7,0-7,2 olmak üzere distile su ile hazırlandı. Yarı katı besiyerleri hazırlanırken %1,5 (w/v) agar ilave edildi. Sterilizasyon 121°C sıcaklıkta 20 dk otoklavlanarak yapıldı. Seçici antibiyotikler 0,2

μm çapında porlu filtreden geçirilerek steril edilip, besiyerleri soğutulduktan sonra ortamlara ilave edildi. İlgili geni taşıdığı doğrulanan kolonilerden, uzun süre saklama amacıyla %40 gliserol stokları hazırlandı ve -80°C dondurucuda saklandı.

2.2.5 Bitki Materyali ve Doku Kùltür Ortamı

Transformasyon çalışmalarında eksplant kaynağı olarak, model organizma olan tütüne (*Nicotiana tabacum*) ait Samsun ve Petit Havana eřitleri kullanıldı. Transforme edilecek yabancı tip tütün bitkilerinin mikro oğaltımı MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamında 3-4 haftada bir alt kùltürlenerek yapıldı. MS besiyeri (izelge 2.1), MS mikro-makro elementleri, vitaminleri ve sükroz distile suda çözölerek hazırlandı. pH 5,7-5,8'e ayarlandıktan sonra %0,3 (w/v) fitajel ilave edildi ve besiyerleri otoklavda 121°C sıcaklıkta 20 dk steril edildi. MS'in diğerkombinasyonları olan MSA, MSB ve MSC besi ortamlarında (izelge 2.2) kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve antibiyotikler 0,2 μm çapında porlu filtre ile steril edilip besiyeri soğutulduktan sonra ilave edildi. Tüm bitki doku kùltürleri, $24\pm2^{\circ}\text{C}$, $300\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ floresan ışığında, %70 nem ve 16/8 saat (aydınlık/karanlık) foto periyodunda inkübe edildi. Tütün transformasyonunda kullanılan infiltrasyon ortamı da filtre ile steril edildi.

Çizelge 2.1 MS besiyeri içeriği.

	mg / L
Makro Elementler	
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,00
Mikro Elementler	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Organik Bileşenler	
Glisin	2,00
Myo-inositol	100,00
Nikotinik asit	0,50
Pridoksin-HCl	0,50
Tiamin-HCl	0,10

Çizelge 2.2 Mikroçoğaltım ve transformasyon sonrası seçim besi ortamları.

Ortam	Bileşenleri	Kullanım amacı
MS	MS + 30g/L sükroz	Yaprakların kesilmesinde ortam oluşturma
MSA	MS + 30g/L sükroz + 2.6 g/L fitajel + 1 mg/L BAP (benzilaminopürin) + 0.1 mg/L NAA (naftelenasetik asit)	Yabani tip yaprak disklerinde kallus ve mikro gövde oluşumu; <i>Agrobacterium</i> uygulanmış yaprak disklerinin birlikte-kültürlenme safhası
MSB	MSA + 30 mg/L Higromisin + 250 mg/L Timentin	Transforme olmuş yaprak disklerinden mikro gövde rejenerasyonu ve seçilimi
MSC	MS + 3 g/L fitajel + 30 mg/L Higromisin + 250 mg/L Timentin	Rejenere olmuş gövdelerde kök oluşumunun uyarılması, ve transgenik adaylarının alt kültürlenmesi

2.2.6 Kullanılan Kimyasal ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, Sigma-Aldrich Firması (ABD), Merck KGaA (Almanya), Fermentas (Kanada), AppliChem GmbH (Almanya), Qiagen N.V. (Hollanda) ve Invitrogen Firması (ABD)'nden sağlandı. Çalışmanın elektroforez, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), nükleik asit saflaştırılması gibi moleküler kısmını oluşturan deneylerde kullanılan kimyasal, enzim, oligonükleotid ve kitler başlıca Qiagen ve Invitrogen firmalarından sağlandı. Kullanılan tüm besi ortamları ve solüsyonlar distile su (dH₂O) veya ultra saflaştırılmış su ile hazırlandı.

2.2.7 Kullanılan Cihazlar

Bitkiler kontrollü koşullar altında bitki büyütme odasında büyütüldü. Besiyerlerinin pH'sı pH metre (Mettler Toledo MPC227) ile ayarlandı. Tüm doku kültürü çalışmaları, yatay hava akımlı steril kabinde (Faster) gerçekleştirildi.

Bakteri kültürleri cam erlenmayerler veya falkon tüpler içinde orbital çalkayıcılarda (Gerhardt GmbH, Weiss Gallenkamp Ltd) büyütüldü. Bakterilerin OD'si UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu Mini1240) ölçüldü.

Moleküler biyoloji tekniklerinde santrifüj makineleri (Sigma 3-16PK, MPW Med. MPW-65R), su banyosu (B-Braun) ve ısı bloğu (Techne Dri-Block DB-2A) kullanıldı.

Moleküler çalışmalar boyunca PZR inkübasyonları termal döngü cihazlarında (Bio-Rad Lab. MyCycler, G-Storm GS1) yapıldı. Jel elektroforezi yatay elektroforez sistemleri (Bio-Rad Lab.) ile gerçekleştirildi. Jel görüntülemesi ise GelDoc-It Görüntüleme Sistemi (UVP Ltd) ile sağlandı. Plazmid, DNA ve RNA konsantrasyon ölçümleri NanoDrop1000 (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak yapıldı.

2.2 YÖNTEM

2.2.1 *HvBor1a* Geninin Bitki Transformasyon Vektörüne Klonlanması

2.2.1.1 *HvBor1a* Genini Taşıyan Plazmidin *E. coli*'ye Aktarılması

HvBor1a genine sahip pENTR-dTOPO plazmidini, kompetan *E. coli* TOP10 hücrelerine aktarmak üzere öncelikle kompetan hücreler buza batırıldı ve bakteri solüsyonu tam çözünmeden 10-50 ng (6-12 µl) plazmid eklendi. Süspansiyon hafifçe karıştırıldı ve 30 dakika buzda inkübe edildi. Daha sonra hücreler 42°C su banyosuna batırılarak ısı şokuna maruz bırakıldı. Devrim olmadan, 45 sn inkübasyondan

hemen sonra hücreler tekrar buza alındı ve üzerlerine 500 µl S.O.C. eklendi. Bakteri solüsyonunun 37°C ve 180 rpm’de 1 saat inkübasyonu sonrasında karışımdan 100 µl alınarak; gerekli seçici antibiyotikleri içeren ve önceden sıcaklığı 37°C’a getirilmiş yarı katı LB besiyerine yayıldı. Gece boyu 37°C’ta inkübasyondan sonra büyüyen kolonilerden pozitif olanlar koloni PZR ile seçildi.

2.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pENTR-dTOPO-*HvBor1a*’nın aktarıldığı bakteri hücrelerini tarama amacıyla koloni PZR yapıldı. Seçici antibiyotikli besiyerinde büyüyen koloniler, steril pipet ucuyla alınıp 50 µl steril distile suda çözüldü ve PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. PZR’de kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 2.3’te; sıcaklığa bağlı döngü koşulları ise Çizelge 2.4’te verilmiştir. Tutunma sıcaklığı, kullanılan primerlerin (Çizelge 2.5) erime sıcaklığının (T_M) 2-3°C altında olacak şekilde ayarlandı. T_M değerleri ve primer tasarımı için Vector NTI® Software (Invitrogen) kullanıldı. Uzama basamağının süresi, DNA polimerazın 1 dakikada 1000 baz çifti çoğalttığından yola çıkılarak, çoğaltılacak bölgenin uzunluğuna göre belirlendi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı ve görüntülendi.

Çizelge 2.3 PZR’de kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Stok konsantrasyon	Final konsantrasyon	Hacim (µL)
Gen spesifik primer I	5 µM	0,25 µM	2,5
Gen spesifik primer II	5 µM	0,25 µM	2,5
dNTP karışımı	2,5 mM	0,2 mM	4
Tampon	10 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
Taq DNA polimeraz	5 U/µL	0,05 U/µL	0,5
DMSO	100 %	3 %	1,5
Kalıp	~5 ng/µL		2
dH ₂ O			29
Toplam			50

Çizelge 2.4 Sıcaklığa bağlı PZR döngü koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç süresi	96	3 – 8 dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	
Çoğalma	Tutunma 50 – 64	20 sn	30 – 35
	Uzama 72	1 – 3 dk	
Final uzama	72	10 dk	1

Çizelge 2.5 pENTR-dTOPO plazmidinde bulunan *HvBor1a* genini koloni PZR ile çoğaltmada kullanılan primer dizileri

Primer adı	Yön	Dizi (5'-3')
M13_F	İleri	GTAAAACGACGGCCAGT
M13_R	Geri	GGAAACAGCTATGACCATG
3HBor1a_C_ATG	İleri	ATGGATCTACTAGGGAACCCTTTCAAGG
3HBor1a_C_TGA	Geri	TCACACGCTCGGCTGAACTGCATT

2.2.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ampliconları ve aynı zamanda DNA veya RNA izolatlarının ya da nükleik asit fragmanlarının ayrıştırılmasında elektroforez kullanıldı. Agaroz jel, görüntülenecek fragman uzunluğuna bağlı olarak %1-2 (w/v) oranında ve 0,5X Tris-Asetat-EDTA (TAE) kullanılarak hazırlandı. Mikrodalgada kaynatılıp soğutulduktan sonra eklenen ve fragmanların UV altında görülmesini sağlayan etidyum bromür, final konsantrasyonu 0,4 µg/ml olacak şekilde jel solüsyonuna ilave edildi. Jele yüklenecek örneklerin, elektroforez esnasında görünür olması için 6X yükleme boyası (Fermentas) örneklerle karıştırıldı ve karışım, jel katılaştıktan sonra kuyulara yüklendi. Nükleik asit fragman boyutlarının karşılaştırılması amacıyla 50-1000 veya 250-10000 baz çiftlik belirteçler (markır) kullanıldı. Örnekler yaklaşık 5 V/cm şiddetinde elektrik akımı altında yaklaşık yarım saat yürütüldü. Jeller görüntülenme cihazında görüntülendikten sonra fotoğrafları çekildi.

2.2.1.4 Plazmid İzolasyonu

E. coli ve *A. tumefaciens* hücrelerinden plazmid izolasyonu QIAprep® Spin Miniprep Kiti (Qiagen, Katalog no:12143) kullanılarak önerilen prosedürlere göre gerçekleştirildi. Prosedür sonunda kolonda tutunan plazmid DNA'sı kite ait 30-50 µl EB (elution buffer) tamponunda (10mM Tris-HCl, pH 8,5) veya distile suda çözülerek toplandı.

2.2.1.5 Gen Dizisinin Doğrulanması

Koloni PZR ile varlığı doğrulanmış plazmidlere sahip kolonilerden izole edilen pENTR-dTOPO plazmidinde bulunan *HvBor1a* genine ait dizi, gen bitki transformasyon vektörüne aktarılmadan önce dizi analizi ile doğrulandı. Dizi analizi MCLAB firması (ABD) tarafından M13_F ve M13_R dizileme primerleri (Çizelge 2.5) kullanılarak yapıldı.

2.2.1.6 Bitki Transformasyon Vektörünün Hazırlanması

İlgili genin *in vitro* rekombinasyonuna olanak sağlayan Gateway klonlama sistemi (Invitrogen) ile *HvBor1a* geni, pENTR-dTOPO plazmidinden pIPKb004 plazmidine klonlandı. Bu reaksiyonda “giriş vektörü” olarak adlandırılan pENTR-dTOPO plazmidindeki *attL* bölgeleri ile “hedef vektör” olarak adlandırılan pIPKb004 plazmidindeki *attR* bölgeleri arasında gerçekleşen LR reaksiyonu ile rekombinasyon gerçekleştirildi. Reaksiyon için 1 µl pENTR-dTOPO plazmidi (yaklaşık 150 ng/µl), 1 µl pIPKb004 plazmidi (yaklaşık 150 ng/µl), 6 µl TE tamponu (pH 8,0) ve 2 µl LR ClonaseTM II Enzim Karışımı (Invitrogen) 0,2 ml’lik tüpte bir araya getirildi ve karışım termal döngü cihazında 25°C’te 1 saat inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak üzere karışıma 1 µl Proteinaz K solüsyonu (2 µg/µl) eklendi ve 37°C’te 10 dk inkübasyon yapıldı. Reaksiyon karışımı sonraki işlemler için buza batırıldı. LR reaksiyonunun gerçekleştiğini doğrulamak üzere LR reaksiyon ürünü, öncelikle *E. coli* kompetan hücrelerine Bölüm 2.2.1.1’de anlatılan şekilde transfer edildi. Daha sonra büyüyen koloniler ile Bölüm 2.2.1.2’de anlatılan şekilde koloni PZR yapıldı ve Çizelge 2.6’da listelenen primerler kullanıldı.

Çizelge 2.6 *E. coli*'de pIPKb004-*HvBor1a*'nın varlığını göstermede kullanılan primer dizileri

Primer adı	Yön	Dizi (5'-3')
Ed35S_P_F	İleri	TTGTAGAGAGAGACTGGTGATTTC
3H_SPM1_R	Geri	ATGGGGGAATGCCAAGCAAACCACATAG
hpt_F	İleri	CGAAAAGTTCGACAGCGTC
hpt_R	Geri	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG

2.2.1.7 Plazmidlerin *Agrobacterium*'a Aktarılması

A. tumefaciens C58C1 kompetan hücreleri, Gene Pulser® II Elektroporasyon Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak, Weigel ve Glazebrook'un (2006) protokolüne göre transforme edildi. Bunun için öncelikle, C58C1 hücreleri buza batırıldı ve 1 µg (4-8 µl) suda çözünmüş pIPKb004-*HvBor1a* plazmid içeriği, bakteriyal süspansiyona eklendi. Karışım nazıkçe karıştırıldıktan sonra buz içinde 5 dk inkübe edildi ve önceden soğutulmuş 0,1 cm'lik elektroporasyon küvetlerine (Bio-Rad) kondu. Elektroporasyon sırasında 25 µF, 2,4 kV ve 200 Ω ile 5 msn akım uygulandıktan sonra küvetlere 1'er ml sıvı YEB ortamı eklendi ve hemen ardından karışım 2 ml'lik tüpe aktarıldı. Hücreler 28°C ve 180 rpm'de 4 saat inkübe edildikten sonra 3000g'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve 100 µl besiy ortamında yeniden çözüldü. Bakteriler, seçici antibiyotiklerin bulunduğu YEB yarı katı ortamına yayıldı ve 3 gün 28°C'ta inkübe edildi. Daha sonra pozitif koloniler 2.2.1.2'de anlatılan şekilde ve Çizelge 2.7'de listelenen primerler kullanılarak koloni PZR ile seçildi. İlgili geni taşıyan plazmide sahip kolonilerden gliserol stokları hazırlandı ve bütün transformasyonunda kullanılmak üzere -80°C'ta saklandı.

Çizelge 2.7 *A. tumefaciens*'te pIPKb004-*HvBor1a*'nın varlığını göstermede kullanılan primer dizileri

Primer adı	Yön	Dizi (5'-3')
3H_SPM1_F	İleri	GGTGATTGTGTGGACAGCATTGTCATTTAC
3H_SPM1_R	Geri	ATGGGGGAATGCCAAGCAAACCACATAG
hpt_F	İleri	CGAAAAGTTCGACAGCGTC
hpt_R	Geri	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG

2.2.2 Bitki Materyalinin Hazırlanması

2.2.2.1 Tütün Bitkilerinin Mikroçoğaltımı

MS besi ortamında düzenli olarak 3 haftada bir alt kültürlenene yabani tip tütünler, transformasyon denemelerinde eksplant kaynağı olarak kullanıldı. Yaban tipi veya transgenik adayı tütünler bitki büyütme odasında büyütüldü.

2.2.2.2 Letal Higromisin Derişiminin Belirlenmesi

Agrobacterium'daki T-DNA bölgesinde higromisin fosfotransferaz (*hpt*) geni taşıyan plazmid ile transforme olmuş transgenikler higromisinin toksik etkilerine dayanabilirken; transforme olmamış, dolayısıyla bu geni taşımayan bitkiler dayanamayacaktır. Transgenik bitkilerin seçiminde higromisin direncine sahip adayları belirlemek amacıyla kullanılacak seçici besiyerinin higromisin konsantrasyonunu belirlemek üzere yabani tip tütünde letal higromisin derişimi belirlendi.

Yabani tip "Samsun" tütün yaprak eksplantları, 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/L oranında higromisin eklenen ve aynı zamanda dolaylı organogenezi sağlayacak bitki büyüme düzenleyicilerini (0,1 mg/L NAA, 1 mg/L BA) içeren MSA (Çizelge 2.2) besiyerlerine aktarıldı. Kontrol grubunun besiyerinde higromisin kullanılmadı. Her derişim için iki ayrı petride toplam 12 tane olacak şekilde besiyerlerine aktarılan

eksplantların, ilk gün ile aktarıldıktan 3 ve 6 hafta sonraki yaş ağırlıkları; steril kabin içinde hassas terazide tartıldı ve fotoğrafları çekildi. Üç hafta sonunda eksplantlar taze besiyerine alındı. 3 ve 6 hafta sonunda tartılan yaş ağırlıklar ilk günki yaş ağırlıklara oranlanarak % yaş ağırlık artışları hesaplandı.

2.2.2.3 Letal Bor Derişiminin Belirlenmesi

Transgeniklerde bor toleransının doğrulanması amacıyla uygulanacak letal bor derişimi belirlendi. Yabani tip “Samsun” tütün yapraklarına ait eksplantlar, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 ve 20 mM olmak üzere yedi farklı derişimde H_3BO_3 eklenen MSA (Çizelge 2.2) besiyerine transfer edildi. Her derişim için iki ayrı petride toplam 12 tane olacak şekilde besiyerlerine aktarılan eksplantların, ilk gün ile aktarıldıktan 3 ve 6 hafta sonraki yaş ağırlıkları; steril kabin içinde hassas terazide tartıldı ve fotoğrafları çekildi. Üç hafta sonunda eksplantlar taze besiyerine alındı. 3 ve 6 hafta sonunda tartılan yaş ağırlıklar ilk günki yaş ağırlıklara oranlanarak % yaş ağırlık artışları hesaplandı.

2.2.3 Tütün Bitkilerinde Yaprak Diski Transformasyonu

Yaprak diski transformasyonu tütün için kullanılan infiltrasyon bazlı bir transformasyon yönteminden uyarlandı (Sparkes ve ark., 2006). İlgili gene sahip plazmidi taşıyan *Agrobacterium* C58C1 soyu gece boyu YEB sıvı besiyerinde 180 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Kültürün OD_{600} değeri 0,6’ya ulaştığında bakteriler 3000g’de 10 dk oda sıcaklığında çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp pelet 20 ml MS ile çözüldü. Örnekler 3000g’de 10 dk oda sıcaklığında tekrar santrifüj edildikten sonra örneklerin süpernatantları atıldı ve kalan bakteri peleti 25 ml infiltrasyon ortamı (Çizelge 2.8) ile çözüldü.

Çizelge 2.8 İnfiltrasyon ortamı için kullanılan bileşenler.

Kimyasal	Stok derişimi	Hacim (mL)
D-Glukoz	50 g/L	10
MES	500 mM	10
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	20 mM	10
Asetoşiringon	1 M	0,01
d H ₂ O		değişken
Toplam		100

Orta damarları ve kenarları MS içinde kesilen yaprakların yüzeyindeki mumsu tabaka bir bistüri ucu ile hafifçe uzaklaştırıldı ve yapraklar 1-2 cm²'lik parçalara (yaprak diski) bölündü. Kontrol grubu eksplantlar bakteri içermeyen infiltrasyon ortamı ile; transforme edilecek eksplantlar, *Agrobacterium* içeren infiltrasyon ortamı ile hafifçe çalkalanarak, 20 dk oda sıcaklığında muamele edildi. Steril filtre kağıdı ile sıvı fazlası alınan eksplantlar, yüzeyleri besiyerine degecek şekilde MSA'ya aktarıldı ve 3 gün karanlıkta tutuldu (birlikte-kültürleme). Üç gün sonrasında yaprak diskleri, *Agrobacterium* eliminasyonunu ve dolaylı organogenezi sağlayacak olan seçici MSB besiyerine alındı (Çizelge 2.2).

2.2.4 Aday Transgenik Tütün Bitkilerin Seçilimi

Transformasyon ve *Agrobacterium* ile birlikte-kültürlenme safhası sonrası seçici MSB besiyerinde kültürlenmiş yaprak disklerinden yaklaşık 3 hafta sonunda kallus oluşumu, 5-6 hafta sonra ise mikro gövdelerin oluşumu gözlemlendi. Yeterince büyüyen mikrogövdeler, kalluslara tutunma bölgelerinden kesilerek bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen, seçici MSC besiyerine (Çizelge 2.2) alındı. Bu besiyerinde büyüyen ve köklenen transgenik adayı gövdeler en az 2 kez daha aynı besiyerinde alt kültürlendi. İlerideki moleküler analizler için kesilen yaprak örnekleri alüminyum folyo içinde – 80°C'ta muhafaza edildi.

2.2.5 Aday Transgenik Tütün Bitkilerinin Moleküler Analizi

Aday transgenik bitkilerde *HvBor1a* geninin varlığını doğrulamak amacıyla – 80°C’te korunan yapraklardan genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonu ve PZR yapıldı. Bu bitkilerde ilgili genin eksprese olup olmadığının anlaşılması için ise yapraklardan total RNA ekstraksiyonu ve ters transkriptaz-PZR (RT-PZR) gerçekleştirildi.

2.2.5.1 Kullanılan Malzemelerin Dekontaminasyonu

Yapraklardan DNA izole etmek üzere kullanılan tüm solüsyonlar, cam ve plastik malzemeler DNaz’ların etkisini uzaklaştırmak amacıyla 121°C’te 20 dk otoklavlandı. RNA çalışmaları için tüm solüsyonlar %0,1 DEPC (Dietilprokarbonat) içeren distile su ile hazırlandı. İzolasyon için gerekli malzemeler gece boyu DEPC’li su ile muamele edildikten sonra 121°C’te 20 dk otoklavlandı. Ayrıca izolasyondan önce deney yapılan ortam, eldiven ve malzemeler RNaseZAP ile temizlendi.

2.2.5.2 “Samsun” ve “Petit havana” Yapraklarından DNA Ekstraksiyonu

Transgenik aday bitki yapraklarından gDNA izolasyonu setil trimetilamonyum bromid (CTAB) kullanılarak, Murray ve Thompson (1980)’un yöntemine göre yapıldı. Derin dondurucudan alınan yapraklar havan içinde sıvı azot yardımı ile ezildi ve toz hale getirilmiş örnekler önceden soğutulmuş ependorf tüplere toplandı. Örneklerin üzerine 1’er ml önceden ısıtılmış ekstraksiyon tamponu (100mM Tris-HCl [pH 8,0], 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, %0,2 (v/v) β -merkaptoetanol ve %2 (w/v) CTAB) eklendi ve karışım vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Materyal tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 mg/ml RNaz (Fermantas) eklendi ve karışım 65°C’te, sirkülasyonlu su banyosunda 45 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra materyal 4°C’te 10000g’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve alınan süpernatant ile eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1, v/v) tüpe eklendi. Yüksek hızda vortex ile karıştırılan materyal, 4°C ve 10000g’de 10 dk santrifüj edildi. Karışım, santrifüj sonrasında en üstte DNA olacak şekilde 3 faza ayrıldı. En üstteki su bazlı DNA fazı yeni bir tüpe alındı ve eşit hacimde önceden soğutulmuş izopropanol tüpe eklenerek DNA çöktürüldü. Tüpler birkaç kez nazikçe

alt üst edildikten sonra -20°C 'ta en az 30 dk bekletildi. Dondurucudan alınan örneklerin 4°C ve $5000g$ 'de 5 dk santrifüj edilmesi ile DNA'lar tüplerin dibinde pelet halinde toplandı ve daha sonra süpernatantlar atıldı. DNA peletleri, 1 ml %70 (v/v) etanol ile yıkandı. Etanolün uzaklaştırılması için son santrifüj basamağı aynen tekrarlandı. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra DNA peletleri steril kabinde hava akımı ile kurutuldu. DNA peletleri 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) ve 1 mM EDTA içeren TE tamponunda çözüldükten sonra -20°C 'ta saklandı.

2.2.5.3 DNA Miktar Tayini

Aday transgenik bitkilerden izole edilen gDNA'ların derişimi mikro hacimli bir spektrofotometre olan NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) ile ölçüldü. Çift zincirli DNA için 260 nm'de 1 absorbansa karşılık gelen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon hesabı DNA miktar tayini için kullanıldı. Bunun dışında, 260/280 nm oranı DNA saflığını belirlemek için kaydedildi. İdeal saflık oranı yaklaşık 2,0 olarak tespit edilen DNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

2.2.5.4 “Samsun” ve “Petit havana” Yapraklarından Total RNA Ekstraksiyonu

RNA izolasyonu sırasında kullanılacak olan havan ve tokmaklar sıvı azot ile soğutuldu. Bu havanlar ve sıvı azot ile iyice öğütülen tütün yaprak örnekleri önceden soğutulan 2 ml'lik tüplere yarısı dolacak şekilde aktarıldı ve örnekler 1'er ml TRIzol (Invitrogen) solüsyonu eklendi. Daha sonra tüpler 15 dk vortekslendi. Vorteks sonrasında tüpler oda sıcaklığında $21000g$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantların yaklaşık 900 μl 'lik kısmı yeni tüplere aktarılıp, üzerlerine 180 μl kloroform eklendi. Karışım oda sıcaklığında 3 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüpler 4°C ve $21000g$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Bu santrifüj sonucu üstte oluşan ve RNA içeren su bazlı fazın 400 μl 'lik kısmı yeni bir tüpe alındı. Süpernatantlara 200 μl kloroform eklenerek, karışımlar tekrar 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve daha sonra $21000g$ ve oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Bu işlemten sonra oluşan üst fazdan 400 μl dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarılıp, üzerine aynı miktarda izopropanol eklendi. Tüpler özenle birkaç kez karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüpler oda sıcaklığında $21000g$ 'de 10 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatantlar atıldı. RNA peletleri %75

etanol ile yıkanıp, 3 dk oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyondan sonra karışımlar oda sıcaklığında 21000g'de 5 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası etanol atıldı. Kalan etanolü uzaklaştırmak üzere 15 sn'lik ek bir santrifüj yapıldı ve steril kabin içinde tüplerin ağızları açılarak hava akımı ile etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Daha sonra RNA peletlerine 50 µl DEPC'li su eklenerek total RNA solüsyon içine alındı.

2.2.5.5 Total RNA'lara DNaz ve NaOAc Uygulaması

İzole edilen total RNA örneklerinden DNA kontaminasyonu, DNaz I (Fermentas) enzimi kullanılarak uzaklaştırıldı. Bunun için, total hacim 10 µl olacak şekilde, yaklaşık 1 µg total RNA, 1 µl 10X reaksiyon tamponu (MgCl₂ içeren), 1 U DNaz I enzimi ve 10 µl'ye tamamlayacak şekilde DEPC'li su kullanıldı. Karışım 37°C'ta 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için tüplere 1 µl EDTA eklenip 65°C'ta inkübasyon yapıldı.

DNaz uygulaması sonrası, enzim ve kimyasalları uzaklaştırmak ve RNA'ları daha konsantre hale getirmek için etanol-sodyum asetat çöktürmesi yapıldı. Bunun için, 3M sodyum asetat (pH 5,2), final konsantrasyonu 0,3M olacak şekilde DNaz uygulanan örnekler eklendi. Sonrasında, total hacmin 3 katı kadar absöüt etanol eklenip, karışımlar – 20°C'ta tüm gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler 4°C ve 21000g hızında 30 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldıktan sonra peletler, iki kez %80'lik etanolde yıkandı ve her bir yıkama sonrası etanolü uzaklaştırmak için 4°C ve 21000g hızında 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar tamamen uzaklaştırıldıktan sonra RNA peletleri DEPC'li dH₂O ile çözüldü.

2.2.5.6 Total RNA Miktarının Tayini

İzole edilen RNA'ların derişimleri NanoDrop 1000 cihazı ile belirlendi. Tek zincirli RNA için 260 nm'de 1 absorbansa karşılık gelen 40 µg/ml konsantrasyon hesabı RNA miktar tayini için kullanıldı. Bunun dışında, 260/280 nm oranı RNA saflığını belirlemek için kaydedildi. İdeal saflık oranı yaklaşık 2,0 olarak tespit edilen RNA'ların bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile gösterildi.

2.2.5.7 Total RNA'dan Tek Zincir cDNA Sentezi

Bu çalışmada RT-PZR öncesi tek zincir cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezi için QuantiTect Ters Transkripsiyon Kiti (Qiagen) kullanıldı. Buna göre, ters transkripsiyon reaksiyonu öncesi gDNA'ları uzaklaştırmak için 1 µg total RNA, 2 µl gDNA Wipeout tamponu ve 14 µl'ye tamamlamak için RNaz içermeyen su kullanıldı. Reaksiyon karışımı 42°C'ta 2 dk inkübe edildikten sonra buza alınarak ters transkripsiyon reaksiyonu için hazır hale getirildi. Total hacmi 14 µl olan ve içerisinde 1 µg RNA içeren tüplere, 1 µl RT enzimi, 4 µl 5X RT tamponu ve 1 µl RT primer karışımı eklendi. Total hacmi 20 µl olan örnekler, 42°C'ta 15 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonrası RT enzimini inaktive etmek için örnekler 3 dk boyunca 95°C'ta bekletildi. Elde edilen tek zincirli cDNA örnekleri PZR'de kullanılmak üzere -20°C'ta saklandı.

2.2.5.8 Aday Transgenik Bitkilerde PZR Analizleri

Aday transgenik bitkilerin ilgili gen (*HvBor1a*) ile antibiyotik direnç genini (*hpt*) taşıdıkları ve bu genlerin bitkilerdeki ekspresyonu, sırasıyla PZR ve RT-PZR yöntemleri ile doğrulandı. Tütün bitki yapraklarından izole edilen DNA örnekleri ve RNA'lardan ters transkriptaz enzimi ile elde edilen tek zincirli cDNA örnekleri PZR ve RT-PZR yöntemlerinde kalıp olarak kullanıldı. PZR ve RT-PZR gen spesifik ve seçici antibiyotik direnç geni primerleri (Çizelge 2.9, Çizelge 2.10) kullanılarak 2.2.1.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 2.9 Transgenik adayı tütünlerde *HvBor1a* geninin varlığını PZR ile belirlemede kullanılan primerler.

Primer adı	Yön	Dizi (5'-3')
3HBor1a_C_ATG	İleri	ATGGATCTACTAGGGAACCCCTTTCAAGG
3H_SPM1_R	Geri	ATGGGGGAATGCCAAGCAAACCACATAG
hpt_F	İleri	CGAAAAGTTTCGACAGCGTC
hpt_R	Geri	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG

Çizelge 2.10 Transgenik adayı tütünlerde *HvBor1a* geninin ekspresyonunu RT-PZR ile belirlemede kullanılan primerler.

Primer adı	Yön	Dizi (5'-3')
3HBor1a_GSP4_F	İleri	ATAACATGGATACCAGTAGCACATTGCTG
3HBor1a_GSP4_R	Geri	ATCCAGTTCTCGCAAGTCATTGGG
hpt_F	İleri	CGAAAAGTTTCGACAGCGTC
hpt_R	Geri	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG

2.2.6 Transgenik Tütünlerin Toprağa Aktarılması

Seçici antibiyotik içeren MSC besiyerinde en az 3 kez alt kültürlenmiş transgenik adayı tütünlerden kökleri güçlenen ve gövdeleri yeterince büyüyen bitkiler, bulundukları kavanozlardan toprağa aktarıldı. Gerekli nemi oluşturmak ve iklimlendirmeyi sağlamak üzere bitkilerin üzerleri naylon ile örtüldü. Gelişimine devam eden tütünlerde çiçek gelişimi görüldüğünde, çapraz tozlaşmayı engellemek amacıyla çiçekler kağıt ile örtüldü.

2.2.7 Seçici Ajan ve Bor Uygulamaları

2.2.7.1 Transgenik Adayı Tütün Yapraklarının Yüzey Sterilizasyonu

Transgenik adayı tütünlerde rejenerasyon kapasiteleri yaprak disklerine uygulanan higromisin ve bor toksisitesi altında incelendi. Seçici antibiyotik ve bor uygulaması yapılacak tütün yapraklarının yüzey sterilizasyonu, 6 dk %1'lik sodyum hipoklorit uygulaması ile yapıldı. Sonrasında yapraklar dörder kez steril distile su ile durulandı ve filtre kağıdında kurutuldu. Yapraklar 1-2 cm²'lik parçalara bölündü ve elde edilen yaprak diskleri yabani tip tütünlerde belirlenen letal antibiyotik (30 ve 50 mg/L higromisin) ve bor (10 ve 20 mM H₃BO₃) konsantrasyonuna sahip besiyerlerine aktarıldı.

2.2.7.2 Tütün Yapraklarından Rejenerasyon Analizi

Transgenik adayı tütün eksplantlarının, letal higromisin ve bor konsantrasyonuna sahip besiyerine aktarıldığı andaki ve aktarıldıktan 3 hafta sonraki yaş ağırlıkları, steril kabin içinde hassas terazi ile tartıldı. Her bir petride 6 eksplant olacak şekilde ikişer petriye aktarılan ve 12 eksplanttan üçünün kontrol olarak yabani tip tütüne ait olduğu yaprak disklerinin besiyerlerine aktarıldığı an ve üçüncü hafta sonundaki rejenerasyonu çekilen fotoğraflarla kaydedildi. Buna göre bir aday için toplam yaklaşık 45 tane eksplantın, yabani tip tütün yapraklarına ait 15 eksplant ile beraber tartılan yaş ağırlıklarının grafikleri oluşturuldu.

2.2.8 T1 Transgenik Bitkilerin Eldesi

Transgenik adayı tütünlerin toprağa aktarılmasından yaklaşık 2 ay sonra, aday transgeniklerin bir kısmında tohum kapsülü oluştu ve kapsüller tamamen kurduğunda tütün tohumları (T1) toplandı. Tohumların yüzey sterilizasyonu, 20 dk süreyle %30'luk sodyum hipoklorit kullanılarak yapıldı. Daha sonra üç kez steril dH₂O ile durulanan steril tohumlar, 1 gece karanlıkta 4°C'ta tutulduktan sonra çimlenme için yarı katı MS besi ortamına aktarıldı.

2.2.9 T1 Transgenik Bitki Analizleri

2.2.9.1 Borik Asit ve Seçici Ajanda Çimlenme Testleri

Transgenik adayı (T0) tütünlerden elde edilen tohumlardan (T1) yaklaşık yüzer tanesi seçici antibiyotik ve toksik seviyede borik asit içeren MS besi ortamlarına aktarıldı. Yaklaşık 3 hafta sonunda çimlenen tohumlar sayıldı ve Mendel kalıtım testi yapılmak üzere Chi-Square analizleri gerçekleştirildi.

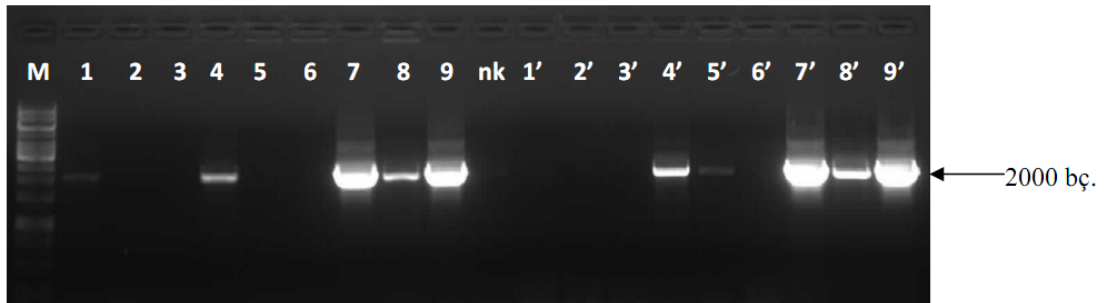
2.2.10. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada deneyler tamamıyla rast gele bitki örnekleri seçilerek yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılıkları belirlemek üzere SPSS istatistik programı kullanılmıştır. Verilerin değişkenliği ve sonuçların geçerliliğinin doğrulanması, varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca uygulamalar arası farklılıkları belirlemek için anlamlı en az farklılık testi (LSD) $p < 0,05$ olacak şekilde uygulanmıştır.

3 BULGULAR

3.1 *HvBor1a* Geninin Doğrulanması ve Bitki Transformasyon Vektörünün Hazırlanması

Tütün bitkisine aktarılacak olan *HvBor1a* genini taşıyan pENTR-dTOPO plazmid, *E. coli* TOP10 hücrelerine transfer edildikten sonra plazmid ve genin varlığı koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı. Bunun için koloniler seçici antibiyotik olarak 50 mg/L kanamisin eklenmiş LB'de büyütüldü. PZR'de birinci primer çifti olarak genin dışında ve 5' ucuna yakın bir bölgeye bağlanan M13F (ileri) ile genin 3' ucuna bağlanan 3HBor1a_C_TGA (geri); ikinci primer çifti olarak ise genin 5' ucuna bağlanan 3HBor1a_C_ATG (ileri) ile genin dışında ve 3' ucuna yakın bir bölgeye bağlanan M13R (geri) primerleri kullanıldı. Şekil 3.1, seçici besiyerinde büyüyen 9 koloni ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektrofez sonuçlarını göstermektedir. Her iki primer çifti ile yapılan PZR sonucunda beklenen yaklaşık 2000 baz çifti (bç) büyüklüğündeki bantlar dört, yedi, sekiz ve dokuzuncu kolonilerde görülmektedir. Bu koloniler arasından yedinci koloni sonraki klonlama işlemleri için seçildi. PZR sonrası pozitif sonuç veren yedinci koloniden izole edilen plazmidlerin dizi analizi, dizileme primerleri olan M13_F ve M13_R ile yapıldı ve plazmid içerisindeki *HvBor1a* geninin dizisi doğrulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.1 pENTR-dTOPO plazmidinde bulunan *HvBor1a* geninin koloni PZR sonucu. M: Markır, 1-9: birinci primer çifti ile elde edilen amplikonlar, nk: Negatif Kontrol, 1'-9': ikinci primer çifti ile elde edilen amplikonlar.

```

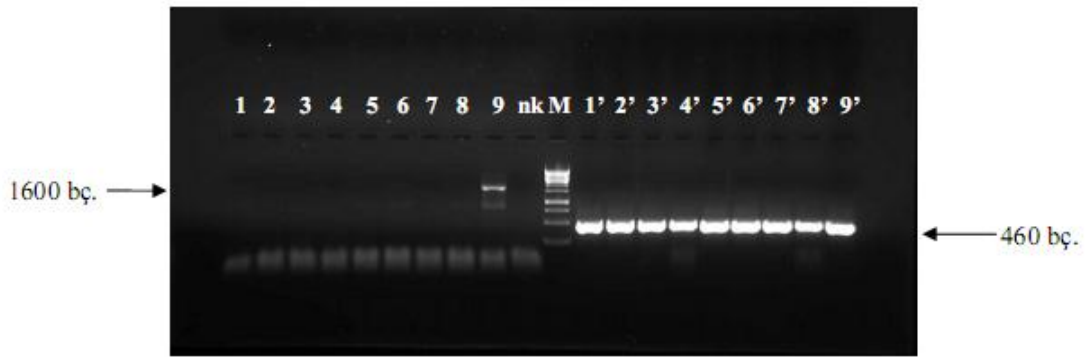
1      tgagcaatgc  ttttttataa  tgccaacttt  gtacaaaaaa  gcaggctccg
cgggcgcccc  cttcaccATG  GATCTACTAG  GGAACCCTTT  CAAGGGAGTC
101     GTCGCGGATG  TCAAAGGGAG  AGCATCTTGG  TACAAGGACG  ATTGGGTGTC
AGGGCTCCGA  ACTGGCTTCA  GGATATTGGC  ACCTACCATG  TATATTTTCT
201     TTGCCTCTGC  ACTCCCTGTA  ATCTCCTTCG  GAGAGCAGCT  GAGCAACGAA
ACAGATGGTA  TCGTAAGCAC  TGTGAAACT  TTGGCGTCTA  CGGCGATATG
301     TGGGATAATA  CACTCGATTC  TTGGAGGGCA  GCCACTGTTG  ATCGTTGGAG
TCGCAGAACC  TACTATTATC  ATGTATACGT  ATCTCTACAA  GTTGCCAAG
401     AAGCAGCCAG  ATCTGGGAGA  ACGGCTATAT  TTGGCTTGGG  CTGGATGGGT
CTGCATTGG  ACTGCTATCA  TGCTGTTTCT  TTTGGCAATG  TTCAATGCTT
501     CCAATGTTAT  AAGCAGATTC  ACGAGGGTTG  CAGGAGAGCT  TTTTGGTATG
TTGATCACTG  TCCTGTTCT  GCAGCAAGCT  ATCAAGGGAA  TTGTAAGTGA
601     GTTCAGTGTG  CCGAAAGATG  ATGAGATTTC  TGACCCAGC  TCACCTATAT
ACCAGTTCCA  GTGGATTTAT  GTCAATGGCC  TACTTGGTGT  TATATTTTCC
701     ATTGGCTTGC  TGTACACTGC  ACTGAAGACT  AGGCGTGCAA  GGTCATGGCT
GTATGGCGTA  GGATGGCTTA  GAAGCTTCAT  TGCCGATTAC  GGTGTACCGC
801     TGATGGTGAT  TGTGTGGACA  GCATTGTCAT  TTACACTACC  AAGCAAAGTC
CCTTCAGGAG  TGCCTAGGAG  GCTCTTCAGT  CCACTTCCCT  GGGAGTCAAT
901     CTCACTGAGA  CATTGGACCG  TAGCAAAGGA  TTTGTTTCT  GTCCCTCCAA
CATATATATT  TGCAGCCATC  GTGCCTGCTT  TGATGGTCGC  AGGACTTTAT
1001    TTCTTTGACC  ACAGTGTAGC  TTCACAGTTG  GCTCAGCAGA  AGGAGTTTAA
TTTGAAGAAG  GCTTCTGCCT  ACCATTATGA  CATTTTGGTA  CTTGGATTCA
1101    TGGTCCTACT  ATGTGGTTTG  CTTGGCATT  CCCCATCAAA  TGGAGTACTT
CCTCAGTCCC  CCATGCATAC  AAGAAGCCTT  GCTGTCTCTA  AGGGGCAGCT
1201    GCTACGCAGA  AAGATGCTTC  AAAGTCCAA  AGAGGGCAGT  TCAAACCGTG
CGAGCAGTTT  GGAAATCTAT  GGCAAGATGC  AGGAAGTGTT  CATCCAAATG
1301    GATAGCAACC  AGAATGCTAA  TTCTGTGAC  AAGGACTTGA  AGAGCTTGAA
GGATGCTGTG  CTGCGGGAAG  GTGACGAAGA  AGGGAATTG  GCTGGAGAAT
1401    TTGATCCTAG  CAAACACATT  GAAGCACATT  TGCCTGTTTC  TGTGAACGAA
CAGAGGCTAA  GCAACCTGCT  GCAATCCTTA  CTTGTTGGTG  GCTGTGTTGG
1501    AGCTATGCCG  GCTATCAAGA  TGATACCGAC  TTCGGTCTCT  TGGGGTTACT
TTGCCTACAT  GGCCATTGAT  AGCCTACCTG  GGAACCAGTT  TTGGGAAAGG
1601    TTACAGCTTC  TGTGCATTGG  AGCAAGCCGA  CGCTACAAGG  TCTTGAAGG
CCCCCATGCA  TCTTTCGTGG  AGGCGGTGCC  TTCAAGAACA  ATATCTGCCT
1701    TTACGGTCTT  CCAGTTTGTG  TATCTCTTGA  TATGCTTCGG  TATAACATGG
ATACCAGTAG  CAGGGATCCT  CTTCCCGCTG  CCTTCTTCTA  TTATGATTCT
1801    CATCAGGCAA  CACCTACTCC  CAAAGTTCTT  TGAGCCCAAT  GACTTGCGAG
AACTGGATGC  AGCTGAGTAT  GAAGAACTTG  AAGGCGTCCC  ACATGAACAA
1901    AACTGGAGG  AAGATGGCTC  AAATTCAGGA  AGCCATGACA  GCATAGACGA
CGTGAAATG  TTGGATGAAC  TCACGACAAA  CCGTGGAGAG  CTGAAGCACA
2001    GATCTGCAAG  CCATCCTGAA  GAAAGGCACC  TTCAGGTCCA  TTCAAATGCA
GTTTCAGCCGA  GCGTGTGAaa  ggggtgggccc  gccgacccag  ctttcttgta
2101    caaagtggc  attataagaa  agcattgctt  atcaatttgt  tgcaacgaac

```

Şekil 3.2 *HvBor1a* gen dizisi. pENTR-dTOPO plazmidine ait dizi küçük harflerle, *HvBor1a* genine ait dizi ise büyük harflerle ve altı çizili olarak gösterilmiştir. Başlangıç ve bitiş kodonları vurgulanmıştır.

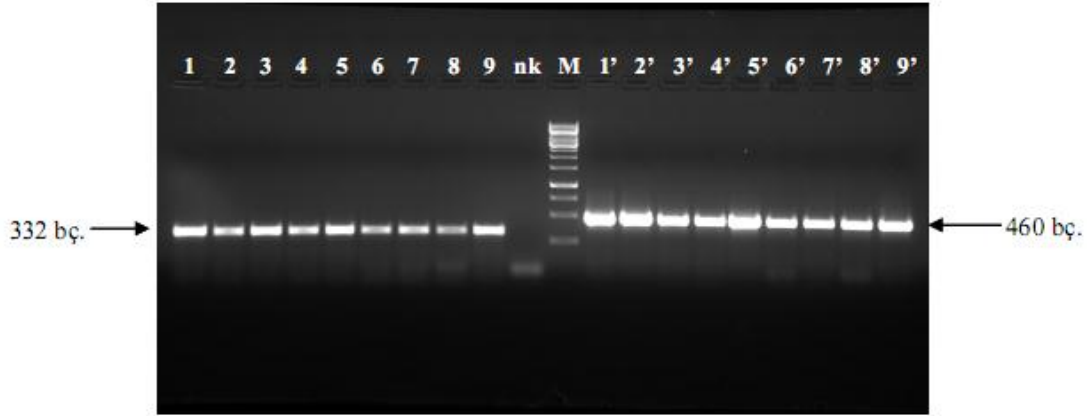
HvBor1a geni, LR reaksiyonu ile pENTR-dTOPO plazmidinden ekspresyon vektörü olan pIPKb004 plazmidine klonlandı. Daha sonra pIPKb004 plazmidini *E. coli*'ye aktarıldı ve bakteriler 100mg/L spektinomisin içeren yarı katı LB besiyerine yayıldı. LR reaksiyonunun başarılı olup olmadığının anlaşılması için koloni PZR yapıldı. Bunun için, birinci primer çifti olarak CaMV35S promotoruna bağlanan Ed35S_P ile gene bağlanan 3H_SPM1 ve ikinci primer çifti olarak ise *hpt* bölgesini

çoğaltan primerler kullanıldı. Jelin ilk 9 kuyusuna birinci primer çifti ile çoğaltılan ve yaklaşık 1600 bç'lik bant beklenen PZR ürünü yüklendi. Sonraki kuyulara sırasıyla negatif kontrol, markır ve 460 bç'lik bant vermesi beklenen ikinci primer çiftine ait örnekler yüklendi. Buna göre *hpt* tüm örneklerde çoğalırken; *HvBor1a* geni ile ilgili bölgenin tek bir örnekte çoğaldığı görüldü (Şekil 3.3). Daha sonra bütün transformasyonunda kullanılacak *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 suşuna bu örneğin ait olduğu 9. koloniden izole edilen plazmit aktarıldı.



Şekil 3.3 LR reaksiyonu sonrasında pIPKb004 plazmidine aktarılan *HvBor1a* geninin koloni PZR sonucu. M: Markır, 1-9: Birinci primer çifti ile çoğaltılan *HvBor1a* amplikonu, nk: Negatif Kontrol, 1'-9': İkinci primer çifti ile çoğaltılan *hpt* amplikonu.

Elektroporasyon sonrası 100mg/L derişimlerde rifampisin, ampisilin ve spektinomisin içeren LB'de büyütülmüş *Agro*-kolonileri ile yapılan koloni PZR'de birinci primer çifti olarak 332 bç'lik amplikon vermesi gereken 3H_SPM1_F ileri ve 3H_SPM1_R geri primerleri; ikinci primer çifti olarak ise *hpt* primerleri kullanıldı. Beklenen bantlar, tüm PZR ürünlerinde görüldü (Şekil 3.4). Dolayısı ile *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 suşunda *HvBor1a* genini taşıyan pIPKb004 ekspresyon vektörünün varlığı gösterildi. Seçilen koloni, bitki transformasyonu için çoğaltılıp gliserolde -80 °C'ta saklandı.

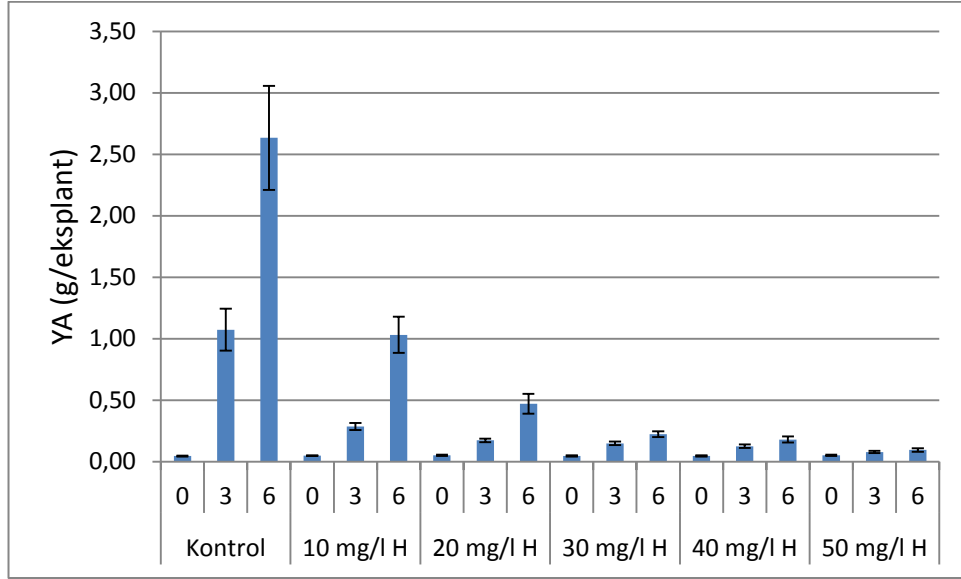


Şekil 3.4 pIPKb004-*HvBor1a*'nın *Agrobacterium*'a transferi sonrasında yapılan koloni PZR sonucu. M: Markır, 1-9: Birinci primer çifti ile çoğaltılan *HvBor1a* amplikonu, nk: Negatif Kontrol, 1'-9': İkinci primer çifti ile çoğaltılan *hpt* amplikonu.

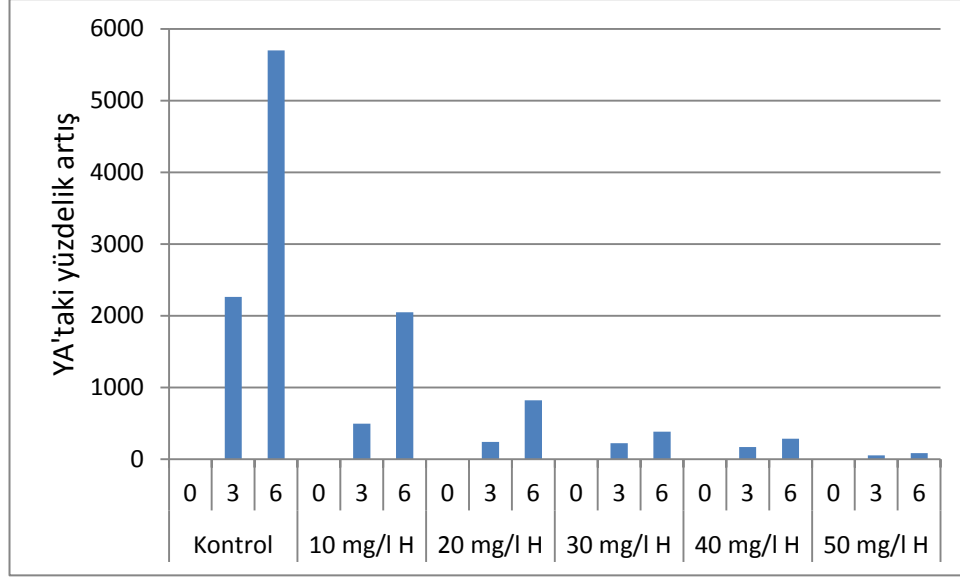
3.2 Letal Higromisin Derişiminin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bitki transformasyon vektörünün *hpt* seçici genine sahip olmasından dolayı transformantların seçimi için yabani tip “Samsun” tütün eksplantları üzerinde öldürücü etkiye sahip optimum higromisin (H) derişimi belirlendi. Bunun için 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/L H derişimlerine sahip besi yerlerine aktarılan yaprak eksplantlarının aktarıldıkları ilk günkü yaş ağırlıkları ile 3 ve 6 hafta sonraki ağırlıkları ölçüldü (Şekil 3.5). Bunun yanı sıra, farklı H konsantrasyonu uygulamaları altında ağırlık ölçümleri kullanılarak, ilk günkü yaş ağırlığa göre üçüncü ve altıncı haftadaki ağırlık artışı oranları hesaplandı (Şekil 3.6). Uygulanan en düşük derişimler olan 10 ve 20 mg/L H, eksplantların yaş ağırlıklarındaki derişimlerin 3 hafta sonunda bile, kontrol eksplantlarına göre anlamlı derecede düşük olmasına neden olmuştur. Ancak bu derişimler, sınırlı olsa da kallus oluşumu ve gövde rejenerasyonunu engellememiştir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Diğer yandan 30 mg/L H derişiminden itibaren ağırlık artışının çok düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca 40 ve 50 mg/L H uygulamaları sonrasında ise üçüncü haftadan itibaren eksplantların tamamen öldüğü ve altıncı haftanın sonunda hemen hemen hiç ağırlık artışı olmadığı görülmüştür (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Sonuç olarak 30 mg/L H'nin, eksplantları zaman içinde öldürmeye yettiği, eksplantlardan kallus oluşmadığı ve

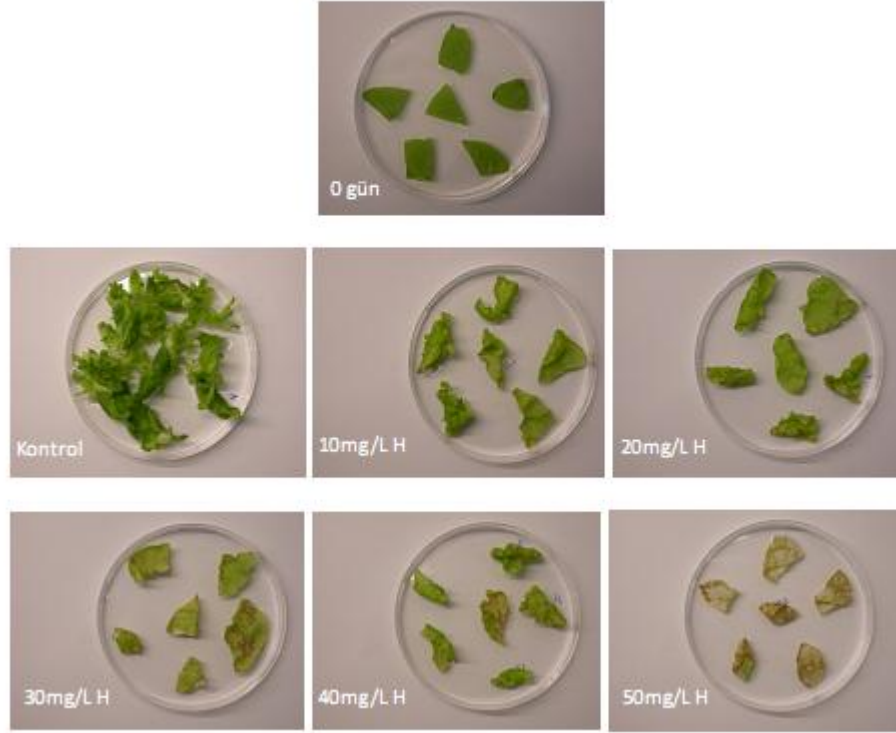
rejenerasyonun engellendiği görülmüştür (Şekil 3.7). Bu nedenle, yabani tip tütün eksplantları için letal higromisin miktarının 30 mg/L olduğu belirlendi.



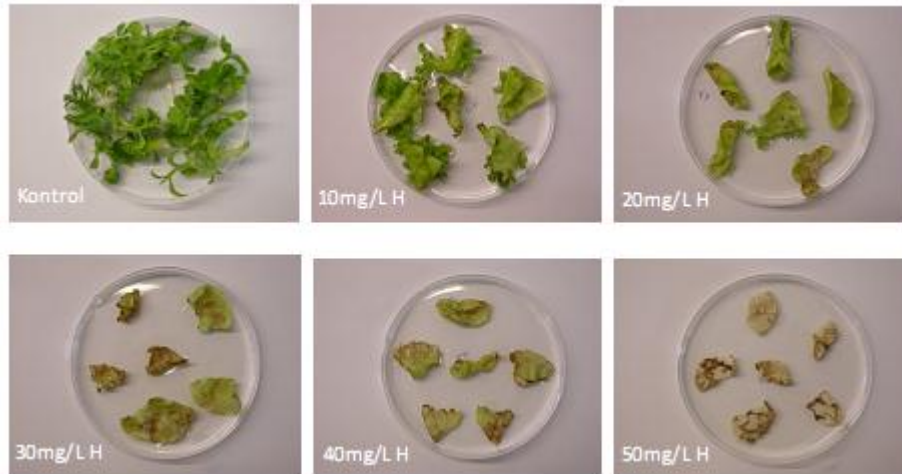
Şekil 3.5 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında higromisin (H) uygulamaları altında zamana bağlı yaş ağırlık (YA) değişimi. 0: İlk gün, 3: Üç hafta sonrası, 6: Altı hafta sonrası. Ortalama $\pm$ standart hata, n=9 ($p<0.05$).



Şekil 3.6 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında higromisin (H) uygulamaları altında yaş ağırlıktaki (YA) zamana bağlı artış yüzdesi. 0: İlk gün, 3: Üç hafta sonrası, 6: Altı hafta sonrası.



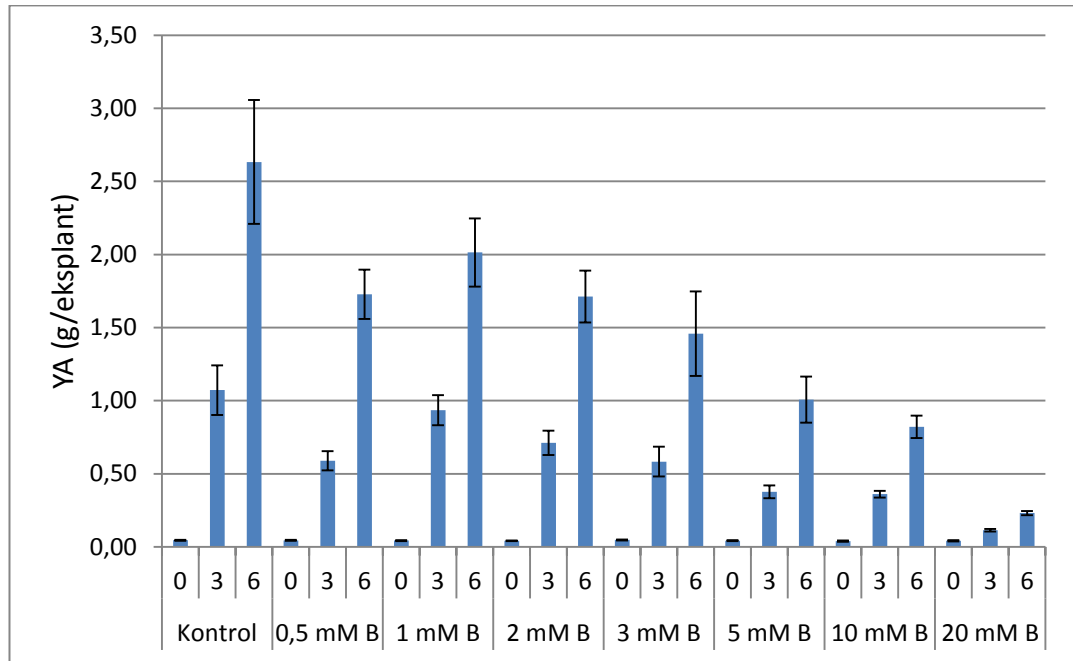
Şekil 3.7 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında 0-50 mg/L higromisin (H) uygulamasının 3 haftalık etkileri. En üst panel (0 gün), besiyerlerine yerleştirildikleri ilk günde eksplantları göstermektedir.



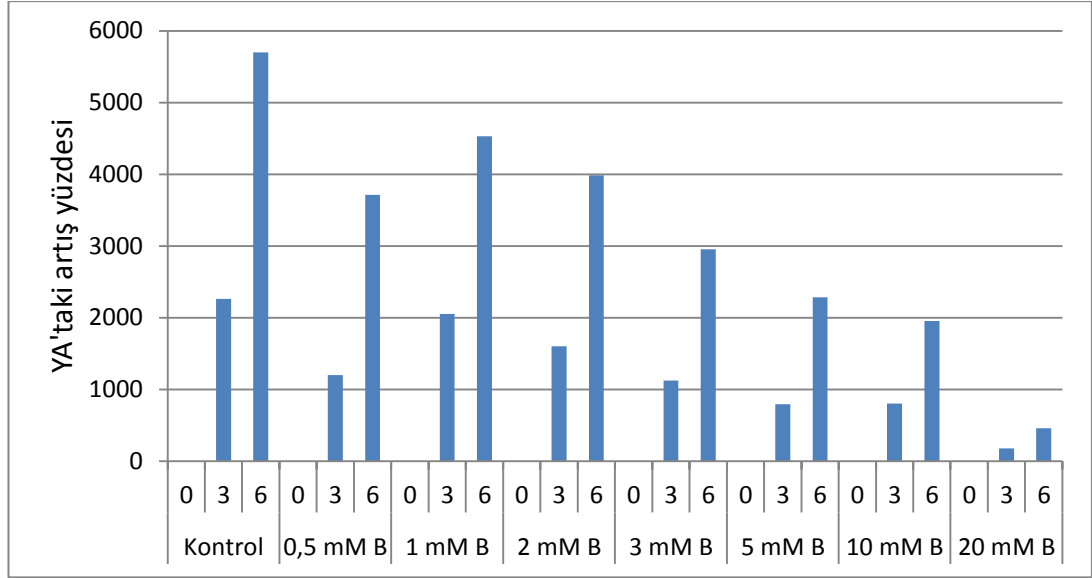
Şekil 3.8 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında 0-50 mg/L higromisin (H) uygulamasının 6 haftalık etkileri.

3.3 Letal Bor Derişiminin Belirlenmesi

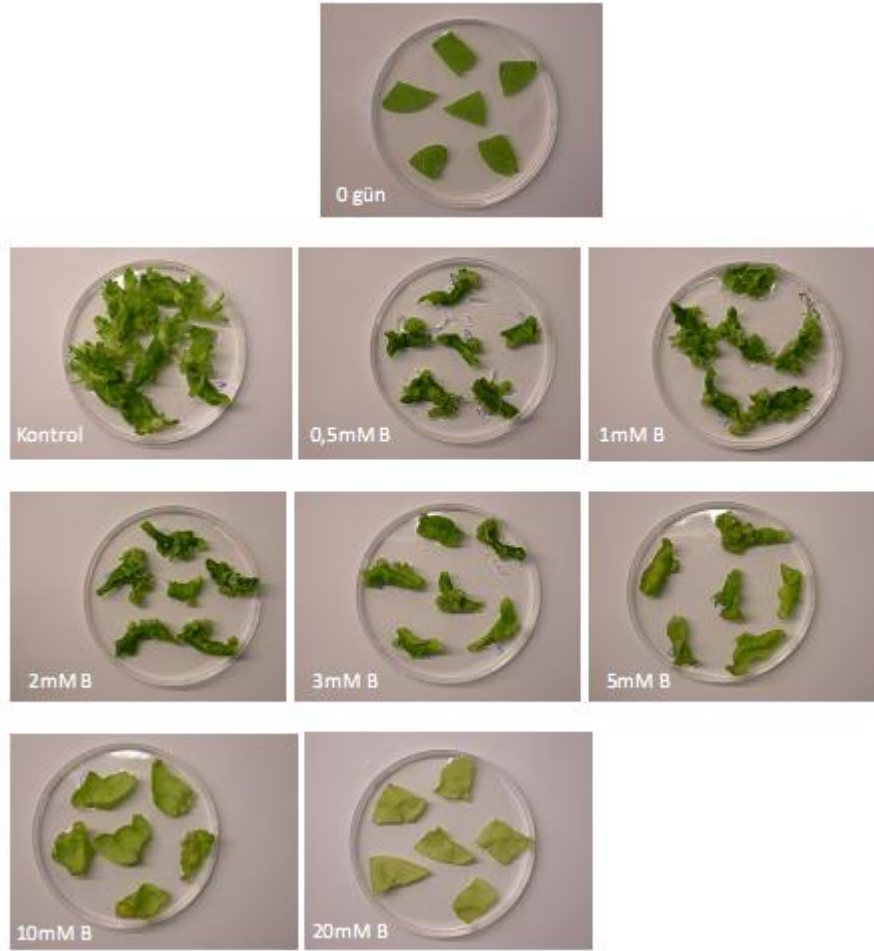
Bor taşıyıcısı olduğu düşünölen *HvBor1a* geninin aktarılacğı tütün bitkilerinde, bor toleransının belirlenmesi amacıyla yabancı tip “Samsun” tütün eksplantlarına 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 ve 20 mM olmak üzere farklı H_3BO_3 (B) derişimleri 3 ile 6 hafta boyunca uygulandı. Buna göre, 0.5, 1, 2 ve 3 mM B uygulamaları sonrasında tütün eksplantlarının yaş ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlemlenirken; 5 ve 10 mM B uygulamasını takiben tütün eksplantlarının yaş ağırlıklarındaki artışın diğör düşük B derişimlerine görece daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Diğör yandan 10 mM B uygulamasının, tütün eksplantları için toksik etkiye sebep olduğu ve eksplantlardan kallus oluşumunu engellediğı gözlenmiştir. Ayrıca 20 mM B uygulamasından 3 ve 6 hafta sonraki yaş ağırlık artışının 10 mM B uygulamasına göre çok daha az olduğu ve eksplantların 3 hafta sonunda sarardıkları ve 6 hafta sonunda ise öldükleri tespit edilmiştir (Şekil 3.11 ve 3.12).



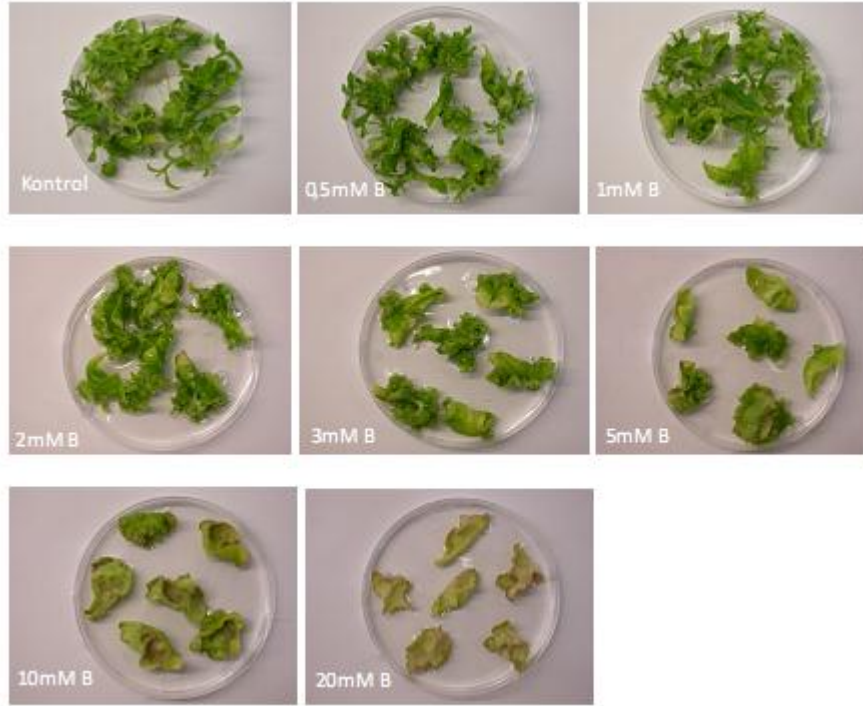
Şekil 3.9 Yabancı tip tütün yaprak eksplantlarında borik asit (B) uygulamaları altında zamana bağılı yaş ağırlık (YA) değışimi. 0: İlk gün, 3: Üç hafta sonrası, 6: Altı hafta sonrası. Ortalama $\pm$ standart hata, $n=9$ ($p<0.05$).



Şekil 3.10 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarında borik asit (B) uygulamaları altında yaş ağırlıktaki (YA) zamana bağlı artış yüzdesi. 0: İlk gün, 3: Üç hafta sonrası, 6: Altı hafta sonrası.



Şekil 3.11 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarına 0-20 mM derişimlerde borik asit uygulamasının 3 haftalık etkileri. En üst panel (0 gün), besiyerlerine yerleştirildiği ilk günde eksplantları göstermektedir.



Şekil 3.12 Yabani tip tütün yaprak eksplantlarına 0-20 mM derişimlerde borik asit uygulamasının 6 haftalık etkileri.

3.4 Transgenik Tütün Hatlarının Eldesi

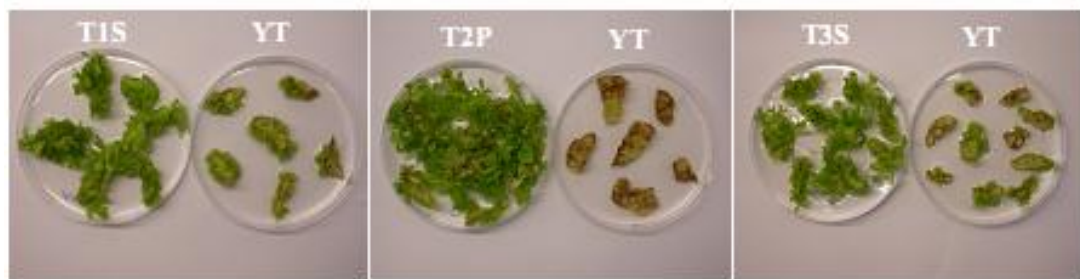
HvBor1a genini tütün bitkilerine aktarmak üzere yapılan transformasyon çalışmalarında iki farklı tütün çeşidi (*Nicotiana tabacum* cv. “Samsun” ve “Petit havana”) kullanıldı. Aday transgenik hatlar, transformasyon deneme sayısının sırası ve tütün çeşidinin ilk harfi kullanılarak adlandırıldı (T1S, T2P, T3S, T4P). T0 olarak ifade edilen ilk transgenik adaylar birden başlayarak numaralandırıldı (ör: T0-T1S1, T0-T1S2, T0-T1S3...; T0-T2P1, T0-T2P2...). Buna göre T1S transformasyon denemesinde 63, T2P denemesinde 189, T3S denemesinde 53, T4P denemesinde 12 olmak üzere toplam 317 transgenik adayı elde edildi (Çizelge 3.1). T0 adaylarından elde edilen tohumlardan gelişen bitkiler ise T1 olarak belirtildi (ör: T1-T1S1, T1-T1S2...).

Çizelge 3.1 Çalışmada elde edilen toplam transgenik aday sayıları.

Transformasyon	Aday transgenik sayıları	Toprağa aktarılan aday transgenik sayıları	Kapsül veren aday transgenik sayıları
T1S	63	11	1
T2P	189	34	4
T3S	53	12	-
T4P	12	-	-

3.4.1 Tütün Eksplantlarından Kallus Oluşumu

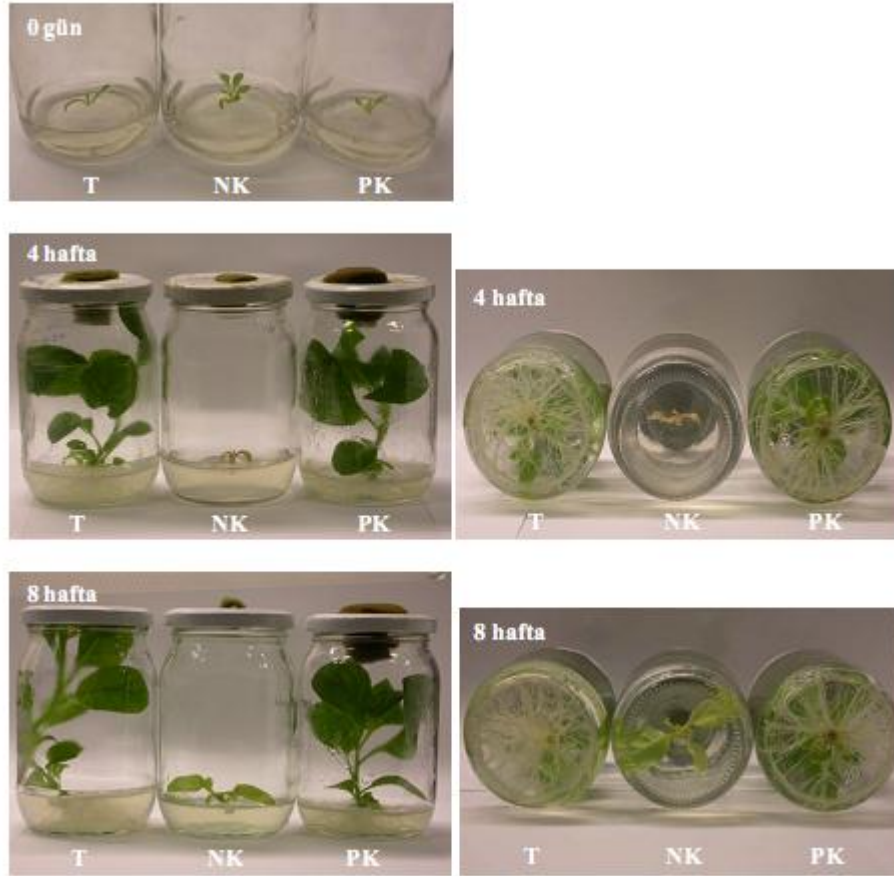
Transforme edilen ve 30 mg/L H içeren seçici besiyerinde (MSB) bulunan eksplantlardan yaklaşık 3 hafta içinde kallus oluşumu başlarken; 4 hafta sonunda mikrogövdelerin oluşmaya başladığı gözlemlendi. Diğer yandan, *Agrobacterium* içermeyen infiltrasyon ortamı ile muamele edilen kontrol grubuna ait eksplantlar ise higromisinden dolayı birinci aydan itibaren ölmeye başladı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Transforme edilmiş ve dört hafta süreyle higromisinli seçici besiyerinde (MSB) bulunan yaprak eksplantlarında kallus ve mikrogövde oluşumu. YT: Yaban tip, T1S: İlk transformasyonda kullanılan “Samsun” çeşidine ait eksplantlar, T2P: İkinci transformasyonda kullanılan “Petit havana” çeşidine ait eksplantlar, T3S: Üçüncü transformasyonda kullanılan “Samsun” çeşidine ait eksplantlar.

3.4.2 Kallus Sonrası Gövde ve Kök Gelişimi

Dört hafta kültür sonunda yeterince büyüyen mikrogövdeler, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen seçici besiyerlerine (MSC) aktarılarak hayatta kalma, büyüme ve kök oluşturma durumlarına göre değerlendirildiler. Bu besiyerinde yaşayabilenler taze besiyerine aktarılarak alt kültürlendiler. Taze besiyerine aktarılan gövdelerde kök gelişimi genelde 2 hafta içinde görüldü. Normal kök ve gövde gelişimi gösteren transgenik adayları 3 kere aynı besi yerinde alt kültürlendi. Buna göre T1S hattında 20, T2P hattında 81, T3S hattında 15 ve T4P hattında 6 tane transgenik adayın en az 3 defa alt kültürü yapıldı. Alt kültürlemede seçici besiyerine aktarılan yaban tip tütün, negatif kontrol olarak kullanılırken, higromisin içermeyen MS besiyerine aktarılan yaban tip tütün pozitif kontrol olarak kullanıldı. Gerçekleştirilen her alt kültürlemede, transgenik adayların pozitif kontrol ile aynı şekilde büyüüp köklenebildikleri görüldü (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 MSB seçici besiyerinde büyüyen transgenik aday mikroövdelerin higromisin içeren MSC seçici besiyerine aktarılması ve alt kültürlenmesi. Mikroövdelerin seçici besiyerine aktarılması (0 gün), Birinci döngü sonunda (4 hafta) gövde rejenerasyonu ve kökler, İkinci döngü sonunda (8 hafta) gövde rejenerasyonu ve kökler. T: Transgenik aday, NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol.

3.4.3 Transgenik Tütün Bitkilerinin Toprağa Aktarılması

Transgenik uygulamalarda ilgili genin bitki genomunda stabil hale gelebilmesi için başarılı rejenerasyon süreci etkili faktörlerden biridir. Bu süreçte, toprağa aktarım en kritik kısımlardan biri olarak ifade edilmektedir. Bunu sağlamak üzere, en az 3 kez alt kültürlenmiş ve köklendirilmiş aday transgenik bitkilerden 57 tanesi, kavanozlardan toprağa aktarıldı (Çizelge 3.1). Bu aday transgenik tütünlerden sadece 24 tanesinin toprak koşullarında da yaşayabildiği tespit edildi (Şekil 3.15).

Toprağa alınan bitkilerden bir kısmı, yaklaşık 1 ay sonra çiçeklendi ve çapraz tozlaşma çiçeklerin örtülmesi ile engellendi. İki ay sonra, T0-T1S38, T0-T2P82, T0-T2P91, T0-T2P109 ve T0-T29113 olarak isimlendirilen transgenik adaylarında tohum kapsülü oluştu ve kapsüller kuruyup kahverengiye dönüştüğünde T1 tohumları alındı .



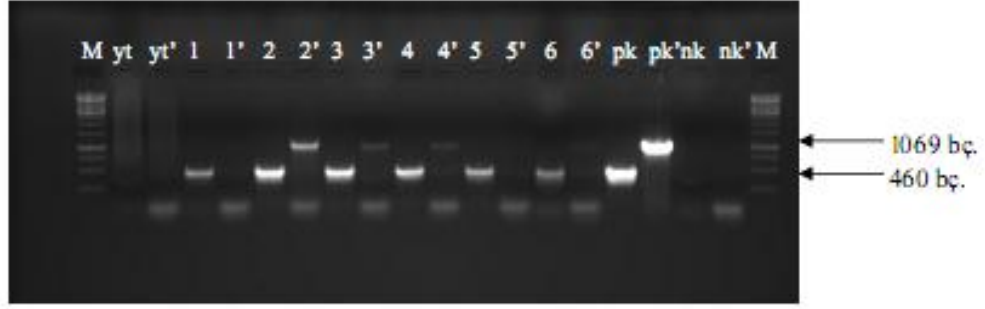
Şekil 3.15 Toprağa aktarılan transgenik adayı tütünler.

3.5 Aday (T0) Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri

HvBor1a geninin tütün bitkisine başarılı bir şekilde transferinin moleküler olarak doğrulanması için T0 adaylarına ait yaprak örneklerinden total DNA ve RNA izole edildi ve miktarları ölçüldü (Çizelge 3.2). İzole edilen 44 tane total DNA'nın PZR'leri seçici antibiyotik direnç geni olan *hpt* ve *HvBor1a* spesifik primerleri kullanılarak yapıldı (Şekil 3.16). PZR analizlerinde *hpt* ve *HvBor1a* genlerini içeren ekspresyon vektörü pIPKb004 pozitif kontrol olarak kullanıldı. Buna göre, sırasıyla beklenen 460 ve 1069 bp'lik bantlar 25 tane örnek için görüldü. Diğer yandan yabancı tip tütün örneğinde bahsedilen ampikonlar gözlenmedi (Şekil 3.16).

Çizelge 3.2 Transgenik adaylarına ait yapraklardan izole edilen total DNA ve RNA miktarları.

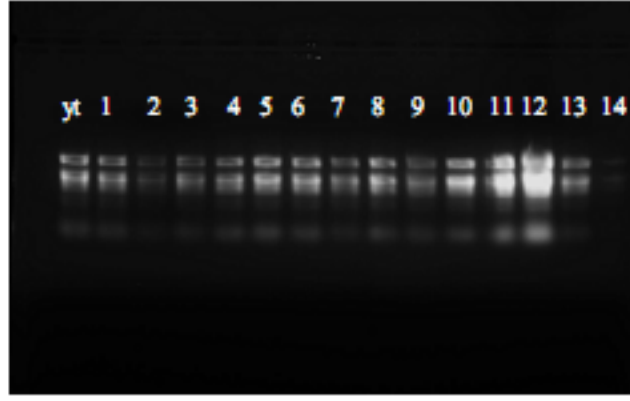
Transgenik adayları (T0)	DNA konsantrasyonları (ng/μl)	RNA konsantrasyonları (ng/μl)
T0-T2P91	973,5	407,9
T0-T2P156	628,5	808,3
T0-T2P110	2657,6	1324,5
T0-T2P57	3760,4	1042
T0-T2P89	824	527
T0-T2P161	3118,6	1367,7
T0-T2P76	357,1	699
T0-T2P109	366,7	1354
T0-T2P103	1083,7	2174
T0-T1S9	1021	1152
T0-T2P87	1419,5	754,6
T0-T2P195	1801,8	1598
T0-T1S58	2018,2	1598,8
T0-T2P187	3587,9	2847,9



Şekil 3.16 Transgenik adayı tütün yapraklarından izole edilen genomik DNA'lar kullanılarak *hpt* ve *HvBor1a* genleri için yapılan PZR sonucu. M: Markır, yt: *hpt* geni için yabani tip tütün örneği, yt': *HvBor1a* geni için yabani tip tütün örneği, pk: *hpt* geni için pozitif kontrol, nk: *hpt* geni için negatif kontrol, pk': *HvBor1a* geni için pozitif kontrol, nk': *HvBor1a* geni için negatif kontrol, 1-6: transgenik adayı DNA'larından *hpt* spesifik primerlerle elde edilen ampliconlar 1'-6': transgenik adayı DNA'larından *HvBor1a* spesifik primerlerle elde edilen ampliconlar.

HvBor1a geninin aday transgenik tütün yapraklarında eksprese olup olmadığının anlaşılması için, genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PZR sonuçlarına göre seçilen 14 adaydan total RNA izolasyonu yapıldı (Şekil 3.17). Agaroz jelde yürütülen total RNA'larda herhangi bir kontaminasyona rastlanmadı. Ribozomal RNA'ların kırılma olmaksızın bütün halinde izole edildiği tespit edildi. Bununla beraber RNA örneklerine, olası DNA kontaminasyonlarını uzaklaştırmak için DNaz muamelesi ve sodyum asetat presipitasyonu yapıldı.

İzole edilen total RNA'lar ters transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Birinci primer çifti olarak *hpt* primerleri, ikinci primer çifti olarak ise *HvBor1a* geninin içinden bağlanan ve 117 baz çiftlik amplicon vermesi gereken GSP4_F ileri ve GSP4_R geri primerleri kullanıldı. Kalıp olarak kullanılan cDNA ile RT-PZR (Ters Transkriptaz-PZR) yapılan 14 örnekten 6 tanesinin beklenen bantları verdiği gözlemlendi. Bu örneklerden iki tanesi Şekil 3.18'deki jel görüntüsünde görülmektedir (3, 3'; 4, 4').



Şekil 3.17 Transgenik adayı tütün yapraklarından total RNA izolasyonu. yt: Yabani tip tütün total RNA'sı, 1-14: Farklı transgenik adaylarından izole edilen total RNA'lar



Şekil 3.18 Transgenik adayı tütün yapraklarından izole edilen total RNA'lar kullanılarak yapılan Ters Transkriptaz-PZR sonucu. M: Markır, nk: *hpt* geni için negatif kontrol, nk': *HvBor1a* geni için negatif kontrol, pk: *hpt* geni için pozitif kontrol, pk': *HvBor1a* geni için pozitif kontrol, yt: *hpt* geni için yabani tip tütün örneği, yt': *HvBor1a* geni için yabani tip tütün örneği, 1-6: transgenik adayı cDNA'larından *hpt* spesifik primerlerle elde edilen ampliconlar 1'-6': transgenik adayı cDNA'larından *HvBor1a* spesifik primerlerle elde edilen ampliconlar.

Transgenik adayı tütünlerden izole edilmiş olan DNA ve RNA örnekleri ile yapılan PZR ve RT-PZR analizlerinin sonuçları Çizelge 3.3'te toplu halde verilmiştir. Beklenen ampliconların gözlemediği örnekler çizelgede +, gözlenmediği örnekler ise - ile belirtilmiştir. Ayrıca çizelgede T1 tohumları alınan 5 transgenik aday ✓ ile gösterilmiştir. T1 tohumları ile çimlenme testleri gerçekleştirilmiştir.

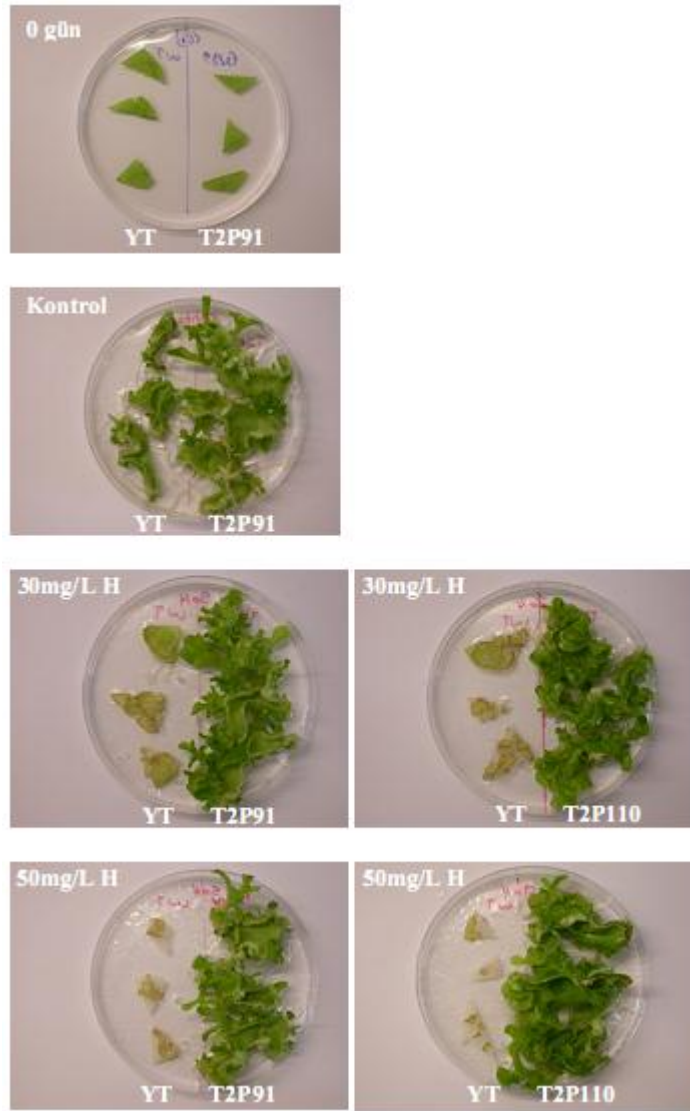
Çizelge 3.3 Transgenik adaylarının moleküler analizi ve elde edilen tohum sayısı.

Transgenik adayları (T0)	gDNA-PZR	cDNA-RT-PZR	T1
T0-T2P91	+	-	√
T0-T2P156	+	+	
T0-T2P110	+	+	
T0-T2P57	+	-	
T0-T2P89	+	+	
T0-T2P161	+	-	
T0-T2P76	+	-	
T0-T2P109	+	+	√
T0-T2P103	+	-	
T0-T1S9	+	-	
T0-T2P87	+	-	
T0-T2P195	+	-	
T0-T1S58	+	+	
T0-T2P187	+	+	
T0-T1S38	-	Yapılmadı	√
T0-T2P113	-	Yapılmadı	√
T0-T2P82	-	Yapılmadı	√

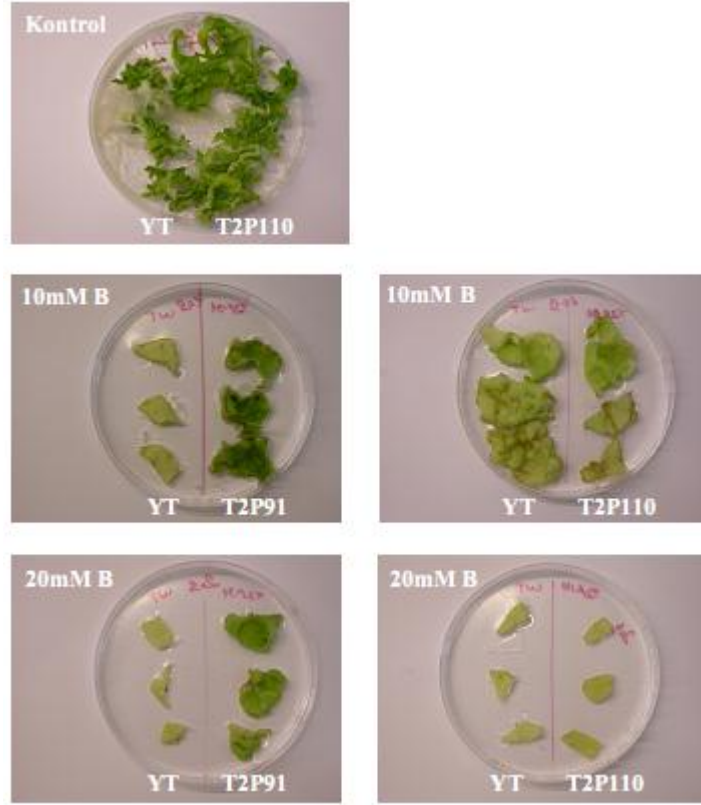
3.6 Aday (T0) Transgenik Bitkilerde Higromisin ve Bor Toksisite Uygulaması

Yabani tip tütün eksplantları kullanılarak belirlenen letal higromisin ve toksik H_3BO_3 derişimlerinin, RT-PZR’de pozitif sonuç veren (T2P91 hariç) transgenik adayı tütünlerde etkisinin anlaşılabilmesi için rejenerasyon analizleri yapıldı. T0 ve yabani tip bitkilere ait yaprak eksplantları, 10 ve 20 mM H_3BO_3 ile 30 ve 50 mg/L higromisin içeren besiyerlerine ayrı ayrı aktarıldı. Üç hafta kültürlenен eksplantların fotoğrafları kültürün ilk günü ve son günü çekildi (Şekil 3.19, Şekil 3.20) ve yaş ağırlıkları ölçüldü (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22). T0 eksplantlarından hiçbirisi higromisinden etkilenmezken, yabani tip tütün eksplantlarının Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi letal higromisin seviyesine dayanamadığı görüldü (Şekil 3.19).

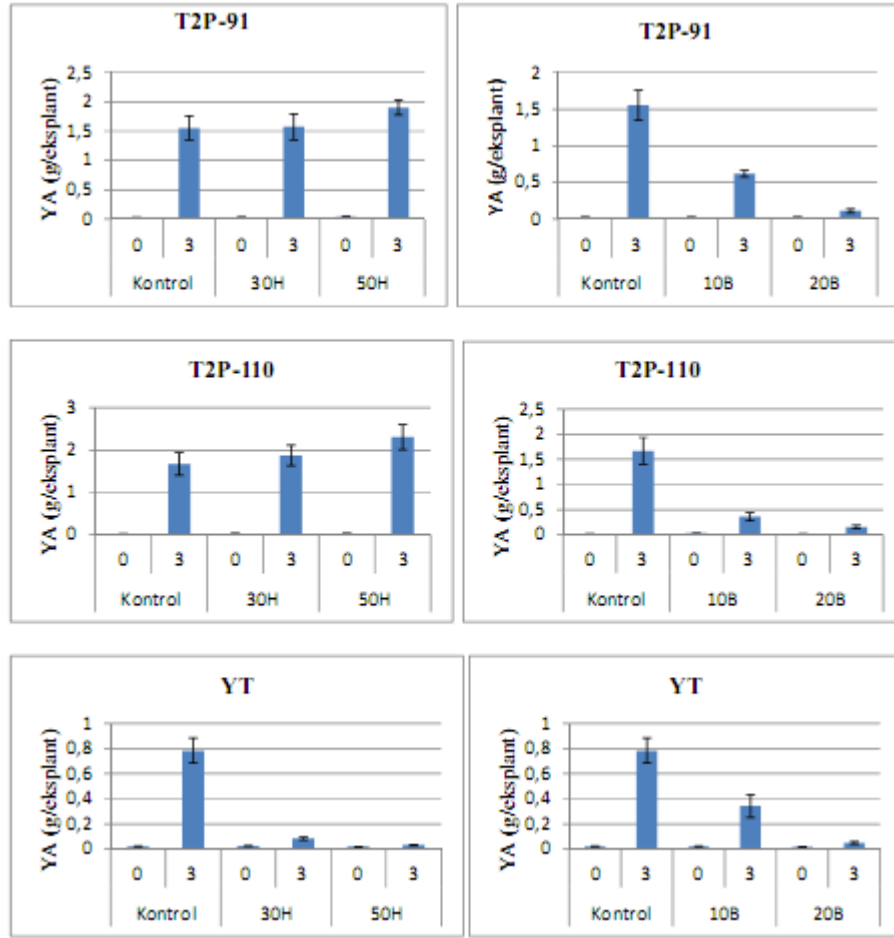
Toksik seviyede bor uygulanan T0 eksplantları ise yabani tip eksplantları ile aynı derecede etkilenmiştir. Sadece T2P91 eksplantlarının farklı bir profil vererek yabani tipden farklı olarak canlı kaldığı ve az miktarlarda kallus oluşturduğu görüldü (Şekil 3.20). T2P91 dışındaki transgenik adaylarına ait eksplantların hepsi, T2P110 eksplantlarında görüldüğü gibi bor toksisitesine maruz kalarak ölmüştür.



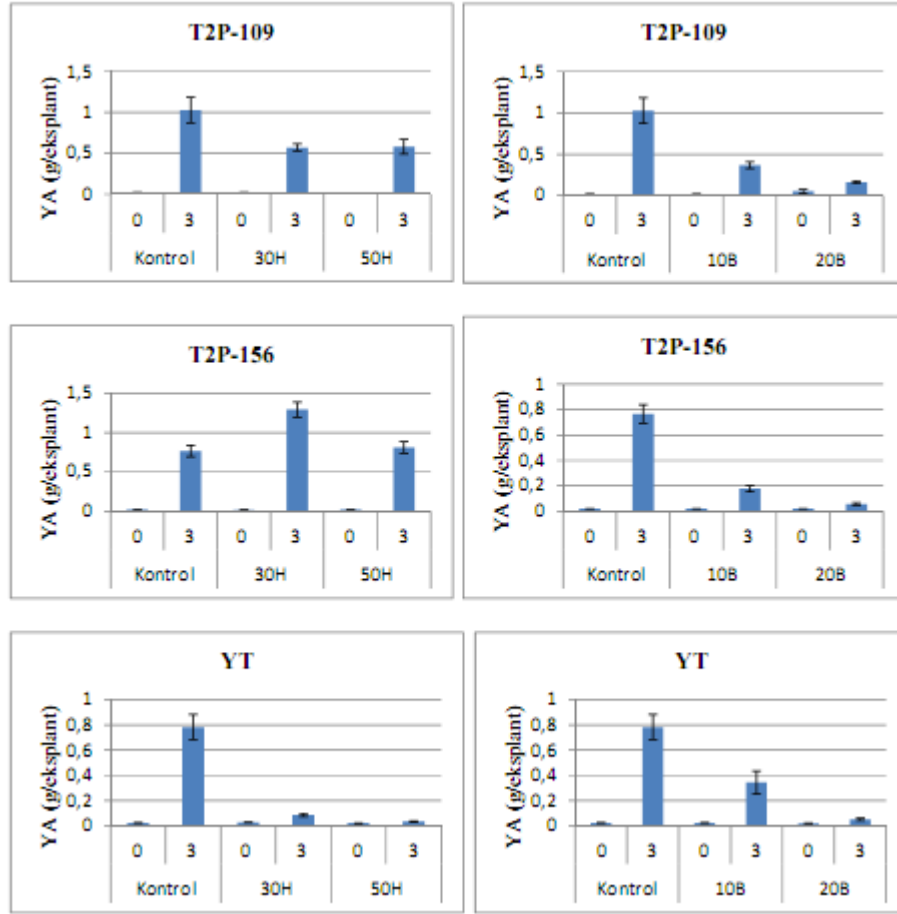
Şekil 3.19 T0-T2P91 ve T0-T2P110 yaprak eksplantlarına letal seviyede (30-50 mg/L) higromisin uygulamasının 3 haftalık etkileri. YT: yabani tip tütün yaprağına ait eksplantlar. En üst panel (0 gün), besiyerlerine yerleştirildiği ilk günde eksplantları göstermektedir.



Şekil 3.20 T0-T2P91 ve T0-T2P110 yaprak eksplantlarına toksik seviyede (10-20 mM) borik asit uygulamasının 3 haftalık etkileri. YT: yabani tip tütün yaprağına ait eksplantlar.



Şekil 3.21 T0 transgenik adaylardan T0-T2P91 ve T0-T2P110'a ait yaprak eksplantlarına higromisin ve bor uygulamaları. YA: Yaş ağırlık, H: higromisin, B: bor, 0: ilk gün; 3: üçüncü hafta, YT: yabani tip tütün eksplantları.



Şekil 3.22 T0 transgenik adaylardan T0-T2P109 ve T0-T2P156'ya ait yaprak eksplantlarına higromisin ve bor uygulamaları. YA: Yaş ağırlık, H: higromisin, B: bor, 0: ilk gün; 3: üçüncü hafta, YT: yabani tip tütün eksplantları.

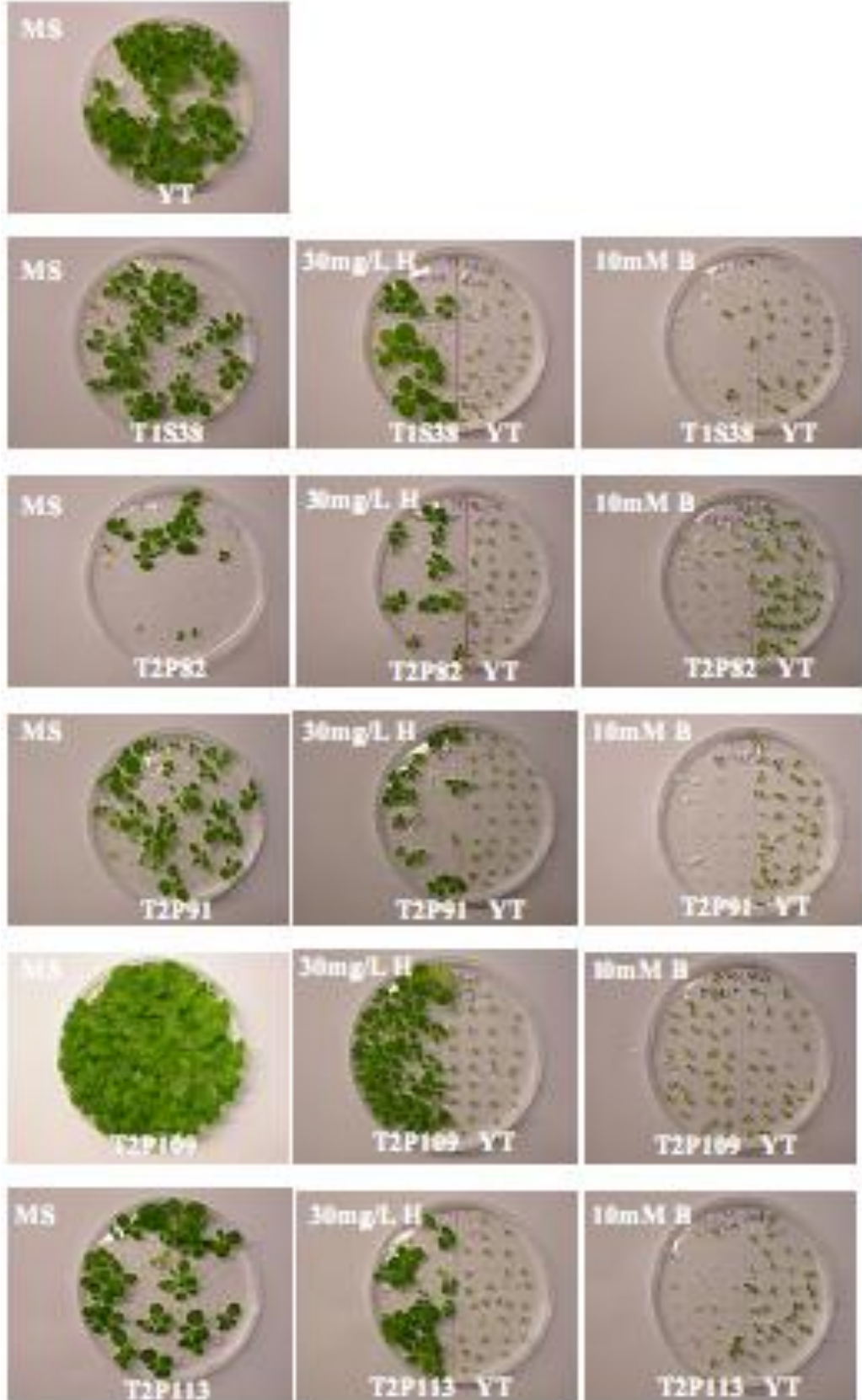
Yaş ağırlık sonuçlarına göre yaban tipi tütün yaprakları, 30 ve 50 mg/L H uygulaması altında, kontrol koşullarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermemiştir. Buna karşın, dört farklı transgenik aday tütün yapraklarının yaş ağırlıkları, artan higromisin derişimleri altında ümitvar sonuçlar vermiştir. Buna göre, tüm transgenik aday eksplantlarının yaş ağırlıklarında, 30 ve 50 mg/L H koşullarında kontrol koşullarına benzer şekilde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Aynı koşullar altında dört farklı transgenik aday arasında T2P91 ve T2P110'un tüm H uygulamaları altında en yüksek rejenerasyon kapasitesi gösteren transgenik adaylar olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, T2P109 transgenik aday eksplantlarının 30 ve 50 mg/L H altındaki yaş ağırlıkları, kontrol koşullarındaki artışa göre daha

düşüktür. Öte yandan T2P156 transgenik adayı eksplantlarda 30 mg/L H uygulaması sonrası kontrol koşullarına göre yaş ağırlıklarında anlamlı seviyede artış gözlenirken; 50 mg/L H uygulaması sonrası yaş ağırlıklarındaki artış, kontrol koşulları ile aynı seviyede tespit edilmiştir.

Bor taşıyıcısı olduğu düşünülen *HvBor1a* geninin transformasyon yöntemiyle tütüne aktarılması sonrasında elde edilen transgenik adayı eksplantların, bor toksisitesi altında büyüme profilleri Şekil 3.20’de gösterilmiştir. Buna göre, dört farklı transgenik adayı ve yabancı tip tütün eksplantlarının yaş ağırlıkları, artan borik asit derişimi altında, kontrol koşullarına görece anlamlı şekilde düşüktür. Yaş ağırlık analizlerine göre, uygulanan maksimum bor derişimi olan 20 mM B’nin, tüm tütün eksplantları için toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşın, B uygulamaları altında, yabancı tip ve transgenik adayı eksplantların yaş ağırlıkları arasında anlamlı bir sonuç tespit edilememiştir.

3.7 T1 Transgenik Bitki Analizleri

HvBor1a geninin aktarıldığı transgenik adayı bitkiler arasından kapsül oluşturan beş adet tütüne ait T1 tohumları ile çimlenme analizleri gerçekleştirilmiştir. T1 tohumlarının transgenik olup olmadığını belirlemek ve toksik seviyede bora karşı tolerans geliştirme durumunu incelemek amacıyla yabancı tip ve transgenik adayı tohumlar, kontrol (MS) dışında higromisin ve yüksek derişimde borik asit içeren besiyerlerine aktarılmıştır. Bunun için, T1 tohumları, yabancı tip tütüne ait yaprak eksplantları için letal olan 30 mg/L H ile toksik olan 10 mM B derişimleri uygulanan besiyerlerine aktarıldı. Çimlenen T1 tohumlarının üç hafta sonunda fotoğrafları çekildi (Şekil 3.23). Çimlenen ve bu çimlenenler arasından sağlıklı şekilde gelişenler sayıldı ve toplam tohum sayısına göre yüzdeler hesaplandı (Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.23 T1 tohumlarının letal derişimde higromisin ve toksik seviyede borik asit uygulamasının çimlenmeye etkileri

3.7.1 T1 Tohumlarında Canlılık

Antibiyotik ve bor eklenmemiş kontrol MS besiyerinde çimlenen transgenik adayı T1 tohumları, yabani tip tohumları ile karşılaştırıldığında T1-T2P109 dışındaki T1'lerin yaban tipinden daha düşük çimlenme ve gelişme oranına sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 3.4). T1-T2P109 ise % 100 çimlenme ve gelişim göstererek hem yabani tip hem de diğer transgenik adaylarla karşılaştırıldığında en yüksek sonucu vermiştir. Buna karşın T1-T2P82 tohumları en düşük çimlenme oranına sahiptir ve buna paralel olarak gelişme yüzdesi de diğer adaylarla kıyaslandığında anlamlı derecede düşüktür. Geriye kalan üç transgenik adaya ait çimlenme ve gelişme yüzdeleri birbirlerine yakın; ancak yaban tipinden düşüktür.

Çizelge 3.4 T1 tohumlarının MS besiyerinde çimlenme ve gelişme oranları.

	MS Besiyeri				
	Çimlenme			Gelişme	
	Toplam tohum	Çimlenen tohum	yüzdesi (%)	Gelişen tohum	yüzdesi (%)
Yabani tip	68	53	77,9	51	75,0
T1-T1S38	68	36	52,9	28	41,2
T1-T2P82	68	13	19,1	11	16,2
T1-T2P91	68	34	50,0	27	39,7
T1-T2P109	68	68	100,0	68	100,0
T1-T2P113	68	30	44,1	30	44,1

3.7.2 T1 Tohumlarında Mendel Kalıtımının İncelenmesi

Transgenik adayları için seçici antibiyotik olan higromisinin letal olan 30 mg/L derişiminde eklendiği MS besiyerinde çimlendirilen T1 tohumları higromisine direnç göstermiştir (Şekil 3.23). Yabani tip tohumların yaklaşık % 89'u, higromisinli besiyerinde çimlendiği halde bunlardan hiçbirisi gelişmemiştir. Transgenik adaylarına ait tohumlar ise higromisine direnç göstererek gelişmiştir. T1'ler arasında en yüksek çimlenme (%100) ve gelişim oranını (% 80,4) yine T1-T2P109 göstermiştir. Geriye

kalan T1'lerin çimlenme ve gelişim yüzdelerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular ile Chi-Square (χ^2) testi yapılmıştır. Chi-Square testine göre iki değişkenli bir uygulamada Df=1 olacağı için χ^2 değerinin p=0.05'e göre 3,841 olduğu bilinmektedir. Mendel kalıtım yasasına göre higromisine maruz kalan T1 tohumları (F1) arasında dayanıklı:hassas oranı 3:1 veya 1:2 olacak şekilde hipotez kurulmuştur. Buna göre dayanıklı:hassas oranı 3:1 hipotezi, χ^2 değeri 3,841'den büyük olan T1'lerde reddedilmiş; küçük olan T1-T2P109'da ise kabul edilmiştir. Bunun tersine dayanıklı:hassas oranı 1:2 hipotezi, χ^2 değeri 3,841'den büyük olan T1-T2P109 için reddedilirken; küçük olan diğer T1'ler için kabul edilmiştir. Sonuç olarak T2P109 transgenik adayının beklenen 3:1 Mendel kalıtımını gösterdiği, ancak diğer adayların 1:2 oranına sahip olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.5 T1 tohumlarının higromisinli besiyerinde çimlenme, gelişme oranları ve Mendel yasalarına göre kalıtım özellikleri.

MS+30mg/L H									
						3:1		1:2	
						(Dayanıklı:Hassas)		(Dayanıklı:Hassas)	
	Toplam tohum	Çimlenen tohum	Çimlenme yüzdesi (%)	Gelişen tohum	Gelişme yüzdesi (%)	χ^2	p=0.05	χ^2	p=0.05
Yaban tipi	170	152	89,4	0	0,0	-	-	-	-
T1S38	102	36	35,3	34	33,3	94,44	Red	0,00	Kabul
T2P82	102	32	31,4	29	28,4	117,97	Red	1,10	Kabul
T2P91	102	47	46,1	34	33,3	94,44	Red	0,00	Kabul
T2P109	102	102	100,0	82	80,4	1,58	Kabul	101,65	Red
T2P113	102	43	42,2	39	38,2	73,53	Red	1,10	Kabul

3.7.3 T1 Tohumlarına Toksik Seviyede Bor Uygulaması

Yabani tip tütün eksplantlarında toksik olarak belirlenen 10 mM borik asit derişiminin uygulandığı T1 tohumlarının, yabani tip tohumlarına göre çimlenme oranı anlamlı derecede düşük olmuştur. Bu oran yabani tip için % 85,3 iken T1’ler için % 13,7 ile % 24,5 arasında değişmektedir. Buna uymayan T1-T2P109 tohumlarının % 96,1’i çimlenmiş ancak gelişmemiştir (Çizelge 3.6). T1-T1S38’e ait bir tane tohum haricinde, yabani tip dahil, toksik seviyede bora maruz kalan tohumların hiçbiri, çimlense dahi gelişmemiştir (Şekil 3.23).

Çizelge 3.6 T1 tohumlarının toksik derişimde borlu besiyerinde çimlenme ve gelişme oranları.

	MS+10mM B				
	Toplam tohum	Çimlenen tohum	Çimlenme	Gelişen tohum	Gelişme
			yüzdesi (%)		yüzdesi (%)
Yaban tipi	170	145	85,3	0	0,0
T1S38	102	25	24,5	1	1,0
T2P82	102	23	22,5	0	0,0
T2P91	102	14	13,7	0	0,0
T2P109	102	98	96,1	0	0,0
T2P113	102	19	18,6	0	0,0

Tüm çimlenme analizleri bir arada düşünüldüğünde T1-T2P109 her uygulamada en yüksek çimlenme ve gelişim sonucunu vermiştir. Diğer T1’lere bakıldığında, letal higromisin derişimli besi ortamları haricinde, yabani tip tohumlarına göre düşük çimlenme ve gelişim göstermişlerdir.

4 TARTIŞMA

Dünya bor rezervleri arasında birinci sırada yer alan ülkemizde tarımsal verim, dünyadaki diğer kurak ve yarı-kurak bölgelerdekine benzer olarak, ekinlerin bor toksisitesine maruz kalmasıyla düşmektedir (Nable ve ark., 1997; Cartwright ve ark., 1984). Bitki için esas mikro-elementlerden olan borun düşük derişimde bulunduğu toprakların, borca zengin topraklara göre daha yaygın olmasına karşın, bor toksisitesi çoğu zaman dünyanın farklı bölgelerinde görülen verim düşüklüğünün başta gelen nedenleri arasında gösterilmektedir (Cartwright ve ark., 1986). Bitki için eksiklik ve toksisite yaratan bor derişimleri arasındaki farkın çok az olması, bor toleransı açısından bitki türleri hatta çeşitler arasında dahi farklılıklara sebep olmaktadır (Kalaycı ve ark., 1998; Alkan ve ark., 1995). Bu nedenle, bitkilerde eksiklik ve toksitite belirtileri en yaygın görülen mikro-elementlerin başında bor gelmektedir (Keren ve Bingham, 1985; Sakal ve Singh, 1985; Goldberg, 1997).

Borun toprakta toksik seviyede bulunması bitkilerde kuru madde kaybı, meyve çürümesi, kök uzamasının engellenmesi, kabuk ve yaprak uçları ile kenarlarında nekroz ve kambiyum ölümünden dolayı gövde ölümüne yol açmaktadır (Nable ve ark., 1997; Reid ve ark., 2004; Marschner, 1995; Reis ve Fitzpatrick, 2009). Ayrıca yüksek seviyede borun bazı bitkilerde şekerden nişasta yapımını inhibe ettiği ve nitrojen bileşenleri metabolizmasını da etkilediği gösterilmiştir (Bonilla ve ark., 1980; Kastori ve Petrovic, 1989; Mahboobi ve ark., 2002; Marschner, 1995). Bu bilgilerle uyumlu olarak borun bitkilerde nitrojen fiksasyonu gibi fizyolojik ve hücre duvarındaki pektin polisakkaritlerine bağlanması gibi yapısal rolleri olduğu bilinmektedir. Bunlar dışında borun, bitki hücrelerinde karbonhidrat ve protein metabolizmasında, şeker taşınımında, hücre duvarı sentezi ve yapısal sürekliliğinde, lignifikasyon, respirasyon ve RNA metabolizmasında, doku farklılaşması, oksin ve fenol metabolizmasında, hücre zarı geçirgenliğinde, polen çimlenmesinde ve polen tüpü büyümesinde de rol aldığı belirtilmiştir (Parr ve Loughman, 1983; Marschner, 1995; O'Neill ve ark., 2004). Dolayısıyla borun toksik seviyede olması kadar eksik derişimi de duyarlı bitkilerin metabolizmalarını etkileyecektir. Bitkilerin beslenmesinde gerekli olan eksik besin elementlerinin gübreleme yoluyla bitkiye kazandırılarak verimi artırabilmek mümkün olabildiği halde, toprakta bitkiye toksik

etki yapacak oranda bulunan besin elementlerinin verime olan olumsuz etkisini ortadan kaldırmak kolay olmamaktadır. Çağımızda oldukça fazla kullanım alanına sahip olması boru stratejik açıdan önemli kılmaktadır. Bundan dolayı, borun bitkilere olan toksik etkisini gidermek için boru ortamdan uzaklaştırmak iyi bir yöntem olarak görülmemektedir. Bu nedenle, gerek stratejik değerinden dolayı geri kazanım, gerekse tarımsal açıdan olumsuz etkilerinden dolayı, bora dayanıklılık durumuna göre tarım yapılması yönüne gidilmektedir. Günümüzde bor toksisitesine karşı ürün verimini ve kalitesini arttırma amaçlarına yönelik yüksek toleranslı transgenik bitkiler elde etmek, uygulanan stratejik yöntemlerden biridir. Ayrıca son zamanlarda, bor tolerans mekanizmasının, bor taşıyıcıları ile aktif olarak taşınan borun bitki yaprak ve gövdelerinden uzaklaştırılması ve köklerden atılması ile sağlandığının bulunması, bor stresine karşı tolerans geliştirme konusuna yeni yaklaşımlar getirmiştir. Bu tez çalışmasında abiyotik stres faktörü olan bor toksisitesine karşı tolerans geliştirme amacıyla, bor taşıyıcısı olarak bilinen *HvBor1a* geninin, transformasyon çalışmalarında en sık kullanılan model bitki olan tütüne aktarılması hedeflenmiştir.

Genel adı BOR olan bor taşıyıcılarından BOR1, tanımlanan ilk bor taşıyıcısı olarak *Arabidopsis thaliana*'da belirlenmiştir. Bu proteinin ekspresyonunun bor toksisitesi altında düştüğü ve endozom yapısına dahil olarak vakuollere taşındığı; bor eksikliğinde ise hücre zarında biriktiği gözlenmiştir (Takano ve ark., 2005). Bulunan ikinci bor taşıyıcı grubu ise nodulin-26-benzeri proteinler olarak adlandırılan ve borik asit kanalları olan NIP'lerdir. *A. thaliana*'da tanımlanan NIP5;1'in ekspresyon seviyesinin düşük bor derişimi altında arttığı ve borun kök hücrelerine alınımını kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Takano ve ark., 2002; 2006). Arpa, buğday ve çeltikte bulunan; sırasıyla *Hv-BOR2*, *Ta-BOR2* ve *Os-BOR1* genlerinin bor toleransından sorumlu olduğu belirlenmiştir (Reid, 2007; Nakagawa ve ark., 2007). *HvBOR2*, *OsBOR3* ve *Ta-BOR2* gibi bor taşıyıcıları ile yüksek oranda benzerlik gösteren *HvBor1a*'nın ekspresyon seviyesinin çalışılan iki arpa çeşidinde de yapraklarda köktekinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Oz, 2012). Bu ekspresyon farkı, *HvBor1a*'nın yapraklarda bor dağıtımından sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. *A. thaliana*'da borun atılımından sorumlu olduğu belirlenen *BOR4*'ün ekspresyon seviyesinin artırılması (Miwa ve ark., 2007) ve bu genin çeltikte ekspresyonunun gerçekleştirilmesi (Kajikawa ve ark., 2011) ile yüksek bor toleransı sağlanması, bor

taşınma mekanizmalarından sorumlu genlerin uyarılmasının veya heterolog ekspresyonunun gerçekleştirilmesinin bitkilerde bor toksisitesine tolerans sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bundan yola çıkılarak tütüne aktarılmak istenen arpa kökenli *HvBor1a* geninin, toksik seviyede bora maruz kalan transgenik adayı tütün eksplantları ve tohumlardaki etkisi, yabani tip tütünler ile karşılaştırılmış ve gözlemlenen farklar tartışılmıştır.

4.1 Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde PZR ve RT-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Arpa kökenli *HvBor1a* geni, 35S promotorunun bulunduğu ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile tütüne aktarılmıştır. Vektörde yer alan seçici antibiyotik direnç geninden (*hpt*) dolayı higromisinli besi ortamında geliştirilen transgenik adayların bir kısmından sırasıyla total DNA ve RNA'lar izole edilmiştir. Transgenik adayı tütün genomik DNA'larının *HvBor1a* spesifik ve *hpt* bölgesine ait primerler ile gerçekleştirilen PZR'ler sonucunda her iki amplikon için pozitif sonuç veren 14 transgenik adayı seçilmiştir. Bu transgenik adaylarına ait total RNA örneklerinden ters transkriptaz enzimi ile elde edilen tamamlayıcı DNA'lar (cDNA) kalıp olarak kullanılarak yarı-nicel RT-PZR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır. Bu şekilde, yine *HvBor1a* spesifik ve *hpt* bölgesine ait primerler kullanılarak; *HvBor1a*'nın transgenik tütünlerde eksprese olup olmadığının anlaşılması hedeflenmiştir. Buna göre, 14 transgenik adayının altı tanesinde amplikonlar beklenen bantları vermiştir. RT-PZR sonucu pozitif olan transgenik adaylara ait eksplantlar bor toleransı denemelerine alınmış; toksik seviyede borik asite maruz bırakılarak yabani tip tütün eksplantları ile morfolojik yönden ve rejenerasyon oranları açısından karşılaştırılmıştır.

4.2. Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde Letal Higromisin Uygulamaları

Gen transferi çalışmalarında, bitkilerde seçici ajan olarak sıkça kullanılan higromisin B, aminoglikozidik bir antibiyotik olup protein sentezini inhibe ederek hücreleri öldürmektedir. Higromisin B'yi fosforilasyon ile inaktive eden bir kinaz olan higromisin fosfotransferaz, *hpt* direnç geni tarafından kodlanır. Bu çalışmada *Agrobacterium* yolu ile yapılan transformasyonda kullanılan tütün yapraklarının higromisin B'ye hassasiyetlerini belirlemek üzere yaban tip tütün yapraklarına farklı derişimlerde higromisin ajanı uygulandı. Bu farklı derişimler altında yaş ağırlıkları ölçülen tütün eksplantları için 30 mg/L higromisin derişiminin letal seviyede olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar Tuncer (2006)'ın yaptığı çalışmada da bulunmuştur. Belirlenen letal higromisin derişimi, transforme olmayan eksplantların rejenerasyonunu engellemek ve gen aktarımının yapıldığı eksplantları seçebilmek için transgenik aday tütün yapraklarına uygulandı. Nitekim yabani tip ve transgenik aday tütün yapraklarına 30 ve 50 mg/L higromisin uygulaması sonrasında, yaban tipine ait eksplantlar ölürken, transgenik aday tütün eksplantlarının canlı kaldığı ve rejenera olduğu görülmüştür. Bu sonuç, sırasıyla 25, 30-50, 50, 40 ve 50 mg/l higromisinin uygulandığı tütün (Tuncer, 2006), çeltik (Li ve ark., 1993), *Rubus anticus* (Kokko ve So, 1998), *Eucalyptus camaldulensi* (Ho ve ark., 1998) ve buğday (Raja ve ark., 2010) transgenik seçilimlerinin yapıldığı çalışmalarla paralellik göstermektedir.

4.3 Transgenik Adayı (T0) Tütünlerde Bor Toksisitesi Uygulamaları

Çalışmada aktarılmak istenen *HvBor1a* geninin muhtemel bir bor taşıyıcısı olması nedeniyle; transgenik aday tütünlerin seçiliminde kullanılmak üzere yabani tip tütün eksplantlarında letal bor derişimi belirlenmiştir. Buna göre, 10 mM B uygulaması altında yabani tip ve transgenik aday tütün eksplantlarının ölmediği ancak kallus da oluşturmadağı tespit edilmiştir (T0-T2P91 hariç). Aynı koşullar

altında transgenik adayı tütün eksplantlarının yaş ağırlıklarında yaban tipine göre anlamlı bir artış görülmemiştir. Ayrıca 20 mM B uygulaması yabani tip ve transgenik adayı tüm eksplantlara letal etki göstermiş ve kallus oluşumunu bütünüyle engellemiştir. Sonuç olarak, toksik B koşulları altında *HvBor1a* geni aktarılan transgenik adayı ve yabani tip tütünler yaş ağırlıklarına göre değerlendirildiğinde önemli bir fark görülememiştir. Ayrıca transgenik adayı tütünlerde higromisin uygulamaları altında belirlenen fenotipik farklılık bor uygulamalarında tespit edilememiştir. Başka bir ifadeyle seçici ajan olan higromisine *hpt* geninin transgenik adayı tütünlerde sağladığı direnç, bor toksisitesi altında *HvBor1a* geni tarafından sağlanamamıştır. Bor toksisitesi altında *HvBor1a* geni aktarılmış transgenik adayı bitkilerle yabani tip tütünler arasında fenotipik bir farklılığın belirlenememesi, *HvBor1a*'nın bor atılımı ya da içeri alımın mekanizmalarının hangilerinde etkin bir rol oynadığının henüz açıklanamamış olması ile ilişkili olabilir. Benzer şekilde Öz'ün (2012) arpada yaptığı bir çalışmada *HvBor1a* geninin, toksisite koşulları altında ekspresyon seviyesinin düştüğü belirlenmiş ve *HvBor1a*'nın toksisite koşullarına toleranstan ziyade borun yaprak dokularına dağıtımından sorumlu olabileceği önerilmiştir.

4.4 Transgenik (T1) Tütünlerde Çimlenme Analizleri

Genetik transformasyonda başarı sadece transgenlerin bitki genomuna entegrasyonunun sağlanması değil; bu transgenlerin sonraki jenerasyonlarda kararlı olarak eksprese olabilmesi anlamına gelmektedir (Basri, 2005). Günümüze kadar birçok transgen çeşitli yöntemler ile 120'den fazla bitki türünün nükleer genomuna başarıyla aktarılmıştır (Birch, 1997). Bitki için yeni olan bu transgenlerin kalıtımını ve kararlılığını açıklayabilmek, tarımdaki genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanımı ve değerini belirlemede büyük önem taşımaktadır. Transgenin moleküler düzeyde karakterizasyonu (transgenin aktarılması) kadar; transgen ile kodlanan fenotipin (transgen ekspresyonu) sonraki nesillerdeki ayrımsal analizleri de transgen kalıtımını belirlemeyi sağlar (Yin ve ark., 2004). Bu çalışmada, transgenik adayı olup kapsül oluşturan beş tütünde, aktarılan gen bölgesinin kalıtımı, bu tütünlere ait tohumların çimlendirilme analizleri ile belirlenmiştir. Bunun için, T1 tohumları

yabani tip tohumlar ile birlikte, kontrol olarak yarı katı MS, seçici ajana direnci görmek üzere yarı katı MS+30 mg/L higromisin ve toksik bora toleransı incelemek amacıyla yarı katı MS+10 mM H₃BO₃ besiyerlerine aktarılmışlardır.

Higromisin ve toksik miktarda H₃BO₃ içermeyen MS besiyerine aktarılan T1'lerden çimlenen hemen her tohumun aynı zamanda geliştiği de görülmüştür. Her ne kadar yabani tip tohumları kadar olmasa da T1S38, T2P91 ve T2P113 tohumlarının çimlenip gelişebildiği belirlenmiştir. T2P82 tohumlarının en düşük çimlenme oranını göstermesiyle birlikte çimlenenlerden çoğunun geliştiği görülmektedir. T2P109 tohumları ise % 100 çimlenme ve gelişme göstererek yabani tip tohumlardan daha iyi sonuç vermiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, yapılan gen transformasyonu uygulamasının gamet oluşumunu engellemediği ve *HvBor1a* geninin bütün genomuna entegrasyonunun hem reproduktif hem de gelişimsel safhaları ciddi oranda etkilemediği yorumu yapılmıştır.

Seçici higromisin derişimi uygulanan yabani tip tohumları çimlenip gelişemezken, T1 tohumları çimlenmiş ve gelişme göstermişlerdir. Higromisin direncini sağlayan ve etkisi fenotipik olarak da görülen *hpt* geninin T1 tohumlarındaki kalıtımı, Mendel kalıtım yasasına göre incelenmiştir. Buna göre aktarılan bir genin ilk jenerasyonda 3:1 oranında dayanıklı:hassas fenotipi göstermesi gerekmektedir. Bu hipotezden yola çıkılarak T1'lerin Chi-Square testi ile χ^2 değerleri hesaplandığında sadece T2P109'un bu hipoteze uyduğu görülmüştür. Hipotez değiştirilip dayanıklı:hassas oranı 1:2 olacak şekilde χ^2 testi yapıldığında T2P109 dışındaki transgenik adaylar için 1:2 hipotezi kabul edilmiştir. Yani T2P109 dışındaki T1 tohumları Mendel kalıtımına uymamaktadır. Ancak bu kalıtım analizinin sınırlı sayıda tohumla yapılmış olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu şekilde *Agro*-transformasyonu veya mikropartikül bombardımanı ile elde edilen transgenik bitkilerde, transformasyonun kalımlı olmaması veya zayıf ekspresyonundan dolayı, bir transgenin Mendel kalıtımına uymayan segregasyonu %10-50 sıklığında görülmektedir (Derolles, Gardner 1988, Register ve ark., 1994, McCABE ve ark. 1999, Limanton-Grevet, Jullien, 2001). Doğrudan DNA aktarımı (Spencer ve ark., 1992; Register ve ark., 1994) veya *Agro*-transformasyonu (Derolles ve Gardner, 1986) ile elde edilen transgeniklerde, transgenlerin kopya sayısından

bağımsız şekilde tek bir Mendel lokusuna entegrasyonu tipik olarak görülmektedir. Aynı bitki türü için dahi, transformasyon yönteminin, T-DNA entegrasyonunun tipi ve kopya sayısına anlamlı derecede etkisi olduğu bildirilmiştir (Grevelding ve ark., 1993). Örneğin yaprak diski yöntemiyle transforme edilen *Arabidopsis* transgenik bitkilerinin çoğunda (% 89) çoklu T-DNA insersiyonu görülmüştür. Bu insersiyonların büyük kısmı sağ-sınıra ters şekilde giren tekrar yapılarıdır (%58). Bunun tersine kök transformasyonunda çoğunlukla tek T-DNA insersiyonu gerçekleşmiş ve sağ-sınır bölgesinde daha az (%38) tekrara rastlanmıştır. Çoklu T-DNA insersiyonlarının transgenin susturulması veya birlikte-baskılanması ile ilgili olduğu bilinmektedir (Jorgensen, 1991, 1993).

T1 tohumlarında toksik seviyede bora karşı toleransın oluşup oluşmadığını anlamak üzere yabani tip ve T1'lere 10 mM derişiminde borik asit uygulanmıştır. Toksik derişimde bor, yabani tip tohumlarının çimlenmelerine engel olmamış ve % 85,3 gibi bir çimlenme sonucu vermiştir. Ancak çimlenen hiçbir tohum gelişmemiştir. Toksik seviyede bora maruz kalan transgenik aday tohumlar ise yaban tipe görece oldukça düşük bir çimlenme göstermişlerdir. Buna uymayan tek transgenik aday T2P109 tohumları ise, yaban tipinden yüksek bir çimlenme oranı göstermiş; ancak geriye kalan tüm tohumlar gibi gelişim göstermemiştir. Bu durum öncelikle, toksik seviyede borun gerek organogenez gerek de çimlenme sonrası gelişimi engellerken; yabani tip ve T2P109'da çimlenmeye engel olmadığını akla getirmektedir. Ayrıca RT-PZR'de pozitif sonuç veren T0-T2P109'un yaprak diski-bor uygulamalarında da yaban tipine benzer bir profil gösterdiği hatırlanmalıdır. PZR'de pozitif ancak RT-PZR'de negatif sonuç veren T0-T2P91 yaprak eksplantları ise toksik bor denemesinde yabani tip ve T0-T2P109'dan farklı olarak canlı kalmıştı. PZR'de negatif sonuç veren (bu yüzden RT-PZR yapılmadı) ancak tohum verdikleri için yine de çimlenme analizine alınmış diğer transgenik adaylara (T0-T1S38, T0-T2P82, T0-T2P113) ait tohumlar (T1-T1S38, T1-T2P82, T1-T2P113) ise higromisin direnci göstermiş ve toksik seviyede bordan birbirine benzer şekilde etkilenmişlerdir. Tüm bu sonuçlara bakılarak, işlevi belirlenmek istenen ve bor taşıyıcısı olduğu bilinen *HvBor1a* geni tütünde eksprese olduğu için çimlenme ya da gelişim gerçekleşmiyorsa, bu genin boru hücre içine taşımada görevli olabileceği; bu yüzden de bora tolerans sağlayamayarak tersine toksisiteye sebep olduğu yorumuna gidilmiştir.

Ayrıca T0 yaprak diski bor denemelerinde T2P109 eksplantlarının, toksik seviyede bordan, yaban tipinden farksız şekilde etkilendiği görülürken; T1-T2P109 tohumlarının diğer T1'lerden farklı olarak, toksik miktarda bor içeren besiyerinde yüksek oranda çimlenmesi bu bor taşıyıcı genin ekspresyonunun bitkide doku-spesifik olabileceğini de düşündürmüştür. Buna ek olarak T1 tohumlarının genel olarak çimlenme oranlarında görülen farklılıkların genotipler arası fertilitite yeteneği farkından da kaynaklanabileceği unutulmamalıdır.

Ancak bir başka yaklaşım *HvBor1a* geninin ekspresyonunun engellenmiş olabileceğidir. Çünkü bir transgenin genoma aktarılması hem transgenin kendisine hem de konakçı genomuna bağlı olan karmaşık bir süreçtir. Ayrıca bu transgenin ekspresyon seviyesi, başlıca pozisyonel etkilerin rol aldığı birkaç faktöre (Hobbs ve ark., 1993, Meyer, 1995, Kohli ve ark., 1999, Yın, 2003) bağlı olarak değişebilir. Benzer şekilde, transgenin entegre olduğu bölge transgenin kalıtımını etkiler. Eğer entegrasyon transkripsiyonel olarak aktif bir bölgeye olmuş ise ekspresyon proksimal düzenleyici dizilerce uyarılır (Topping ve ark., 1991). Ancak entegrasyonun heterokromatındaki tekrar-dizilerinin bulunduğu bölgede gerçekleştiği durumlarda transgenlerin inaktivasyonu ile sonuçlanabilir (Ye, 1996). Bilinen diğer faktörler transgenlerin delesyonu, duplikasyonu, yeniden düzenlenmesi, tekrar eden dizi rekombinasyonu ve gen interaksiyonlarını içeren genetik mekanizmalardır (Yın ve ark., 2004).

Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda *HvBor1a* geninin aktarıldığı transgenik aday tütün eksplantları ve tohumlarına yapılan toksik seviyede bor uygulamaları sonucunda genel olarak anlamlı bir bor toksisitesi toleransı görülememiştir. Bu yüzden 10mM borik asit ile yapılan çimlenme analizinde Mendel kalıtımına bakılmamıştır. Bununla birlikte *HvBor1a* geninin boru hücre içine taşımada görevli olduğu var sayılırsa, bor toksisitesi yerine bor eksikliği uygulanan koşullarda çimlendirilen T1 tohumlarında 3:1 duyarlı:hassas fenotipi görülmesi beklenebilir.

5 SONUÇ

Bor toksisitesi, bor kaynakları açısından ilk sırada yer alan ülkemiz ve dünyanın kurak sayılan bölgelerinde görülen verim düşüklüğünün başta gelen nedenleri arasında gösterilmektedir. Buna karşın, tarım alanlarında yüksek miktarda borun neden olduğu toksisite ile başa çıkmak agronomik olarak kolay değildir. Bununla birlikte, bor stresine toleranslı bitkiler geliştirmek, toksisite veya eksiklik kaynaklı verim düşüklüğünün üstesinden gelmede bir strateji olabilir. Bu amaçla, bor tolerans mekanizmasında taşıyıcı rolü ile etkin olduğu düşünülen arpa kökenli *HvBor1a*'nın *Agrobacterium* yolu ile model organizma olan tütüne transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- Transformantların seçiminde kullanılmak üzere, yabani tip tütün yaprak eksplantları için seçici ajan higromisin'in öldürücü derişimi 30 mg/L olarak belirlendi.
- Transgeniklerde bor toksisitesi toleransını incelemek üzere, yabani tip tütün yaprak eksplantlarında letal borik asit derişimi 10 mM olarak belirlendi.
- Yapılan 4 transformasyon denemesi sonucunda *in vitro* kültür ortamında elde edilen 317 transgenik adayından 57 tanesi toprağa aktarıldı ve bunlardan 33 tanesi iklimlendirme aşamasında kaybedildi.
- Genomik DNA'ları *HvBor1a* ve *hpt* spesifik primerler ile yapılan PZR'de pozitif sonuç veren 14 transgenik adaya ait total RNA'lardan 6 tanesi RT-PZR'de pozitif sonuç verdi.
- Transgenik adayı T0'lara ait yaprak eksplantları letal higromisin derişimine yaban tipinden anlamlı şekilde farklı olarak direnç gösterirken; aynı T0'lara ait eksplantlar bor toksisitesi uygulaması altında yabani tip eksplantlar ile benzer sonuçlar verdiler (T0-T2P91 hariç).
- Toprağa aktarılan transgenik aday bitkilerin beşine ait tohumlar (T1) ile yapılan çimlendirme analizi sonucunda, transformasyonun gamet oluşumunu engellemediği ancak yabani tip tohumları ile karşılaştırıldığında T2P109 dışındaki T1'lerin yaban tipinden daha düşük çimlenme ve gelişme oranına sahip olduğu görüldü.

- Letal higromisin derişimine sahip besiortamında çimlendirilen yabancı tip tohumlar gelişemezken, T1'ler % 100'e kadar çimlenme ve % 80,4'e kadar ise gelişme gösterdi.
- Letal higromisin derişiminde çimlenen T1 tohumlarından T2P109'un dayanıklı:hassas oranı Mendel kalıtımına uygun şekilde 3:1 fenotipinde olduğu belirlendi. Diğer T1'lerin dayanıklı:hassas oranı 1:2 olarak hesaplandı.
- Toksik bor derişiminin uygulandığı T1 tohumlarının, T2P109 hariç, yabancı tip tohumlarına göre çimlenme oranının anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. T2P109 tohumları ise yabancı tipine yakın olarak %96,1 oranında çimlenme gösterdi. Ancak T1S38'e ait çimlenen bir tohum dışında, toksik seviyede bora maruz kalan hiçbir tohum gelişim gösteremedi.
- Diğer bor taşıyıcılarıyla yapısal benzerliği bulunan *HvBor1a* geninin boru hücre içine mi yoksa hücre dışına mı taşıdığı henüz bilinmemekle birlikte, çalışmada seçici ajan higromisine direnç gösteren transgenik adaylarının toksik seviyede bora aynı oranda tolerans gösterememesi, gen ürünü taşıyıcı proteinin, borun hücre içine taşınmasında görevli olabileceği yorumuna yol açmıştır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda tütün bitkisinde genin doku spesifik promotorlar kontrolünde transformasyonunun denenmesi anlamlı gözükmektedir. Ayrıca bor stresine karşı tolerans geliştirme uygulamalarının sadece bor toksisitesi değil, aynı zamanda bor eksikliği altında gerçekleştirilmesi, uygulanabilecek bir başka yaklaşım olacaktır. Bunlara ek olarak, elde edilen transgenik adayı tütün tohumlarından gelişen T1 bitkilerinin *HvBor1a* genini taşıdıklarının Southern blot analizi ile gösterilmesi, genin kalıtımının doğrulanması açısından önemlidir. *HvBor1a* geninin işlevinin bulunması, bu genin bor stresine tolerans mekanizmasındaki olası rolünü açıklayarak; bu bilgi ışığında ileride bor stresine karşı tolerans geliştirmede bu genden faydalanılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alkan, A., Kalayci M., Yilmaz A., Ekiz H., Torun B., Eker S. ve Çakmak İ., 1995. Değişik Arpa Genotiplerinde Bor Toksisitesinin Araştırılması. Arpa- Malt Sempozyumu (III) 5-7 Eylül, Konya.
2. Atik, A.E., Bozdag G.O., Akinci, E., Kaya, A., Koc, A., Yalcin, T., Karakaya, H.C., 2011. Proteomic Changes During Boron Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare*) and The Role of Vacuolar Proton Translocating Atpase Subunit E. Turk. J. Bot., 35: 379 – 388.
3. Basri, Z., 2005. Transgene Inheritance in Transgenic Wheat. Jurnal Matematika dan Sains, Vol 10: 1, 1-9,
4. Birch, R.G., 1997. Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 297-326.
5. Blaser-Grill, J., Knoppik, D., Amberger, A., Goldbach, H., 1989. Influence of Boron on The Membrane Potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ Extrusion of Suspension Cultured *Daucus carota* Cells. Plant Physiol., 90: 280 – 284.
6. Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M., 1998. Boron in Plant Structure and Function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 481-500.
7. Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeiffer, H., Dannel, F., Römheld, V., 2002. Boron in Plant Biology. Plant Biol., 4: 205 – 223.
8. Brown, P.H., Bellaloui, N., Hu, Dandekar, H.A., 1999. Transgenically Enhanced Sorbitol Synthesis Facilitates Phloem Boron

Transport and Increases Tolerance of Tobacco to Boron Deficiency, *Plant Physiol.*, 119: 17-20.

9. Cakmak, İ. and Römheld, V., 1997. Boron Deficiency-Induced Impairments of Cellular Functions in Plants. *Plant Soil*, 193: 71 – 83.

10. Cakmak, İ., Kurz, H., Marschner, H., 1995. Short-term Effects of Boron, Germanium and High Light Intensity on Membrane Permeability in Boron Deficient Leaves of Sunflower. *Physiol. Plantarum*, 95: 11 – 18.

11. Cartwright, B., Zarcinas, B.A., Mayfield, A.H., 1984. Toxic Concentrations of Boron in Red-Brown Earth at Gladstone, South Australia. *Aust. J. Soil Res.*, 22: 261 – 272.

12. Cartwright, B., Zarcinas, B., and Spouncer, L. 1986. Boron Toxicity in South Australian Barley Crops. *Australian Journal of Agricultural Research*, 37(4): 351-359 22.

13. Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Cuncan, D.R., Conner, T.W., Wan, Y., 1997. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.*, 115: 971-980.

14. Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Shewmaker, C.K., 1986. Integration of Foreign DNA Following Microinjection of Tobacco Mesophyll Protoplasts. *Molecular and General Genetics*, Vol. 202: 179-185.

15. Deroles, S.C., Gardner, R.C., 1988. Expression and Inheritance of Kanamycin Resistance in a Large Number of Transgenic Petunias Generated by *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Plant Mol. Biol.*, 11: 355-364.

16. Dugger, W.M., 1983. Boron in Plant Metabolism. In: Lauchli, A. and Bielecki, R.L. (Ed.) Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 15: pp 626 – 650.
17. Fromm, M., Taylor, L.P. and V., Walbot, 1985. Expression of Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells By Electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5824-5828.
18. Gan, C., 1989. Gene Gun Accelerates DNA-Coated Particles to Transform intact Cells. The Scientist, 3(18):25.
19. Ganapathi, T.R., Suprasanna, P., Rao, P.S., Bapat, V.A., 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A Model System for Tissue Culture Interventions and Genetic Engineering. Indian Journal of Biotechnology, 3: 171-184.
20. Goldbach, H.E. and Wimmer, M.A., 2007. Boron in Plants and Animals: Is There a Role Beyond Cell-Wall Structure? J. Plant Nutr. Soil Sci., 170: 39 – 48.
21. Goldberg, S., 1997. Reactions of Boron With Soils. Plant Soil, 193: 35 – 48.
22. Grevelding, C., Fantes, V., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R., 1993. Single-copy T-DNA Insertions in *Arabidopsis* are The Predominant Form of Integration in Root-Derived Transgenics, Whereas Multiple Insertions are Found in Leaf Discs. Plant Mol. Biol., 23: 847-860.
23. Hayashi, H., Alia, Sakamoto, A., Nonaka, H., Chen, T.H.H., Murata, N., 1998. Enhanced Germination Under High-Salt Conditions of Seeds of Transgenic *Arabidopsis* With A Bacterial Gene (Coda) For Choline Oxidase, J Plant Res., 111: 347-362.

24. Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T., 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Bio.*, 35: 205-218

25. Ho, C.K., Chang, S.H., Tsay, J.Y., Tsai, C.J., Chiang, V.L., Chen, Z.Z., 1998. *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and Production of Transgenic Plants. *Plant Cell Rep.*, 17: 675-680.

26. Hobbs, S.L.A., Warkentin, T.D., Delong, C.M.O., 1993. Transgene Copy Number can be Positively or Negatively Associated with Transgene Expression. *Plant Mol. Biol.*, 21: 17-26.

27. Holmström, K-O., Somersala, S., Mandal, A., Palva, T.E., Welin, B., 2000. Improved Tolerance to Salinity and Low Temperature in Transgenic Tobacco Producing Glycine Betaine, *J Of Exp Bot.*, 51, 343: 177-185.

28. Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eicholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T., 1985. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science*, 227: 1229-1231.

29. Hu, H., Brown, P.H., Labavitch, J.M., 1996. Species Variability in Boron Requirement is Correlated with Cell Wall Pectin. *J. Exp. Bot.*, 47: 227–232.

30. Huang, J., Hirji, R., Adam, I., Rozwadowski, K.L., Hammerlindl, J.K., Keller, W.A., Selvaraj, G., 2000. Genetic Engineering of Glycine Betaine Production Toward Enhancing Stress Tolerance in Plants: Metabolic Limitations, *Plant Physiol.*, 122: 747-756.

31. Hunt, C.D., 2002. Boron-Binding-Biomolecules: A Key to Understanding the Beneficial Physiologic Effects of Dietary Boron from Prokaryotes to Humans. In: Goldbach, H.E., Rerkasem, B., Wimmer, M.A.,

Brown, P.H., Thellier, M., Bell, R.W., (Ed.) Boron in Plant and Animal Nutrition. Kluwer Academic Publishers, New York, NY, pp 21 – 36.

32. Ishida, Y., Saito, H., Ohto, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T., 1996. High Efficiency Transformation of Maize (*Zea Mays* L.) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotech., 14: 745-750

33. James, C., 2005. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2005 ISAAA Briefs 34, Íthaca, NY.

34. Jorgensen, R., 1991. Silencing of Plant Genes by Homologous Transgenes. Agbiotech News Inf., 4: 265-273.

35. Jorgensen, R., 1993. The Germinal Inheritance of Epigenetic Information in Plants. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 339: 173-181.

36. Kajikawa, M., Fujibe, T., Uraguchi, S., Miwa, K., Fujiwera, T., 2011. Expression of the Arabidopsis Borate Efflux Transporter Gene, AtBOR4, in Rice Affects the Xylem Loading of Boron and Tolerance to Excess Boron. Bioxi. Biotechnol. Biochem., 75(12): 2421-2423.

37. Kalayci, M., Alkan, A., Cakmak, İ., Bayramoglu, O., Yilmaz, A., Aydin, M., Ozbek, V., Ekiz, H., Ozberisoy, F., 1998. Studies on Differential Response of Wheat Cultivars to Boron Toxicity. Euphytica, 100: 123–129.

38. Karabal, E., Yucel, M., Oktem, H.A., 2003. Antioxidant Responses of Tolerant and Sensitive Barley Cultivars to Boron Toxicity. Plant Sci., 164: 925 – 933.

39. Keren, R. and Bingham, F.T., 1985. Boron in Water, Soil and Plants. Adv. Soil Sci., 1:229-276.

40. Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Stanford, J.C., 1987. High Velocity Microprojectiles Delivering Nucleic Acids into Living Cells. *Nature*, Vol. 327: 70-72.
41. Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J., 1996. Two Chains of Rhamnogalacturonan II are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls. *Plant Physiol.*, 110: 1017 – 1020.
42. Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D.A., Christou, P., 1999. Transgene Expression in Rice Engineered Through Particle Bombardment: Molecular Factors Controlling Stable Expression and Transgene Silencing. *Planta*, 208: 88-97.
43. Kokko, H.İ., Kärenlampi, S.O., 1998. Transformation of Arctic Bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 17: 822-826.
44. Lamb, C.J., Beachy, R.N., 1989. Plant Gene Transfer in: Lamb, C.J., Beachy, R.N., (Eds), *Proceedings to a UCLA Symposium*, Utah, April 1-7. Wiley-Liss, NY.
45. Landers, J.P., Oda, R.P., Schuchard, M.D., 1992. Separation of Boron-Complexed Diol Compounds Using High Performance Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.*, 64: 2846 – 2851.
46. Li, L., Qu, R., Kochko, A.D., Fauquet, C., Beachy, R.N., 1993. An Improved Rice Transformation System Using The Biolistic Method. *Plant Cell Rep.*, 12: 250-255.
47. Limanton-Grevet, A., Jullien, M., 2001. *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Asparagus officinalis* L.: Molecular And Genetic Analysis Of Transgenic Plants. *Mol. Breed.*, 7: 141-150.

48. Marschner, H., 1976. Mineral Metabolism, Short And Long Distance Transport. *Fortschr. Botany*, 38: 71-80.
49. Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. P 889 Academic Press, New York.
50. Matoh, T., Ishigaki, K., Ohno, K., Azuma, J., 1993. Isolation and Characterization of a Boron-Polysaccharide Complex from Radish Roots. *Plant Cell Physiol.*, 34: 639 – 642.
51. McCabe, M.S., Mohapatra, U.B., Debnath, S.C., Power, J.B., Davey, M.R., 1999. Integration, Expression and Inheritance of Two Linked T-DNA Marker Genes in Transgenic Lettuce. *Mol. Breed.*, 5: 329-344.
52. Mengel, K. and Kirkby, E.A., 2001. Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 621 – 638.
53. Meyer, P., 1995. Variation of Transgene Expression in Plants. *Euphytica*, 85: 359-366.
54. Michael, G., Wilberg, E., Kouhsiahai-Tork, K., 1969..Boron Deficiency Induced by High Air Humidity. *Z. Pflanz. Bodenkunde*, 122: 1-3.
55. Miwa, K. and Fujiwara, T., 2010. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Ann. Bot.* 105: 1103 – 1108.
56. Miwa, K. and Fujiwara, T., 2011. Role of Overexpressed BOR4, a Boron Exporter, in Tolerance to High Level of Boron in Shoots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57:4, 558-565.
57. Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fujiwara, T., 2007. Plants Tolerant of High Boron Levels. *Sciense*, 318, 1417.

58. Nable, R.O., 1991. Distribution of Boron Within Barley Genotypes with Differing Susceptibilities to Boron Toxicity. *J. Plant Nutr.*, (Inpress).
59. Nakagawa, Y., Hanaoka, H., Kobayashi, M., Miyoshi, K., Miwa, K., Fujiwara, T., 2007. Cell-Type Specificity of The Expression of Os BOR1, A Rice Efflux Boron Transporter Gene, is Regulated in Response to Boron Availability for Efficient Boron Uptake and Xylem Loading. *The Plant Cell*, 19: 2624–2635.
60. Nebiler, H., Erdoğan, Y., Olgun, A., Yerlikaya, C., 1999. The Effects Of Boron İn Vineyard. 1st. Symposium on Protection of Environmental and Erhami Karaçam Kütahya-TURKEY.
61. Nigel, J., Taylor and Claude, M., Fauquet, 2002. Microparticle Bombardment As a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology DNA and Cell Biology. December, Vol. 21, No. 12: 963-977.
62. O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G., 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 109 – 139.
63. Ölçer, H., 2001. Transgenik Bitkiler: Tarımsal Uygulamaları, Üretim ve Tüketiminin Kontrolü. *Çev Kor, Cilt 10, 40: 21-24.*
64. Öz, M.T., 2012. Phd Thesis: Microarray Based Expression Profiling Of Barley Under Boron Stress And Cloning Of 3h Boron Tolerance Gene, Metu Press, Ankara.
65. Özkurt, Ş., 2000. Boron Accumulation in Carps Tissues (Cypriks Carpio L.,1758) in Dam Lakes Çatören and Kunduzlar (Körka-Eskişehir) *Turk J. Biol.*, 24: 663-676.

66. Parr, A.J. and Loughman, B.C., 1983. Boron and Membrane Function in Plants. In: Robb, D.A. and Pierpoint, W.S. (Ed.) Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants. Academic Press, London, UK, pp. 87 – 107.
67. Paszkowski, J., Shillito, R.D., Saul, M., Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, Ī., 1984. Direct Gene Transfer to Plants. EMBO Journal, Vol. 3 No. 12: 2717-2722.
68. Paull, J.G., Rathjen, A.J., Cartwright, B., 1988. Genetic Control of Tolerance to High Concentrations of Soil Boron in Wheat. In Proc. 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, UK, pp. 871-877.
69. Paull, J.G., Cartwright, B., Rathjen, A.J., 1988. Responses of Wheat and Barley Genotypes to Toxic Concentrations of Soil Boron, Euphytica, 39: 137-144.
70. Pollard, A.S., Parr, A.J., Loughman, B.C., 1977. Boron in Relation to Membrane Function in Higher Plants. J. Exp. Bot., 28: 831 – 841.
71. Raja, N.Ī., Bano, A., Rashid, H., Chaudhry, Z. ve Īlyas, N., 2010. Improving *Agrobacterium* Mediated Transformation Protocol for Integration of *Xa21* Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Pak. J. Bot., 42(5): 3613-3631.
72. Register III, J.C., Peterson, D.J., Bell, P.J., Bullock, W.P., Evans, Ī.J., Frame, B., Greenland, A.J., Higgs, N.S., Jepson, Ī., Jiao S., Lewnau C.J., Sillick J.M., Wilson H.M., 1994. Structure and Function of Selectable and Non-Selectable Transgenes in Maize After Introduction by Particle Bombardment. Plant Mol. Biol., 25: 951-961.
73. Reid, R., 2007. Update on Boron Toxicity and Tolerance in Plants. In: Xu, F., Goldbach, H.E., Brown, P.H., Bell, R.W., Fujiwara, T.,

Hunt, C.D., Goldberg, S., Shi, L., Eds. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 83–90.

74. Reid, R.J., Hayes, J.E., Post, A., Stangoulis, J.C.R., Graham, R.D., 2004. A Critical Analysis of The Causes of Boron Toxicity in Plants. *Plant Cell Environ.*, 25: 1405 – 1414.

75. Roosens, N.H., Willem, R., Li, Y., Verbruggen, Ī., Biesemans, M., Jacobs, M., 1999. Proline Metabolism in The Wild Type and in a Salt-Tolerant Mutant of *Nicotiana Plumbaginifolia* Studied By ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Imaging, *Plant Physiol.*, 121: 1281-1290.

76. Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Soluble Sugars—Metabolism, Sensing and Abiotic Stress. A Complex Network in The Life of Plants. *Plant Signal Behav.*, 4: 388 – 393.

77. Sakal, R., Singh, A.P., Singh, B.P., Sinha, R.B., Jha, S.N. and Singh S.P., 1985. Distribution of Available Micronutrient Cations in Calcareous Soils As Related to Certain Soil Properties. *Journal of The Indian Society of Soil Science*, 33: 672-675.

78. Sakamoto, A., Murato, N., 2000. Genetic Engineering of Glycinebetaine Synthesis in Plants: Current Status And Implications For Enhancement Of Stres Tolerance. *J Of Exp Bot.*, 51, 342: 81-88.

79. Schon, M.K., Novacky, A., Blevins, D.G., 1990. Boron Induces Hyperpolarisation of Sunflower Root Cell Membranes and Increases Membrane Permeability to K⁺. *Plant Physiol.*, 93: 566 – 571.

80. Shen, B., Jensen, R.G., Bohnert, H.J., 1997. Mannitol Protects Against Oxidation by Hydroxyl Radicals, *Plant Physiol.*, 115: 527-532.

81. Shorrocks, V., 1997. The Occurrence and Correction of Boron Deficiency. *Plant Soil*, 193: 121–148.
82. Sommer, A.L. and Lipman, C.D., 1926. Evidence on The Indispensable Nature of Zinc and Boron for Higher Green Plants. *Plant Physiol.*, 1: 231 – 249.
83. Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., Hawes, C., 2006. Rapid, Transient Expression of Fluorescent Fusion Proteins in Tobacco Plants and Generation Of Stably Transformed Plants. *Nat. Protoc.*, 1: 2019 – 2025.
84. Spencer, T.M., O'brien, J.V., Start, W.G., Adams, T.R., Gordon-Kamm, W.J., Lemaux, P.G., 1992. Segregation of Transgenes in Maize. *Plant Mol. Biol.*, 18: 201-210.
85. Stangoulis, J.C., Reid, R.J., Brown, P.H., Graham, R.D., 2001. Kinetic Analysis of Boron Transport in *Chara*. *Planta*, 213: 142 – 146.
86. Sunjung, P., 2006. Phd Thesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaf Disks: Evaluation of The Co-Cultivation Conditions to Increase B-Glucuronidase Gene Activity.
87. Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Mittler, R., 2005. Enhanced Tolerance to Environmental Stress in Transgenic Plants Expressing The Transcriptional Coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c. *Plant Physiology*, November 2005, Vol. 139: 1313-1322.
88. Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., Von Wire'N, N., Fujiwara, T., 2005. Endocytosis and Degradation of BOR1, A Boron Transporter of *Arabidopsis thaliana*, Regulated by Boron Availability. *Proceedings of The National Academy of Sciences, USA*, 102: 12276–12281.

89. Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., 2002. *Arabidopsis* Boron Transporter for Xylem Loading. *Nature*, 420: 337 – 340.
90. Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., Von Wirén, N., Fujiwara, T., 2006. The *Arabidopsis* Major Intrinsic Protein NIP5;1 is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development Under Boron Limitation. *Plant Cell*, 18: 1498 – 1509.
91. Thomas, J.C., Sepahi, M., Arendal, B., Bohnert, H.J., 1995. Enhancement of Seed Germination in High Salinity by Engineering Mannitol Expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.*, 18: 801-806.
92. Tingay, S., Mcelroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thorntin, S., Brettell, R., 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Barley Transformation. *Plant J.*, 11: 1369-1376.
93. Topping, J.F., Wei, W., Lindsey, K., 1991. Functional Tagging of Regulatory Elements in Plant Genome. *Development*, 112: 1009-1019.
94. Tuncer, T. 2006. Ms Thesis: Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) With Antimicrobial *Pflp* Gene and Analysis of Transgenic Plants, METU Press, Ankara.
95. Twyman, R.M., Christou, P., Stöger, E., 2002. Plant Biotechnology and Transgenic Plants, Edited by Oksman-Caldentey and Barz, W., Chapter 6 : 183-189.
96. Tzfira, T., and Citovsky, V., 2006. *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Plants: Biology and Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17: 147–154.
97. Warrington, K., 1923. The Effect of Boric Acid and Borax on The Broad Bean And Certain Other Plants. *Ann. Bot.*, 37: 629 – 672.

98. Weigel, D., Glazebrook, J., 2006. Transformation of *Agrobacterium* Using Electroporation. Coldspring Harb Protoc Doi: 10.1101/Pdb. Prot 4665.

99. Yan, X., Wu, P., Ling, H., Xu, G., Xu, F., Zhang, Q., 2006. Plant Nutriomics in China: an Overview. *Ann. Bot.*, 98: 473–482.

100. Yao, Q., Cong, L., Chang, J.L., Li, K.X., Yang, G.X. and He, G.Y., 2006. Low Copy Number Gene Transfer and Stable Expression in a Commercial Wheat Cultivar Via Particle Bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 57(14):3737-3746.

101. Ye, F., Signer, E.R., 1996. RİGS (Repeat-Induced Gene Silencing) in *Arabidopsis* is Transcriptional and Alters Chromatin Configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10881-10886.

102. Yin, Z., Malepszy, S., 2003. The Transgenes are Expressed With Different Level in Plants. *Biotechnologia*, 2 (61): 236-260.

103. Yin, Z., Plader, W. and Malepszy, S., 2004. Transgene Inheritance in Plants. *J.Appl.Genet*, 45,2:127-144.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Paris’te doğdu. İlköğretimi ve ortaöğretimini İstanbul’da tamamladı. Kartal Anadolu Lisesi’ni 2005 yılında ikincilikle bitirdi ve aynı yıl Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümüne birinci sırada girerek lisans eğitimine başladı. Marmara Üniversitesi’nden 2009 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda ve Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİTÇİ’nin danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı zamanda Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.