

IN VITRO KOŞULLARDA FASULYE BİTKİSİNE DÖRT YAPRAKLI AŞAMADA TRANSFORMASYON ÇALIŞMALARI

Sevil SAĞLAM¹ Cemalettin Yaşar ÇİFTÇİ¹ Khalid M. KHAWAR²
Mehmet ATAK¹ Sebahattin ÖZCAN¹

¹ Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara, Türkiye

² A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara, Türkiye
Sorumlu yazar E-posta adresi: yasev77@yahoo.com

Özet

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) dünya verilerine göre en fazla ekim alanına ve üretime sahip, yararlanma ve kullanma bakımından özellikle proteince zengin bir yemeklik tane baklagil bitkisidir. Fasulyenin Aras ve Eskişehir-855 çeşitleri laboratuvar koşullarında çimlendirilmiş ve dört yapraklı döneme geldiklerinde gövdeleri *Agrobacterium tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ve non-onkogenik GV2260, EHA105 hatları ile aşılansmıştır. Aşılama sonucunda A281 ile muamele edilmiş Aras ve Eskişehir-855 çeşitlerinde tümörler görülmüştür. Kökler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmamış ve köklerin normal gelişimine devam ettiği görülmüştür. Aynı şekilde her iki çeşidin *A. tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hatları ile aşılması sonucunda bitkilerin yapraklarında mozaiklik ve sararma görülmüştür. Bunlar GUS testine tabi tutulmuş fakat GUS pozitif sonuçlar elde edilememiştir. Bitkiler dört yapraklı aşamada iken *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile de aşılması ve bitkilerin gövdelerinde kökler görülmüştür. Bakteri aşılansmamış kontrol bitkilerinde köklenme görülmemiştir. *A. tumefaciens*'in onkogenik hatları ile bitkilerde tümör ve kök oluşumu *in planta* koşullarda gen aktarılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları fasulye bitkisinde genetik mühendisliği için gerekli alt yapıyı oluşturmaktadır. Onkogenik ve işaret genlerinin aktarılması sırasında kullanılan yöntem ilerde tarımsal ilaçlara, soğuga, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin fasulye bitkisine aktarılması yolunda da izlenebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Dört Yapraklı Bitkicik, *In Vitro*, Gen Aktarımı, Fasulye, *Agrobacterium*

Genetic Transformation of Common Beans at Four Leaves Stage under *in vitro* Conditions

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is highly rich in protein and is the most cultivated and consumed crop in the world. Two cultivars Aras and Eskişehir-855 of common bean were germinated under the laboratory conditions and inoculated with oncogenic A281 and non oncogenic GV2260 & EHA 105 lines of *Agrobacterium tumefaciens* at the four leaf stage at stems above the upper most node. As a result of inoculation with line A281, tumors were observed in cultivars Aras and Eskişehir-855. No abnormality was observed on roots of respective cultivars. When these cultivars were inoculated with non oncogenic GV2260 and EHA105 lines of *A. tumefaciens*, the leaves were clearly mosaic and yellow. These were tested for GUS gene but were not GUS positive. When the same cultivars were inoculated with the 15834 line of *A. rhizogenes*, they resulted in roots at the points of inoculation. No rooting was observed on the non inoculated control plants. The tumor formation and induction of roots with oncogenic lines of *Agrobacterium* indicate the possibility of genetic transformation under *in planta* conditions. The result of this study provides a necessary background for genetic transformation of common beans. It is expected that the method used for the gene transfer of oncogenes and nononcogenic marker genes could be effectively used for the genetic transformation to obtain resistant plants against agricultural chemicals, cold, disease and pests in the future.

Keywords: Four Leaved Plantlets, *In Vitro*, Genetic Transformation, Common Bean, *Agrobacterium*

1. Giriş

Yemeklik tane baklagiller yararlanma ve kullanma şekillerine göre özellikle proteince zengin bitkilerdir ve çeşitli cinslerin kuru taneleri bileşiminde, % 18-36 oranında protein kapsamaktadırlar. Aynı zamanda baklagiller A, B, ve D vitaminleri, fosfor, demir, kalsiyum ve potasyumca da zenginlerdir. Bütün bu avantajlarından dolayı, açlık ve yetersiz beslenme sorunu ile

karşı karşıya olan dünya nüfusu için baklagiller insan beslenmesinde önemli besin maddeleridir (Şehirli, 1988). Yetiştirildikleri toprağa *Rhizobium* türü bakterileri bağlayarak köklerinin yayıldığı toprak katlarını organik azotça zenginleştirirler (Elçi ve ark., 1994). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde Türkiye'de bugüne kadar yapılan doku

kültürü çalışmalarında çok fazla başarı elde edilememiştir. Bitki genetik mühendisliği teknikleriyle, orjinal bitkinin arzu edilen karakterlerini değiştirmeksizin bir ya da birkaç gen, yeni özellikler kazandırmak amacıyla kolayca aktarılabilir. Günümüzde *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* bakterileri ile özellikle çift çenekli bitki türlerine gen aktarımı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemde gen aktarım oranı bitki türlerine göre değişmekle birlikte oldukça düşüktür ve arzu edilen genin çalışılan kültür bitkisine aktarılabilmesi, öncelikle etkin bir gen aktarma sisteminin geliştirilerek uygulamaya konulmasına bağlıdır.

Rejenerasyon ve gen aktarım çalışmaları birbiri ile çok yakından ilgilidir. Fasulyeye doku kültürü yoluyla gen aktarım çalışmaları oldukça zordur. Bu çalışmanın amacı; yemeklik tane baklagiller içerisinde önemli bir yeri olan fasulye bitkisinin İç Anadolu ve Trakya Bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen Eskişehir-855 ve Aras çeşitlerinde *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* aracılığıyla doku kültürü ile rejenerasyona geçmeden *in planta* koşullarda yeni bir sistemi geliştirerek gen aktarım çalışmasını kolaylaştırmak amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak Eskişehir Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Aras ve Eskişehir-855 fasulye çeşitleri kullanılmıştır.

2.2. Büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde büyüme ortamları MS besin ortamına (Murashige ve Skoog, 1962) (MSO) % 3'lük sukroz ilave edilerek

hazırlanmıştır. Besin ortamının pH'sı, 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlanarak otoklavlamadan önce ortama % 0.8'lik agar ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (sitokin ve oksinler) de ilave edilmiştir. Ortamın sterilizasyonu otoklavda 1.2 atmosfer basınç ve 120 °C'de 20 dk. tutularak sağlanmıştır. Tüm kültürler Philips beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight- 42 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyot altında 24±2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

2.3. Fasulye tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesi ve *Agrobacterium materyali*

Steril edilen tohumlar yine steril petri kapları içerisinde MSO besin ortamında çimlendirilmiştir.

Çalışmada Çizelge 1'de verilen onkogenik A281 pTiBo 542 (Hood ve ark., 1986) *Agrobacterium* hattı, non-onkogenik *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* bakteri hatları kullanılmıştır.

2.4. Histokimyasal GUS Analizi

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'ın tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH 7.0), 10 mM EDTA, % 0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 38 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular % 100'lük alkolde yıkanarak mavi bölge belirlenmiştir.

2.5. Dört yapraklı bitkiciklere gen aktarımı

Aras ve Eskişehir-855 çeşitleri laboratuvar koşullarında çimlendirilmiş ve dört yapraklı döneme geldiklerinde her iki çeşidin yapraklarının hemen altındaki birinci

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan bakteri hatları ve özellikleri (Hood ve ark., 1986; Özcan, 1993)

Bakteri Hattı (Seçici Antibiyotik)	Yardımcı Plazmid (Seçici Antibiyotik)	İkili Vektör (mg/1 km)	Bitki Seleksiyonu (mg/1)
100 mg/l rif GV2260	50 mg/l cb pGV2260	50 p35S GUS-INT	50-100 km
A281	pTiBo542	25 pBI 121.1	0.5-1.0 bas/fos
EHA 105	pTiBo542	500 p35S GUS INT	50-200 km
100 mg/l rif 15834	pRI 15834	25 pRGGbar#2	20-50 hyg

rif=rifampisin, km= kanamisin, bas= basta, fos=fosfinotrisin, hyg= hygromisin.

Çizelge 2. *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* bakteri hatlarıyla muamele edilen fasulyenin Aras ve Eskişehir-855 çeşitlerinin dört yapraklı bitkiciklerinin gen aktarımına ait ortalamalar

Bakteri hatları	Morfolojik değişiklikler	Fasulye çeşitleri	
		Aras	Eskişehir
<i>A. tumefaciens</i> 'in onkogenik A281 hattı	Tümör yüzdesi (%)	100.00±0.00	100.00±0.00
	Tümör çapı (cm)	2.05±0.09	3.11±0.10
<i>A. tumefaciens</i> 'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hatları	Mozaiklik ve sararma (%)	100.00±0.00	100.00±0.00
	Saçak kök yüzdesi (%)	100.00±0.00	100.00±0.00
<i>A. rhizogenes</i> 'in onkogenik 15834 hattı	Saçak kök sayısı (adet)	4.50±0.31	0.95±0.12
	Saçak kök uzunluğu (cm)	3.51±0.08	2.01±0.13

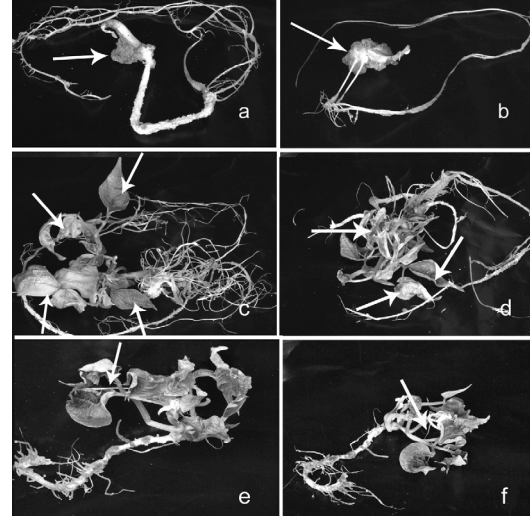
koltukaltı meristem bölgesi *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı, non-onkogenik GV2260, EHA105 hatları ve *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile steril iğne kullanılarak aşılanmıştır. Aşılanmış bitkiler karanlık ortamda iki hafta boyunca 24±2 °C'de bekletilmiştir. Her iki çeşit için her bakteri hattı üç tekerrürlü olmak üzere ve 6 adet kontrol bitkisi ile toplam 30 adet bitki kullanılmıştır.

2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Bu denemede elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla means (ortalama) analizine tabi tutulmuştur.

3. Tartışma ve Sonuç

A. tumefaciens'in onkogenik A281 hattı ile aşılanmış Aras çeşitinde 2.05±0.09 cm ve Eskişehir-855 çeşitinde ise 3.11±0.10 cm'lik tümörler görülmüştür (Çizelge 2). Her iki çeşitte % 100 tümör oluşumu gözlenmiştir. Tümörlerin gelişmesine paralel olarak yapraklarda çürümelere meydana gelmiştir. A281'in kökleri üzerinde herhangi olumsuz etkisine rastlanmamış ve köklerin normal gelişimine devam ettiği görülmüştür (Şekil 1a, b). Aynı şekilde her iki çeşit *A. tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hatları ile aşılanmıştır. Aşılanma sonucunda bitkilerin yapraklarında mozaiklik ve sararmalar görülmüştür (Şekil 1c, d). Yapraklar GUS testine tabi tutulmuş fakat GUS pozitif sonuçlar alınamamıştır. Bitkiler dört yapraklı aşamada iken gövdeleri, *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile de aşılanmış ve Aras çeşitinde 4.50±0.31 adet ve 3.51±0.08 cm, Eskişehir-855 çeşitinde ise 0.95±0.12 adet ve 2.01±0.13 cm saçak kökleri görülmüştür.



Şekil 1. Fasulye'nin Aras ve Eskişehir-855 çeşitlerinin dört yapraklı bitkiciklerine gen aktarımı. *A. tumefaciens*'in A281 hattının etkisiyle (a) Aras ve (b) Eskişehir-855 çeşitlerinden elde edilen tümörler. Non-onkogenik *A. tumefaciens*'in GV2260 hattının etkisiyle (c) Aras ve (d) Eskişehir-855 çeşitlerinin yapraklarında mozaiklik ve sararma. *A. rhizogenes*'in 15834 hattının etkisiyle (e) Aras ve (f) Eskişehir-855 çeşitlerinin gövdelerinde gelişen kökleri ve yapraklarda sararma ile mozaiklik.

Aşılanma sonucunda yapraklarda sararma ve mozaiklik gözlenmiştir (Şekil 1e, f). Bakteri aşılanmamış kontrol bitkilerinde köklenme görülmemiştir. *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* ile aşılanma sonucunda meydana gelen tümör ve kökleri *in planta* koşullarda gen aktarılabilirliğini göstermektedir. *A. tumefaciens*'in non-onkogenik hatlarıyla muamele ile bitki morfolojisinde görülen değişikliklerin ve GUS pozitif sonuçlar elde edilememesinin sebebi olarak transgenik dokularda metilasyon'un olduğu düşünülmektedir. Metilasyon *Ti*-plazmid esaslı bitki transformasyonlarında her zaman ekspresyon yapmamaktadır (Hepburn vd 1983). Benzer şekilde Havas ve ark. (2004) fasulye bitkisinin çiçek

saplarına *Agrobacterium* yoluyla transformasyon gözlemiştir. *A. tumefaciens*'in A281 hattının ve *A. rhizogenes*'in 15834 hattının etkisiyle meydana gelen ana köklerin normal fakat yan köklerin az olduğu görülmüştür. *A. tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hattının etkisiyle meydana gelen köklerde ise herhangi bir anormallik görülmemiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler tarımsal ilaçlara, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin fasulye bitkisine aktarılarak bu

yöntemle transgenik fasulye bitkilerinin geliştirilebilmesini mümkün kılacaktır. Bu yöntem, fasulye bitkisinin kullanılan her iki çeşitinde de transformasyon çalışmalarında kullanılması önerilebilmektedir.

Teşekkürler

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi'ne ve DPT'ye (Proje No. 98 K 120640 ve 2001 K 120240) sağlamış oldukları maddi desteklerden dolayı teşekkür ediyoruz.

Kaynaklar

- Elçi, Ş., Kolsarıcı, Ö. ve Geçit, H. H. 1994. Tarla bitkileri. Ankara Üni. Zir. Fak. Yayınları: 1385, Ankara, s, 239
- Havas, I., Bisztray, G. Y. D. and Velich, I. 2004. Attempts for the transformation of bean (*Phaseolus vulgaris*) 5th IVHCB symposium. In vitro culture and horticultural breeding. Biotechnology as theory and practice in horticulture. Debrecen. Hungary, s, 15.
- Hepburn, A. G., Clarke, R. E., Pearson, L. and White, J. 1983. The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor, J Mol. Appl. Genet., 2: 315-329.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. 1986. The hyper virulence of

Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTi Bo542 outside of T- DNA. J. Bacteriol., 168: 1291-1301.

- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep., 5: 387-405.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum., 15: 473-497.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation (Ph.D. Thesis), University of Leicester, U.K.
- Şehirali, S. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara Üni. Zir. Fak. Yayınları: 1089, Ankara.