

*ARABIDOPSIS THALIANA* TİYAMİN  
TRANSFORMANTININ KALITIM  
ANALİZİ

Hülya SİPAHİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

1997

58242

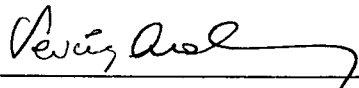
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARABİDOPSIS THALIANA TİYAMİN TRANSFORMANTININ  
KALITIM ANALİZİ


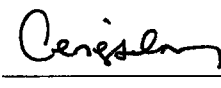
Hülya SİPAHİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ZOOTEKİNİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14.10./1997 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından ..95(Doksanb) not takdir edilerek oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Dr. Sevinç ASAL  
(Danışman)

Prof. Dr. Şevki YAZGAN  
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Cengiz ELMACI  
(Üye)

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****ARABIDOPSIS THALIANA TIYAMİN TRANSFORMANTININ  
KALITIM ANALİZİ****Hülya SİPAHİ****Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Zootekni Anabilim Dalı****Danışman: Prof.Dr.Dr.Sevinç ASAL  
1997, Sayfa: 33****Jüri: Prof.Dr.Dr.Sevinç ASAL  
Prof.Dr.Şevki YAZGAN  
Yrd.Doç.Dr.Cengiz ELMACI**

Bu çalışmada, daha önce yapılan bir doktora çalışmasında elde edilen *Arabidopsis thaliana* tiyamin transformantının kalıtım analizi yapılmıştır. Transformantın 22 tane F<sub>1</sub> tohumundan gelişen 21 bitkiden mutant fenotip gösteren 5 tanesi ölmüştür. Gelişimlerini tamamlayan 16 tane F<sub>1</sub> bitkisinin kendilenmeleri, yabancı tip ve mutant bitkilerle yabancı melezlemeleri yapılmıştır. Melezlemelerden elde edilen F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonlarında gözlenen açılmalardan F<sub>1</sub> bitkilerinden 8 tanesinin tiyamin sentezi bakımından homozigot, 5 tanesinin *py* mutasyonu bakımından homozigot, 3 tanesinin de tek lokusda heterozigot olabilecekleri düşünülmüştür.

Transformantdan 3 generasyon boyunca tiyamin sentezleyebilen döllerin elde edilmesi, transformasyonun kararlılığını göstermiştir. F<sub>1</sub> döllerindeki fenotipik açılma oranlarından, ekzogen DNA'nın bir ya da iki kopya halinde genoma entegre olarak Mendel oranlarına uygun açılmalarla döllere aktarıldığı görülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELEER:** *Arabidopsis thaliana*, DNA transformasyonu kalıtım analizi

**ABSTRACT****Master Thesis****INHERITANCE ANALYSIS OF THIAMINE  
TRANSFORMANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA*****Hülya SİPAHİ****Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Animal Sciences****Supervisor: Prof.Dr.Dr.Sevinç ASAL  
1997, Page: 33****Jury: Prof.Dr.Dr.Sevinç ASAL  
Prof.Dr.Şevki YAZGAN  
Asst.Prof.Dr.Cengiz ELMACI**

**In this study, inheritance analysis of thiamine transformant of *A. thaliana* obtained in previous Ph D study were performed. Sixteen out of twentytwo  $F_1$  seeds developed normally, like wild type, but the other five of the  $F_1$  plants with mutant phenotype died following cotyledon stage. Selfing and cross fertilizations of sixteen normally growing  $F_1$  plants with wild type and mutant plants were done for the inheritance analysis. From the segregations obtained in  $F_2$  and  $F_3$  generations, it could be concluded that eight of all the  $F_1$  plants were homozygous from the point of view of thiamine synthesis, five of the  $F_1$  plants were homozygous regarding to *py* mutation and three of the  $F_1$  plants were heterozygote at single locus.**

**Obtaining the progeny can synthesize thiamine during three generations show the stability of transformation. The phenotypic segregation ratios observed in  $F_1$  progenies confirm that one or two copies of exogenous DNA integrated into the plant genom and segregated in accordance with Mendelian ratios.**

**Key words: *Arabidopsis thaliana*, DNA transformation, inheritance analysis**

## TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, denemelerin kurulması ve sonuçların değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı danıőmanım Prof.Dr.Dr.Sevinç ASAL'a, çalıőmalarımnda destek ve yardımlarımı gördüğüm Dr.Őerife KOCABAŞ'a, Araç.Gör.M.Ali YILDIZ'a ve Araç.Gör.Oya AKIN'a, tezimin yazımını gerçekleőtiren Sayın Uzman Mücahit ŐAR'a ve bütün Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı mensuplarına teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. Bitkilere Gen Aktarım Yolları .....	3
2.2. Ekzogen DNA'nın Genoma Entegrasyonu, Ekspresyonu ve Döllere Aktarımı .....	5
2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) HEYNH Model Bitki Sistemi .....	8
2.3.1. Taksonomisi ve Biyolojisi .....	9
2.3.2. Genetiği ve Tiyamin Mutantları .....	10
2.3.3. Genetik Transformasyon Çalışmaları .....	12
3. MATERYAL VE METOT .....	14
3.1. Materyal .....	14
3.2. Metot .....	14
3.2.1. Tohumların Depolanması ve Yüzey Sterilizasyonu .....	14
3.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi .....	14
3.2.3. Bitkilerin Melezlenmesi .....	15
3.2.4. Kalıtım Analizleri .....	15
3.2.5. İstatistik Analiz .....	16
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	17
KAYNAKLAR .....	28
ÖZGEÇMİŞ	

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

- Şekil 2.1. *A. thaliana* model bitki sisteminde tiyamin biyosentez yolunun ana basamakları ve ilgili lokuslar ..... 11
- Şekil 4.1. Toprak ve aseptik gelişme ortamında yetiştirilen *A. thaliana* (*Ler*, yabani tip) bitkisinde (a) 1., (b) 2., (c) 3. ve (d) 5. haftalardaki gelişme durumu ..... 18
- Şekil 4.2. Tiyamin içermeyen toprak (a) ve aseptik (b) gelişme ortamında yetiştirilen *py* mutantlarının 2. haftadaki gelişme durumu ..... 20

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. F <sub>1</sub> bitkilerinin kendilenme ve melezleme grupları .....	16
Çizelge 4.1. Melezleme sonuçları .....	22





## 1. GİRİŞ

Tıp ve eczacılıktan, tarım ve endüstriye kadar birçok alanda uygulamaya yönelik genetik araştırmaların önemi giderek artmaktadır. Genetik materyale müdahale ile hızla gelişen ve nüfusu artan dünyanın beslenme ihtiyacını karşılayacak, hastalık ve zararlılara dayanıklı, değişik çevre faktörlerine toleranslı, yüksek verimli yeni bitki tür ve çeşitlerin ıslahı konusunda önemli ilerlemeler sağlanmaktadır.

Genetik, hücre ve moleküler biyoloji alanlarında özellikle rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler sayesinde bitki yetiştiricilerinin değişik isteklerini karşılayabilecek genom manipulasyonlarının gerçekleştirilmesi mümkün hale gelmektedir. Yeni gen teknolojileri kullanılarak bitki genlerinin izolasyonu, manipulasyonu, farklı biyolojik sistemlere aktarılması ve burada istenen düzeyde ekspresyonu sağlanabilmektedir. Günümüzde geliştirilen gen aktarım (genetik transformasyon) metodları ve gen vektör sistemleri ile organizmalardan izole edilen, saflaştırılan ve klonlanan genetik materyal (ekzogen DNA) bir çok çift çenekli ve bazı tek çenekli bitkilere aktarılarak, genoma kararlı entegrasyonu ve ekspresyonu sağlanabilmiştir.

Bitki hücrelerine aktarılan ekzogen DNA'lar genellikle çekirdek genomuna entegre olarak Mendel kalıtım modelinde (Otten et al 1981, Horsch et al 1983, De Block et al 1984, Budar et al 1986, Spielman and Simpson 1986, Wallroth et al 1986), bazen de çekirdek dışı genomlara (örneğin kloroplast DNA'sı) entegre olarak maternal kalıtım modelinde (De Block et al 1985) döllere aktarılmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunda genoma aktarılan ekzogen DNA'ların yüksek mayotik kararlılıkla döllere iletildiği görülse de, bazı çalışmalarda mayoz bölünme esnasında kaybolduğu veya inaktif olduğu durumlarla da karşılaşmıştır (Potrykus et al 1985, Budar et al 1986, Damm et al 1989).

Mısır, tütün, domates gibi ekonomik açıdan önemli bitki türlerinde yapılan genetik transformasyon çalışmalarında, bu türlerin generasyon sürelerinin uzun olması ve yetiştirilmeleri için geniş alanlara gereksinim duyulması gibi bir takım güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle bu tür çalışmalar *Petunia hybrida*,

*Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis thaliana* gibi çeşitli model bitki sistemleri üzerinde yapılmakta ve geliştirilen yöntemler tüm bitkilere uygulanacak düzeye getirilmeye çalışılmaktadır.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı Genetik araştırma laboratuvarında daha önce yapılan "*Arabidopsis thaliana* Tiyamin Mutantlarında Bakteriyal DNA ile Transformasyon" konulu doktora çalışmasında *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. model bitki sisteminin B<sub>1</sub> vitamini (tiyamin) gereksinimli hatlarından *py* mutanlığı tohumlarına *Escherichia coli* K12'nin komple genomunun doğrudan (herhangi bir vektör sistemi kullanılmaksızın) aktarımı ile tiyamin sentezi bakımından transformant bir bitki elde edilmiştir (Kocabaş 1997).

Bu çalışmada da, transformant bitkinin F<sub>1</sub> döllerinde kendilenmeler, orijinal yabancı tip ve mutant bitkilerle yabancı melezlemeler yapılarak transformasyonun kararlılığı, yani ekzogen DNA'nın bitki genomuna stabil olarak entegre olup olmadığı ve döllere aktarımı konusunda (kalıtım modeli) bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır .

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitkilerin kültüre alınmasıyla başlayan ve tarihi çok eskilere giden bitki ıslahında, basit Mendel ilkelerine dayanan klasik yöntemlerin uygulanması sonucu büyük bir aşama kaydedilmiştir. Bitki yetiştiricileri popülasyonlardaki doğal varyasyonlardan ya da mutagen uygulamalarıyla oluşturulmuş yapay varyasyonlardan yararlanarak seleksiyon veya melezleme ile istenen özelliklere sahip yeni çeşitler geliştirmişlerdir. Ancak klasik ıslah yöntemlerinde, istenen özellikteki bireylerin elde edilmesi için çok sayıda bitki materyali ile generasyonlar boyunca süren seleksiyon programlarına gereksinim duyulması, üzerinde durulan özelliklerle birlikte istenmeyen özelliklerin de bitkiye aktarılması ve tür ile cinsler arasındaki melezlemelerin genellikle eşeysel uyumsuzluklar nedeniyle gerçekleştirilememesi gibi sebeplerden dolayı her zaman arzulanan seviyede başarıya ulaşılamamaktadır. Bu nedenle ıslahtaki başarının yükseltilmesi ve istenilen verim düzeyine ulaşılması için klasik ıslah yöntemlerinin yanında modern gen teknolojilerinden de yararlanılması zorunluluk haline almıştır. Bu bağlamda bitki ıslahındaki başarıyı artırıcı çeşitli alternatiflerden biri de genetik mühendisliği uygulama alanlarına giren genetik transformasyonlardır. Son yıllarda çeşitli genetik transformasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle melezleme yapılmaksızın farklı türden organizmalar arasında gen aktarımları yapılarak arzu edilen özelliklere sahip bireylerin elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Genetik transformasyonların yapılabilmesi için ilk aşama verici (donör) organizmadan genetik materyalin izolasyonu, izole edilen genetik materyalin saflaştırılması ve çok sayıda kopyasının elde edilmesidir. Bu aşamalardan sonra saflaştırılmış ve klonlanmış genetik materyal farklı organizmalar arasında yapılacak gen aktarımlarında kullanılmaktadır.

### 2.1. Bitkilere Gen Aktarım Yolları

Bitkilerin genetik transformasyonlarında en yaygın kullanılan araç *Agrobacterium*'dur. Yaralanmış dokuların varlığında *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes*,

bitkileri enfekte ederek sahip oldukları Ri veya Ti plazmidinde yer alan T-DNA (transfer DNA) olarak adlandırılan bölgeyi bitki hücrelerine aktarmaktadırlar (Grant et al 1993). T-DNA'da enfeksiyon bölgesinde tümör ve saçak kök oluşumuna yol açan genler yer almaktadır. Bu genleri restriksiyon enzimlerle delesyona uğratılmış T-DNA'lara yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının bitki hücrelerine aktarılması mümkün olmaktadır.

Tütün, domates, patates ve *Arabidopsis* protoplastlarının *A. tumefaciens*'le (Müller et al 1984, Hain et al 1985, Krens et al 1985, An et al 1986, Wallroth 1986, Damm et al 1989), domates protoplastlarının da *A. rhizogenes*'le (Shahin et al 1986, Sukhapinda et al 1987) birlikte kültüre alınması sonucunda transformant bitkiler elde edilmiştir. Doku kültürlerinde protoplastlardan bitki rejenerasyonu kolay olmayan türlerde ise yaprak disklerinin *Agrobacterium* ile transformasyonu denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Otten et al 1981, Spielman 1986, Lloyd et al 1986, Müller et al 1987). *Arabidopsis thaliana*'nın çimlenen tohumlarının *Agrobacterium* ile transformasyonu Feldman ve Marks (1987) tarafından denenmiş ve 5000 tane tohumdan 200 tane transformant bitki elde edilmiştir.

Virüslerin tek çenekli bitkiler dahil birçok bitki türünü enfekte edebilmeleri bunların bitkilere gen aktarımında vektör olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Goodman et al 1987, Weising et al 1988). İlk defa 1984'de CaMV aracılığıyla bakteriyel bir marker geni bitkilere aktarılmış ve ekspresyonu sağlanmıştır (Brisson et al 1984).

*Agrobacterium* aracılığıyla birçok çift çenekli bitkide genetik transformasyonların başarıyla gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, tek çenekli bitkilerde istenilen başarıya henüz ulaşılammıştır. Ancak protoplast, hücre ve dokulara doğrudan gen aktarım yöntemlerinin geliştirilmesiyle hem çift hem de tek çenekli bitkilerin genetik transformasyonları başarıyla yapılabilmektedir.

Bitki protoplast, hücre ve dokularına doğrudan gen aktarımında farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler,

- . DNA taşıyan liposomların protoplastlarla füzyonu,
- . kimyasal maddeler yardımıyla protoplastlara plazmid aktarımı,
- . DNA'nın bitki hücrelerine mikroenjeksiyonu,

- . elektroporasyonla protoplastlara DNA aktarımı,
- . hızlandırılmış partiküllerle hücre ve dokulara DNA aktarımı,
- . hücre, doku, tohum veya embriyoların DNA çözeltisi içinde inkübasyonu şeklinde sıralanabilmektedir (Potrykus 1993, Webb and Morris 1994).

Doğrudan gen aktarım yöntemlerinin kullanılmasıyla pirinç, soğan, tütün, mısır, çavdar, yonca ve *Arabidopsis* gibi birçok bitki türünde transformant bitkiler elde edilmiştir (Crossway et al 1986, Reich et al 1986, Feldmann and Marks 1987, Klein et al 1987, De La Pena et al 1987, Rhodes et al 1988, Shimamoto et al 1989, Gordon-Kamm et al 1990).

## **2.2. Ekzogen DNA'nın Genoma Entegrasyonu, Ekspresyonu ve Döllere Aktarımı**

Bitki ıslahında, bitki hücrelerine aktarılan ekzogen DNA'ların genoma entegrasyonunun ve ekspresyonunun araştırılması, gen ekspresyonunun artırılması veya düzenlenmesi ile genetik regülasyon mekanizmalarının anlaşılması bakımından önem taşımaktadır (Weising et al 1988).

Ekzogen DNA'nın genoma entegrasyonu, ekspresyonu ve kalıtımı çeşitli teknikler kullanılarak saptanabilmektedir.

Ledoux et al (1971) otoradyografik teknikleri kullanarak bitki hücrelerine aktarılan radyoaktif işaretli ekzogen DNA'nın çekirdek veya organel genomlara entegrasyonunu araştırmışlardır.

Günümüzde transformasyon denemelerinde transformant hücrelerin ve bunlardan elde edilen sürgünlerin seçimi için antibiyotik ve herbisitlere karşı dayanıklılık gibi çeşitli dominant işaret (marker) genleri geliştirilmiştir. Kullanılan marker gene uygun seçici ortamlarda DNA ile muamele edilen protoplast, hücre veya dokulardan bitkilerin rejenere olabilmesi bu bitkilerin transforme edildiğine ilişkin bir kanıttır. Ancak bitki doku kültürlerinde birçok kimyasala karşı dayanıklılık kazanmış spontan varyantlar da ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle ekzogen DNA'nın genomdaki entegrasyonunu ve ekspresyonunu gösterecek biyokimyasal ve moleküler analizlerin yapılması gerekmektedir.

Ekzogen DNA'nın konakçı hücre genomunda hangi bölge/bölgelere ve kaç kopya halinde entegre olduğu Southern hibridizasyon analizleri kullanılarak saptanabilmektedir. *Agrobacterium* ya da doğrudan gen aktarım metodlarının kullanılmasıyla elde edilen transformant tütün (Fraley et al 1983, De Block et al 1984, Potrykus et al 1985, Wallroth et al 1986, Müller et al 1987), mısır (Rhodes et al 1988), domates (Shahin et al 1986, An et al 1986) ve *Arabidopsis* (An et al 1986, Feldmann and Marks 1987) gibi bitkilerde Southern hibridizasyon analizleri ile ekzogen DNA'nın genomdaki entegrasyonu ve kopya sayısı gösterilmiştir.

Bitki hücrelerine aktarılan ekzogen DNA'lar genoma aynı veya farklı kromozom/kromozomlar üzerine bir ya da birden fazla bölgeye rastgele entegre olmaktadır. Wallroth et al (1986), 6 tane transformant *Petunia hybrida* bitkisinin Southern hibridizasyon analizleri ve genetik haritalamaları sonucunda T-DNA'nın bitkilerin üçünde 1. kromozomda, ikisinde 3. kromozomda, birisinde de 4. kromozomda yer aldığını ve bu bitkilerin 4'ünde T-DNA'nın tek kopya, 2'sinde de iki kopya halinde bulunduğunu gözlemişlerdir. Günümüzde homolog rekombinasyon ile ekzogen DNA'nın bitki genomunda daha önceden belirlenen bir bölgeye entegrasyonun gerçekleştirilebileceği sistemler de geliştirilmektedir (Paszkowski et al 1988).

Bitki hücrelerine aktarılan ekzogen DNA'lar genoma entegre olmadan hemen önce ya da entegrasyondan sonra bir takım modifikasyonlar geçirebilirler. Spielman and Simpson (1986) elde ettikleri transformantların Southern hibridizasyon analizleri sonucunda bu transformantların bazılarında genomdaki T-DNA'ların yeniden düzenlenmeler veya ters tekrarlar şeklinde bulunduğunu görmüşlerdir.

Ekzogen DNA'nın genomdaki ekspresyonu Nouthern analiz, Western blotting veya enzim denemeleri ile gösterilmektedir. Nouthern analiz ile ekzogen DNA'nın oluşturacağı RNA transkriptinin varlığı, Western blotting ile de ekzogen DNA'nın translasyon ürünlerinin varlığı yani RNA transkriptinin proteine çevrilip çevrilmediği tespit edilmektedir. Enzim denemelerinde ise aktarılan gene özgü fonksiyonel bir proteinin varlığı elektroforetik olarak belirlenmektedir.



Weising et al (1988) uygun promotör elementleri taşımayan bakteri genlerinin bitki genomuna entegre olmasına rağmen, ekspresyonlarının söz konusu olmadığını bildirmektedir. Bu nedenle, bakteri genlerinin bitki hücrelerinde yeterli düzeyde ekspresyonunun sağlanması için uygun promotör, terminatör ve translasyon başlatıcı bir bölgenin aktarılacak gene ilavesi önem taşımaktadır.

Tütün, domates ve çavdarda *nos* promotörünün kontrolü altında neomisin fosfotransferaz (NPT) geninin ekspresyonu; *Arabidopsis* ve pirinçde de CaMV 35S RNA promotörünün kontrolü altında  $\beta$ -glukuronidaz geninin ekspresyonu, bu genlere özgü enzimlerin aktivitesinin elektroforetik olarak tespit edilmesiyle gösterilmiştir (Hain et al 1985, Şahin et al 1986, Sukhapinda et al 1987, Damm et al 1989, Şimamoto et al 1989).

Transformant bitkiler ekzogen DNA'yı değişik düzeyde eksprese ederler. Gen ekspresyon düzeyi, ekzogen DNA'nın kopya sayısına, entegrasyon bölgesine (pozisyon etkisi), DNA metilasyonuna ve konakçı genomdaki trans-etkili faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Weising et al 1988).

Transformasyonun kalıtımına ilişkin analizlerden yani döllerde elde edilen genetik açılma oranlarından ekzogen DNA'nın genomdaki yeri, fonksiyonel kopya sayısı ve stabil olarak döllere aktarılıp aktarılmadığı hakkında bilgiler edinilmektedir. Ekzogen DNA'nın çekirdek genoma entegre olması halinde kopya sayısının 1, 2, 3 ve 4 olma durumuna göre, transformantın kendilenmesiyle elde edilen F<sub>1</sub> dölllerinde 3:1, 15:1, 63:1 ve 255:1 açılmaları elde edilmektedir. Çeşitli transformasyon teknikleri kullanılarak domates, tütün, *Arabidopsis*, pirinç ve çavdar bitkilerinde elde edilen transformantlarda çekirdek genoma entegre olan ekzogen DNA'lar ya tek bir ya da birden fazla bağımsız fonksiyonel dominant genin varlığında elde edilebilecek kalıtım modelleri vermiştir (Horsch et al 1983, Hain et al 1985, Potrykus et al 1985, Şahin et al 1986, Feldmann and Marks 1987, Sukhapinda et al 1987, Uchimiya et al 1987, Müller et al 1987, Damm et al 1989, Şimamoto et al 1989).

Genetik transformasyon çalışmalarının bir çoğunda genoma entegre olan ekzogen DNA'ların yüksek mayotik kararlılıkla döllere aktarıldığı görülse de, tütün, domates, *Arabidopsis* gibi bitkilerde elde edilen transformantların bazılarında

genoma entegre olan ekzogen DNA'ların mayoz bölünme esnasında kaybolduğu veya inaktif olduğu durumlarla da karşılaşmıştır (Potrykus et al 1985, Budar et al 1986, Sukhapinda et al 1987, Damm et al 1989).

Herhangi bir genetik transformasyon tekniği kullanılarak bitki hücrelerine aktarılan ekzogen DNA'lar bazen çekirdek dışı yani ekstra-kromozomal genomlara entegre olurlar ve maternal kalıtım modeli gösterirler. Tütün bitkisinde yapılan bir çalışmada elde edilen transformant bitkilerin yabancı tip bitkilerle resiprokal melezlemeleri yapılmış ve ekzogen DNA'nın transformantın dışı ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemeden elde edilen döllere aktarıldığı, polenler aracılığı ile döllere aktarılmadığı gözlenmiştir. Bu durumda ekzogen DNA'nın muhtemelen kloroplast DNA'sına entegre olduğu düşünülmüştür (De Block et al 1985).

### 2.3. *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Model Bitki Sistemi

*Arabidopsis thaliana*, *Cruciferae* familyasına ait otsu bir bitkidir. Bu bitki sahip olduğu uygun özellikleri nedeni ile yaklaşık kırk yıldır klasik ve moleküler genetik çalışmalarında deney materyali olarak kullanılmaktadır. Bu özellikler,

- . generasyon süresinin kısa olması,
  - . küçük bir alanda çok sayıda bitkinin yetiştirilebilmesi,
  - . bir bitkiden yaklaşık 10.000 tohum alınabilmesi,
  - . laboratuvar koşullarında aseptik gelişme ortamları veya toprakta floresan ışık altında kolaylıkla yetişebilmesi,
  - . doku kültürlerinde bitki rejenerasyonunun kolay olması,
  - . haploid kromozom sayısının sadece 5 ( $2n = 10$ ) olması,
  - . genom büyüklüğünün tüm yüksek bitkilerin genomundan daha küçük olması
- ve genomda tekrarlanan DNA sıralarının az olması,
- . çok sayıda ekolojik varyantlarının bulunması şeklinde sıralanabilir.



### 2.3.1. Taksonomisi ve Biyolojisi

*A. thaliana*'nın taksonomisi, Akman (1989) tarafından aşağıdaki gibi verilmektedir.

Bölüm	: Spermatophyta
Alt bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledoneae
Familiya	: Cruciferae
Cins	: Arabidopsis
Tür	: <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)

Olgun bir *A. thaliana* bitkisi küçük rozet yapraklar ile üstte çiçek salkımı içeren bir ana gövdeden ibarettir. Yaşlı bitkilerde bazen ana gövde ve rozetten dallanmalar da görülmektedir. Bitkinin boyu besi ortamına ve diğer faktörlere bağlı olmakla birlikte, en fazla 30 cm'ye kadar uzamaktadır. Organik bileşenler bakımından çok fakir topraklarda bile bitki olgunlaşabilmekte ve birkaç cm uzunluğa eriştiğinde tohum bağlayabilmektedir (Kranz and Kirchheim 1987, Meyerowitz 1989). Her dalın ucunda farklılaşmamış hücreler topluluğu (meristem) bulunmaktadır. Bu hücrelerin düzenli bölünmeleri ve farklılaşmaları sonucunda olgun çiçekler meydana gelmektedir. Olgun bir çiçek 3 mm boyunda ve 1 mm enindedir. Çiçeklerde 4 çanak ve 4 taç yaprak, taç yaprak halkaları içinde 2'si kısa, 4'ü uzun olmak üzere 6 tane erkek organ (stamen) ve merkezde dişi organ (pistil) bulunur. Çiçekler kendine döllenir. Ancak laboratuvar koşullarında yabancı dölleme kolaylıkla yapılabilir. Döllenmeden sonra pistil uzar ve silika olarak adlandırılan meyveye dönüşür. Bitkinin tohumları oldukça küçüktür ve kuru ortamlarda çimlenme yeteneklerini kaybetmeden yıllarca depolanabilir. Tohumlar ekimden yaklaşık 3-5 gün sonra çimlenir ve 4-5 haftada çiçek verme durumuna gelir. Bitkinin çimlenme ve gelişme hızı besin, sıcaklık, gün uzunluğu ve genetik yapıya bağlı olarak farklılık gösterir. Devamlı aydınlatmanın sağlandığı ortamlarda Columbia ve Landsberg ekotipleri yaklaşık 6 haftalık bir generasyon süresine sahiptir. Bitki aylarca çiçek vermeye devam ettiğinden her bir bitkiden 10.000 kadar

tohum elde edilir. Bitki toprakta olduğu gibi steril agarlı veya sıvı besi ortamlarında da kolaylıkla yetişebilir. Toprak örnekleri mineral kompozisyonu ve miktarları bakımından farklılıklar gösterdiği için, mutasyon çalışmalarında daha çok kimyasal içerikleri belirli olan aseptik kültürler tercih edilmektedir.

Çiçekli bitkilerin fizyolojik genetik araştırmaları için geliştirilen ve *A. thaliana*'nın kullanıldığı ilk aseptik kültür metodu Landgridge (1957) tarafından geliştirilmiştir.

### 2.3.2. Genetiği ve Tiyamin Mutantları

*Arabidopsis* ile ilk genetik çalışma Laibach tarafından yapılmış ve haploid kromozom sayısı 5 olarak belirlenmiştir (Redei 1969, Meyerowitz 1987). Kromozom sayısının az olmasına rağmen, bu kromozomların çok küçük olması sitolojik çalışmaların yapılmasını güçleştirmektedir (Estelle and Somerville 1986).

Yüksek bitkiler arasında bilinen en küçük genoma sahip *A. thaliana*'nın haploid çekirdek genomu yaklaşık 70.000 kb'dır (Leutwiller et al 1984). Çekirdek genomun % 10-14'ü tekrarlanan DNA sıralarından ibarettir (Leutwiller et al 1984, Meyerowitz 1987, Pang and Meyerowitz 1987). Genomunun küçüklüğü ve tekrarlanan DNA sıralarının az olması nedeni ile *Arabidopsis* ile yapılan moleküler genetik çalışmalarda daha hızlı, kolay ve ucuza mal edilen sonuçlar alınmaktadır.

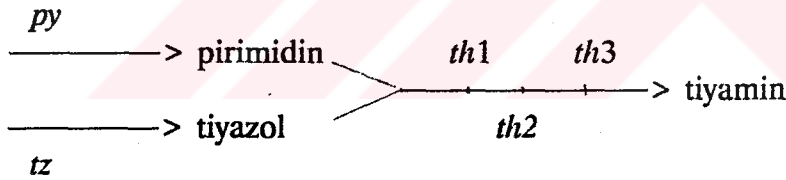
*Arabidopsis*'de biyokimyasal ve fizyolojik mutantlar, tohumlarının EMS gibi kimyasal mutagenlerle muamele edilmesi ya da UV veya X-ışını ile ışınlanmasıyla elde edilmiştir (Langridge 1955, Redei 1961, Feenstra 1964, Redei 1965, Li and Redei 1969, Braaksma and Feenstra 1982, Meinke 1985, Britt et al 1993).

*Arabidopsis* tohumlarında yapılan mutasyon denemeleri sonunda, her tohumda bulunan bitkinin üreme organlarını oluşturacak diploid eşey ana hücre sayısı tespit edilebilmektedir (Redei and Koncz 1992). Mutasyona uğratılan tohumdaki ( $M_1$ ) eşey ana hücre sayısı,  $M_2$  döllerindeki fenotipik açılma sonuçlarına göre saptanmaktadır. Mutasyonun eşey ana hücrelerinin yalnızca birinde gerçekleşmesi ve resesif olması halinde, eşey ana hücre sayısının 1, 2, 3 ve 4 olma

durumuna göre,  $M_2$  dölleriindeki yabancı tip mutant oranı 3:1, 7:1, 11:1 ve 15:1 şeklinde olmaktadır.

Li ve Redei (1969) *Arabidopsis* tohumlarında yaptıkları mutasyon çalışmaları sonucunda her tohumda genellikle 2 tane diploid eşey ana hücrelerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Diğer yeşil bitkilerde olduğu gibi *Arabidopsis*'de de oksotrofik mutantlar oldukça azdır. *Arabidopsis*'de ilk tiyamin oksotrofik mutanı, bitki tohumlarının X-ışını ile muamele edilmesiyle elde edilmiştir (Langridge 1955). Tiyamin, pirimidin ve tiyazol olmak üzere iki öncü molekülün birleşmesinden meydana gelmektedir (Li and Redei 1969). *A. thaliana*'da tiyamin biyosenteziyle ilgili 5 lokus (*py*, *tz*, *th1*, *th2*, *th3*) bilinmektedir (Şekil 2.1). İkinci kromozomda bulunan ve *py* olarak adlandırılan lokustaki mutasyon sonucunda tiyamin öncülerinden pirimidin, beşinci kromozomda bulunan ve *tz* olarak adlandırılan lokustaki mutasyon sonucunda ise tiyazolün sentezi engellenmektedir. Birinci kromozomda *th1*, beşinci kromozomda *th2* ve dördüncü kromozomda *th3* lokuslarının herhangi birinde meydana gelen bir mutasyonda ise son ürün tiyamin yapılamamaktadır (Li and Redei 1969).



Şekil 2.1. *A. thaliana* model bitkisinde tiyamin biyosentez yolunun ana basamakları ve ilgili lokuslar

Tiyamin mutanı bitkiler normal çimlenme gösterirler ve yeşil renkli kotiledonlar oluştururlar. Ancak rozet yapraklar çıkmaya başladıktan sonra bitki sararmaya başlar ve 8-10 gün içinde ölür. Bununla beraber çimlenmeden hemen sonra *py* mutantlarının gelişme ortamlarına 2,5-dimetil-aminopurin veya tiyamin, *tz* mutantlarının gelişme ortamlarına 4-metil-5-tiyazol etanol veya tiyamin, *th1*, *th2* ve *th3* mutantlarının gelişme ortamlarına da sadece tiyamin ilavesiyle bu mutantlarda yabancı tip gelişim sağlanabilmektedir (Langridge 1955).

### 2.3.3. Genetik Transformasyon Çalışmaları

Bitki hücrelerine DNA aktarımının gerçekleştirilebileceği ilk olarak Bonotto et al (1965) tarafından açıklanmıştır (Redei and Koncz 1992). Bunun üzerine Ledoux et al (1971) *A. thaliana* tohumlarına radyoaktif işaretli bakteri DNA'sının aktarımı ve bu DNA'nın bitkinin gelişimi boyunca geçirdiği süreçlerin incelenmesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. DNA çözeltisi içinde 96 saat tutulan tohumlarda 0,7 ng ekzogen DNA'nın varlığı saptanmıştır. Bitkinin farklı doku ve organlarının analizlerinden elde edilen sonuçlar ekzogen DNA'nın büyük bir kısmının bitkinin vejetatif gelişme safhasında kotiledonlarda kaldığını, daha sonra da çiçek veren sürgünlere dağıldığını ve çiçeklerden izole edilen DNA'nın endogen ve ekzogen DNA'dan ibaret bir heterodupleks olduğunu göstermiştir.

Ledoux et al yaptıkları bu çalışmadan sonra 1974'de tiyamin sentezinin çeşitli aşamaları bloke edilmiş *Arabidopsis* mutant hatlarının tohumlarını çeşitli bakteri türlerinden izole edilen DNA ile muamele ederek tiyamin sentezleyebilen transformant bitkiler elde etmişlerdir. Transformantların kendilenmesiyle elde edilen döllerde tiyamin sentezi bakımından açılma olmamış ve bu durum ebeveynin transformasyon bakımından homozigot olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

1980'li yıllarda *Arabidopsis*'de genetik transformasyon çalışmaları doku/protoplast kültürü ve agrobakteriyel vektörler kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. Lloyd et al (1986) higromisine dayanıklılık geni içeren *Agrobacterium tumefaciens* ile muamele ettikleri yaprak disklerinden higromisinli doku kültürlerinde rejenere olabilen transformantlar elde etmişlerdir. Transformasyon, transformant ve dölllerinde yapılan Southern hibridizasyon analizleri ile de gösterilmiştir.

Feldman ve Marks (1987) doku kültürü kullanmadan kanamisine dayanıklılık genini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* ile *Arabidopsis* tohumlarını inoküle ederek 200'den fazla kanamisine dayanıklı transformant bitki elde etmişlerdir. Kalıtım analizleri sonucunda ekzogen DNA'nın mayotik kararlılıkla ve Mendel kalıtım modelinde döllere aktarıldığı görülmüştür. Transformant ve dölllerinde Southern

hibridizasyon analizleri yapılarak ekzogen DNA'nın bitki genomundaki varlığı tespit edilmiştir.

Damm et al (1989) agrobakteriyel vektörleri kullanmadan doğrudan gen aktarım metoduyla *Arabidopsis* protoplastlarına higromisin dayanıklılık genini aktarmışlar ve transformasyonunun sıklığını  $10^{-4}$  olarak saptamışlardır. Transformant ve döllерinin genetik analizlerinden ekzogen DNA'nın bitki genomuna entegre olarak Mendel kalıtım modelinde döllere aktarıldığını gözlemişlerdir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada, NASC'dan (İngiltere-Nottingham) temin edilen ve daha sonra laboratuvarımızda depolanan *A. thaliana* model bitki sisteminin *py* mutant (NW-78) ve *Ler* standart yabani tip (NW-20) tohumları ile laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan "*Arabidopsis thaliana* Tiyamin Mutantlarında Bakteriyal DNA ile Transformasyon" konulu bir doktora çalışmasında elde edilen tiyamin transformantının 22 tane F<sub>1</sub> tohumu kullanılmıştır.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Tohumların Depolanması ve Yüzey Sterilizasyonu

*A.thaliana* tohumları eppendorf tüpler içinde derin dondurucuda (-18°C) saklanmıştır (Kranz and Kircheim 1987).

Tohumlar ekilmenden 24 saat önce derin dondurucudan çıkarılarak desikatöre alınmıştır. % 5'lik sodyum-hipoklorit çözeltisinde 3 dakika tutularak yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar daha sonra 5 kez steril su ile yıkanarak toprağa ekilmiştir.

##### 3.2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

*A. thaliana* 25±2°C'de, 7000 lux floresan ışığı ile devamlı aydınlatmanın sağlandığı iklim dolabında; içi su dolu tepsilere yerleştirilmiş 4-5 cm derinliğinde ve 6 cm çapında plastik saksılar içinde toprakta yetiştirilmiştir. Her saksıya yaklaşık 4-5 bitki ekilmiştir. *py* mutanti bitkiler ekimden rozet yaprakların tamamlanmasına kadar haftada 3-5 kez 10<sup>-3</sup> M tiyamin çözeltisi ile sulanmıştır.

### 3.2.3. Bitkilerin Melezlenmesi

Oldukça küçük çiçeklere (boyu 3 mm, eni 1 mm) sahip olan *A. thaliana* kendine döllen bir bitkidir ve yabancı tozlanma frekansı ( $10^{-4}$ ) oldukça düşüktür. Bununla birlikte bitkinin yabancı melezlemesi binoküler altında suni tozlama ile yapılabilmektedir.

Suni tozlamada dişi olarak kullanılacak ebeveyn, çiçek sapının en üst kısmında bulunan çanak yaprakları açılmamış, anterleri yeşilimsi çiçeklerden seçilmiştir. Bu dönem çiçek tozu oluşumundan iki ya da üç gün önceye rastlamaktadır (Snape and Lawrence 1971). Bu çiçeklerin çanak ve taç yaprakları ile anterleri ince uçlu bir pens ile koparılıp atılmıştır. Bu işlem yapılmadan önce polen kontaminasyonunu önlemek için pens % 95'lik etanol ile steril edilmiştir.

Çiçekleri kısırlaştırılan bitkiler etiketle belirlenmiştir. Etiket üzerine ana bitkinin çeşidi ve kısırlaştırma tarihi yazılmıştır. Kısırlaştırma işleminden 2-3 gün sonra tepecik çiçek tozu kabul etme olgunluğuna erişmektedir (Snape and Lawrence 1971).

Olgunlaşmış polenlere sahip çiçeklerde çanak yapraklar çiçek sapına dikey vaziyette bulunmaktadır. Erkek ebeveyn olarak kullanılacak bitkilerde olgunlaşmış çiçek saptan alınarak, çanak ve taç yaprakları koparılmıştır. Daha sonra olgunlaşmış çiçek tozlarını içeren anterler seçilerek önceden hazırlanan pistilleri tozlamak üzere kullanılmıştır. Tozlama yapılmış bitkiler tekrar etiketlenmiştir. Etiketlere ana ve baba olarak kullanılan çeşit ve tozlama tarihi yazılmıştır.

Tozlama yapılan pistiller 10-15 gün sonra silika olarak adlandırılan meyveye dönüşmektedir. Meyve kapsülleri, sararmaya başladığı zaman çatlamadan önce hasat edilmiştir. Hasattan sonra her bitkiden elde edilen tohumlar ayrı ayrı korunmuştur.

### 3.2.4. Kalıtım Analizleri

Tiyamin mutanti bitkiler tohumların ekiminden ilk rozet yaprakların oluşumuna kadar yabani tip bitkilere paralel bir gelişme göstermektedir. Ancak bu bitkilerde ilk rozet yaprakların çıkışından sonra yapraklarda sararma başlamakta

ve 8-10 gün içinde ölüm gözlenmektedir. Bu temelde  $F_1$  bitkileri ve bunların döllerinde mutant fenotipin tespiti yapılmıştır.

Kalıtım modelini ortaya koymak için transformant bitkinin kendilenmesinden elde edilen 22  $F_1$  tohumundan gelişen 16  $F_1$  bitkisi ile Çizelge 3.1'de verilen deneme grupları oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1.  $F_1$  bitkilerinin kendilenme ve melezleme grupları

<u>Tozlama tipi</u>	<u>Tozlamada kullanılan <math>F_1</math> sayısı</u>
♀ $F_1$ x $F_1$ ♂	6
♀ $F_1$ x Yabani tip ( <i>Ler</i> ) ♂	2
♂ $F_1$ x Yabani tip ( <i>Ler</i> ) ♀	3
♀ $F_1$ x mutant ( <i>py</i> ) ♂	3
♂ $F_1$ x mutant ( <i>py</i> ) ♀	2

$F_3$  döllerini bu melezlemelerden elde edilen  $F_2$  döllerinin kendilenmeleriyle elde edilmiştir.

### 3.2.5. İstatistik Analiz

Döllerde tiyamin sentezi bakımından gözlenen genetik açılma oranlarının çeşitli genetik hipotezlere uygunluğu khi-kare testi ile kontrol edilmiştir.

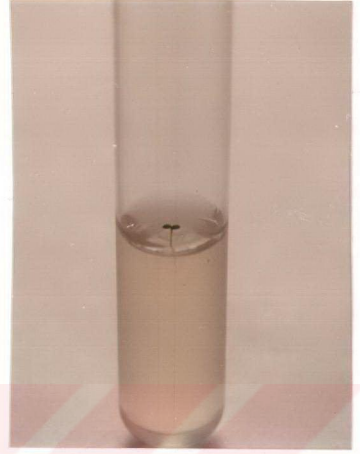


#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan bitkiler daha önce yapılan bir doktora çalışmasından elde edilmiştir. Bu doktora çalışmasında *A. thaliana*'nın 10139 tane *py* mutant tohumu çimlenme borusu çıkışına kadar yabani tip *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 hücrelerinden izole edilen genomik DNA çözeltisi içinde tutulmuştur. Daha sonra bu tohumlar aseptik gelişme ortamlarına ekilmiş ve bunlardan gelişen 7452 bitkicik arasından sadece bir tanesinde gelişmenin yabani tip (*Ler*) ve tiyaminli ortamdaki *py* mutantlarına oranla daha yavaş ancak normal olarak devam ettiği gözlenmiştir. Transformant olduğu kabul edilen bu bitki 4 tane silika bağlamış ve toplam 52 tane  $F_1$  tohumu vermiştir.  $F_1$  tohumlarından 30 tanesi ekilmiş ve bunlardan 26 tane  $F_1$  bitkisi elde edilmiştir.  $F_1$  bitkileri *Ler* ve tiyaminli ortamdaki *py* mutantları ile paralel, normal bir gelişme göstermekle birlikte 5 tanesi silika bağlamamış yani steril olmuştur.

Bu araştırmada transformant bitkinin kalıtım modelini açıklamak için bu bitkiden elde edilen  $F_1$  döllerinin kendilenmeleri, yabani tip ve mutant bitkilerle yabancı melezlemeleri yapılmıştır.

Bu çalışmada bitkinin gelişme ortamı olarak aseptik kültürler yerine toprak kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmalara başlamadan önce tiyamin mutanti ve yabani tip bitkiler toprakta yetiştirilerek yaşam döngüleri ve fenotipik özellikleri gözlenmiştir. *Ler* yabani tipi ve tiyaminli ortamda yetiştirilen *py* mutantlarında generasyon süresi 5-6 hafta olarak saptanmıştır. Yabani tip bir bitkinin haftalık gelişme dönemleri aseptik kültürlerle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1. a-d'de görülmektedir. Toprağa ekilen tohumlar genellikle 5-7. günler arasında çimlenmektedir. Ancak çimlenmenin 3. günden sonra başladığı ve 7. güne kadar gecikebildiği haller de gözlenebilmektedir. Birinci hafta içinde bitkinin kotiledon yaprakları (Şekil 4.1.a), ikinci haftada da rozet yaprakları çıkmaktadır (Şekil 4.1.b). Üçüncü haftada gövdede uzama, tomurcuklanma ve çiçeklenme görülmektedir (Şekil 4.1.c). Dördüncü haftada ise bitkilerin silika gelişimi başlamakta ve beşinci, altıncı haftada silikalar tamamen olgunlaşmaktadır (Şekil 4.1.d). Toprakta yetiştirilen yabani tip bitkilerin yaşam döngülerinin ve fenotipik özelliklerinin daha önceki çalışmada aseptik gelişme ortamlarında



(a)



(b)

Şekil 4.1. Toprak ve aseptik gelişme ortamında yetiştirilen *A. thaliana* (Ler, yabani tip) bitkisinde (a) 1., (b) 2., (c) 3. ve (d) 5. haftalardaki gelişme durumu (Aseptik gelişme ortamındaki bitkilerin fotoğrafları Kocabaş (1997)'den alınmıştır)



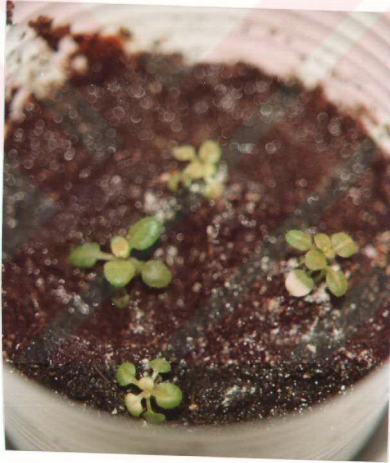
(c)



(d)

Şekil 4.1. (devam). Toprak ve aseptik gelişme ortamında yetiştirilen *A. thaliana* (*Ler*, yabani tip) bitkisinde (a) 1., (b) 2., (c) 3. ve (d) 5. haftalardaki gelişme durumu (Aseptik gelişme ortamındaki bitkilerin fotoğrafları Kocabaş (1997)'dan alınmıştır)

yetiştirilen bitkilerle paralel olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1 a-d). Tiyamin içermeyen toprak ve aseptik gelişme ortamlarında yetiştirilen *py* mutantlarında ise gelişme tohumların ekiminden ilk rozet yaprakların çıkışına kadar yabani tip bitkilerle paralel olmakta ancak daha sonra aseptik ortamda yetiştirilenlerin rozet yaprakları çıkmadan (Şekil 4.2.b), toprakta yetiştirilenlerin ise rozet yaprakları çıkmaya başladıktan sonra yapraklarda kloroz gözlenmekte (Şekil 4.2.a) ve bitki birkaç gün sonra ölmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.2. Tiyamin içermeyen toprak (a) ve aseptik (b) gelişme ortamında yetiştirilen *py* mutantlarının 2. haftadaki gelişme durumu



Kalıtım analizleri için transformant bitkinin elde bulunan 22 tane  $F_1$  tohumu ekilmiş ve bunlardan 21 tane  $F_1$  bitkisi elde edilmiştir. Bitkiler rozet yaprakların çıkışına kadar yabani tip bitkilerle paralel bir gelişme göstermiştir. Ancak daha sonra 10 bitkide gelişmede bir yavaşlama ve rozet yapraklarda sararmalar gözlenmiştir. Mutant olabilecekleri düşünülen bu bitkilerin yaşamalarını sağlamak amacıyla gelişme ortamlarına tiyamin verilmiştir. Buna rağmen, 5 bitkide kloroz önlenememiş ve ölüm gözlenmiştir. Bu durumda, bu bitkilerin *py* mutasyonu bakımından homozigot oldukları söylenebilir. Tiyamin ilavesine rağmen, 5 bitkide ölümün gözlenmesinin tiyamin ilavesindeki gecikmeden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çünkü, ölüm tiyamin ilavesinin yapıldığı dönemde gelişmeleri daha hızlı olan bitkilerde gözlenmiştir.

16 tane  $F_1$  bitkisinin kendilenme, yabani tip (*Ler*) ve mutant (*py*) bitkilerle yabancı melezlemeleri yapılmıştır. Çizelge 4.1'de 16 tane  $F_1$  bitkisinin melezleme tipleri ve bu melezlemelerden elde edilen  $F_2$  ile  $F_3$  döllerindeki sonuçlar gösterilmiştir.  $F_3$  ler  $F_2$  döllerinin kendilenmeleriyle elde edilmiştir.  $F_3$ 'de gözlenen değerlerin çeşitli genetik açılma oranlarına (3:1, 15:1, 63:1, 255:1) uygunluğu khikare ile test edilmiş ve bu değerlerin 3:1 oranına uygun olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

16 tane  $F_1$  bitkisinden 6 tanesi kendilenmiştir. Tiyamin verilerek geliştirilen 3 tane  $F_1$  bitkisinin (14-15-16 nolu bitkiler) kendilenmesiyle elde edilen  $F_2$  döllerinin tamamında mutant fenotip gözlenmiştir. Tiyamin verilmeden yabani tip gelişme gösteren 3 tane  $F_1$  bitkisinin (11-12-13 nolu bitkiler) kendilenmesiyle elde edilen  $F_2$  ve  $F_3$  dölleri ise yalnızca yabani tip gelişim göstermiştir.

5 tane  $F_1$  bitkisinin yabani tip bitki ile melezlemeleri yapılmıştır.  $F_1$  bitkilerinden 2 tanesi (1-2 nolu bitkiler) dişi, 3 tanesi de (3-4-5 nolu bitkiler) erkek ebeveyn olarak kullanılmıştır. Bu bitkilerden 4 tanesinin (1-2-3-4 nolu bitkiler) melezlemelerinden elde edilen  $F_2$  ve  $F_3$  döllerinde yalnızca yabani fenotip gözlenmiştir. Tiyamin ilavesi ile geliştirilen diğer bitkinin (5 nolu) melezlemesinden ise  $F_2$  döllerinde yabani,  $F_3$  döllerinde de 3:1 (517:199) oranında yabani ve mutant fenotip elde edilmiştir.

5 tane  $F_1$  bitkisinin de mutant bitki ile melezlemeleri yapılmıştır. Bitkilerden 3 tanesi (6-7-8 nolu bitkiler) dişi, 2 tanesi de (9-10 nolu bitkiler) erkek ebeveyn olarak kullanılmıştır. Tiyamin ilavesi ile geliştirilen bir bitkinin (8 nolu bitki)

Çizelge 4.1. Melezleme Sonuçları

$F_1$ bitkileri	Melezleme tipi	$F_2$				$F_3$				$\chi^2$ değeri ( $P > 0.05$ )
		Ekilen tohum	Çimlenen tohum	Gözlenen Açılma		Ekilen tohum	Çimlenen tohum	Gözlenen Açılma		
				Yabani tip	Mutant tip			Yabani tip	Mutant tip	
1	b	21	15	15	0	300	226	226	0	-
2	b	36	24	24	0	300	260	260	0	-
3	c	41	27	27	0	300	216	216	0	-
4	c	20	20	20	0	300	255	255	0	-
5	c	21	15	15	0	997	716	517	199	2.9795
6	d	37	23	12	11	763	524	375	149	3.2975
7	d	22	14	6	8	398	289	203	86	3.4891
8	d	39	26	0	26	-	-	-	-	-
9	e	16	12	12	0	784	547	391	156	3.6131
10	e	32	21	12	9	717	485	347	138	3.0852
11	a	60	40	40	0	50	39	39	0	-
12	a	112	79	79	0	50	40	40	0	-
13	a	94	66	66	0	50	34	34	0	-
14	a	56	42	0	42	-	-	-	-	-
15	a	89	61	0	61	-	-	-	-	-
16	a	64	42	0	42	-	-	-	-	-

a) Kendilenme

b) Yabani tip ( $\sigma$ ) x  $F_1$  ( $\text{♀}$ )

c) Yabani tip ( $\text{♀}$ ) x  $F_1$  ( $\sigma$ )

d) Mutant tip ( $\sigma$ ) x  $F_1$  ( $\text{♀}$ )

e) Mutant tip ( $\text{♀}$ ) x  $F_1$  ( $\sigma$ )

melezlemesinden elde edilen F<sub>2</sub> dölllerinin tamamı mutant fenotipinde olmuştur. 3 bitkinin (6-7-10 nolu bitkiler) melezlenmesinden elde edilen F<sub>2</sub> dölllerinde 1:1 (12:11; 6:8; 12:9), F<sub>3</sub> dölllerinde de 3:1 oranında (375:149; 203:86; 347:148) yabancı ve mutant fenotip gözlenmiştir. Diğer bitkinin (9 nolu bitki) melezlemesinden ise F<sub>2</sub> dölllerinde yalnızca yabancı tip, F<sub>3</sub> dölllerinde de 3:1 (391:156) oranında yabancı tip ve mutant gelişim görülmüştür.

F<sub>1</sub> bitkilerinden 7 tanesinin (1-2-3-4-11-12-13 nolu bitkiler) kendilenmeleri ve yabancı tiplerle melezlemelerinden elde edilen F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> dölllerinde açılmanın olmaması yani yalnızca yabancı tip gelişimin görülmesi nedeniyle bu bitkilerin tiyamin sentezi bakımından homozigot oldukları söylenebilir. Mutant bitki ile melezlemesi yapılan 1 tane F<sub>1</sub> bitkisinin (9 nolu bitki) dölllerinde elde edilen açılma oranları da bu bitkinin tiyamin sentezi bakımından homozigot olmasıyla açıklanabilir. F<sub>1</sub> bitkilerinden 4 tanesinin (8-14-15-16 nolu bitkiler) kendilenme ve mutant bitki ile melezlemesinden elde edilen F<sub>2</sub> dölllerinin hepsinin mutant fenotipinde olması, bu bitkilerin *py* mutasyonu bakımından homozigot olduklarını göstermektedir. F<sub>1</sub> bitkilerinden 1 tanesinin (5 nolu) yabancı tip ile melezlemesinden elde edilen F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> döllelerindeki açılmalardan bu bitkinin *py* mutasyonu bakımından homozigot olduğu söylenebilir. F<sub>1</sub> bitkilerinin 3 tanesinin (6-7-10 nolu bitkiler) mutant bitki ile melezlemelerinden elde edilen F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> döllelerindeki açılma oranları, bu bitkilerin tiyamin sentezi bakımından tek lokusta heterozigot olduklarının göstergesi olabilir.

Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde 21 tane F<sub>1</sub> bitkisinden 10 tanesinin *py* mutasyonu bakımından homozigot, 8 tanesinin tiyamin sentezi bakımından homozigot, 3 tanesinin de tek lokusta heterozigot oldukları söylenebilir.

*A. thaliana* tohumlarında genellikle 2 tane diploid eşey ana hücrenin bulunduğu düşünülmektedir (Li and Redei 1969). Ekzogen DNA'nın tek kopya halinde eşey ana hücrelerinden yalnızca birine entegrasyonu durumunda, F<sub>1</sub> dölllerinde 3:5 oranı, her ikisine de entegrasyonu durumunda ise 3:1 oranının elde edilmesi beklenir. Melezleme tipinden bağımsız olarak elde edilen tüm F<sub>1</sub> döllelerindeki açılma (11 yabancı fenotip: 10 mutant fenotip) 3:5 oranına uygunluk göstermektedir ( $\chi^2 = 1.984$ ,  $P > 0.05$ ). Bu durumda transformasyonun ekzogen

DNA'nın eşey ana hücrelerinden yalnızca birine tek kopya halinde entegrasyonundan kaynaklanabileceği söylenebilir.

Diğer taraftan ekzogen DNA'nın iki kopya halinde eşey ana hücrelerinden yalnızca birine ve her iki homolog kromozoma da entegre olması durumunda  $F_1$  döllerinde 1:1, homolog olmayan kromozomlara entegrasyonu durumunda ise 15:17 oranının elde edilmesi beklenir. Bu denemeden elde edilen  $F_1$  açılması (11 yabancı fenotip : 10 mutant fenotip) hem 1:1 ( $\chi^2 = 0.0476$ ,  $P > 0.05$ ) hem de 15:17 ( $\chi^2 = 0.9914$ ,  $P > 0.05$ ) oranına uygunluk göstermektedir.

$F_1$  döllerindeki açılma oranının 1:1, 15:17 ve 3:5 oranlarına uygun oluş ihtimalleri 0.0476, 0.9914 ve 1.984'dür. Bu nedenle entegrasyonun eşey ana hücrelerinden yalnızca birine ve homolog kromozomlara iki kopya halinde gerçekleşmiş olması ihtimali daha yüksektir.

Transformant bitkinin elde edildiği daha önceki çalışmada, transformantın bağladığı 52 tohumdan 32 tanesi ekilmiş ve bunlardan gelişen 26 tane  $F_1$  bitkisinin hepsinin yabancı tip gelişme gösterdiği (5 tanesinde gözlenen sterilite dışında) görülmüş ve dolayısıyla da transformantın homozigot olabileceği düşünülmüştür. Ancak transformantın tüm  $F_1$  döllerinin birlikte değerlendirilmesi yapıldığında 37 yabancı tip ve 10 mutant şeklinde bir 3:1 açılması elde edilmektedir ( $\chi^2 = 0.18007$ ,  $P > 0.05$ ). Bu durumda transformantın homozigot olmadığı ve ekzogen DNA'nın her iki eşey ana hücrelerine de tek kopya halinde entegrasyonun gerçekleşmiş olabileceği söylenebilir.

Feldmann ve Marks (1987) kanamisin dayanıklılık geni içeren *Agrobacterium* ile birlikte kültüre aldıkları *Arabidopsis* tohumlarından gelişen bitkilerden 200'den fazla kanamisine dayanıklı  $F_1$  dölü elde etmişlerdir.  $F_1$  bitkilerinin ve her  $F_1$  bitkisinin kendilenmesi ile elde edilen  $F_2$  gruplarının çoğunda Mendel açılma oranlarına uygun sonuçlar gözlenmiştir.  $F_2$  gruplarından % 62'sinde ekzogen DNA'nın genomda tek bir (3:1 açılma); % 29'unda 2 bağımsız (15:1 açılma) veya 2 tane bağlı; % 5'inde 3 bağımsız (63:1 açılma); % 1'inde 4 bağımsız (255:1 açılma) kopyasının bulunduğu, % 3'ünde ise açılmanın olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar genoma entegre olan kanamisin dayanıklılık geninin 2 veya 3 mayoz döngüsünde stabil bir Mendel faktörü olarak döllere aktarıldığı şeklinde yorumlanmıştır.



Tütün (De Block et al 1984, Potrykus et al 1985, Hain et al 1985, Budar et al 1986, Spielman and Simpson 1986, Müller et al 1987, Uchimiya et al 1987), domates (Shahin et al 1986, Sukhapinda et al 1987), *Petunia* (Wallroth et al 1986) ve *Arabidopsis* (Damm et al 1989) gibi bitkilerde çeşitli transformasyon tekniklerinin uygulanmasıyla elde edilen transformantların Southern hibridizasyon ve kalıtım analizleri sonucunda ekzogen DNA'nın çekirdek genomuna bir ya da bir kaç kopya halinde entegre olduğu ve Mendel kalıtım modelinde döllere aktarıldığı görülmüştür.

Ancak, Budar et al (1986) ve Feldmann and Marks (1987) kanamisine dayanıklı bazı transformantların kalıtım analizlerinde Mendel açılma oranlarından sapmaların olduğunu görmüşler ve bu bitkilerin döllerinde özellikle kanamisine duyarlı bitkilerin sayıca fazla olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar bu durumun;

- . gen ekspresyonunun tohumlarda baskılanmasından,
- . dayanıklılık geninin gametlerde kaybolmasından,
- . T-DNA'nın sitoplazmik genoma entegre olması nedeniyle daha sonraki bölünmelerde yavru hücrelerin tümüne aktarılamamasından veya kaybolmasından,
- . T-DNA'nın içinde bulunduğu gametlerde letal mutasyonlara yol açmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Ayrıca araştırmacılar elde ettikleri bazı transformantların Southern hibridizasyon analizleri sonucunda tespit edilen ekzogen DNA kopya sayısının, Mendel açılma oranlarına göre tahmin edilen kopya sayısından daha fazla olduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar bu durumun;

- . bitki genomunun çeşitli bölgelerine inaktif ekzogen DNA kopyalarının entegrasyonundan,
- . bitki genomunda gerçekleşen yeniden düzenlemelerle ekzogen DNA'nın inaktif hale gelmesinden,
- . ekzogen DNA'nın genomda eksprese edilmeyen bölgelere entegrasyonundan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yapılan transformasyon çalışmalarında bazen ekzogen DNA'ların çekirdek dışı yani ekstra-kromozomal genomlara entegrasyonu da gerçekleşebilmekte ve maternal kalıtıma uygun açılmalar elde edilmektedir. De Block et al (1985)

yaptıkları transformasyon çalışmaları sonucunda elde ettikleri kloramfenikole dayanıklı transformantların polenleriyle yabancı tip bitkilerin tozlanmasından oluşan döllerin hepsinin kloramfenikole duyarlı olduğunu, resiprokal melezlemelerde ise döllerin % 80'inin kloramfenikole dayanıklı olduğunu görmüşlerdir. Böylece ekzogen DNA'nın polenler aracılığı ile döllere aktarılmadığı belirlenmiştir. Bu durumda ekzogen DNA'nın kloroplast genomuna entegre olarak, maternal kalıtım modelinde döllere aktarıldığı düşünülmüştür. Kloramfenikole dayanıklı bitkilerin kloroplast DNA'larının Southern hibridizasyon analizleri yapılmış ve ekzogen DNA'nın kloroplast DNA'sındaki varlığı kesin olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada  $F_1$  bitkilerinin resiprokal melezlemeleri yapılmamıştır. Çünkü, bitkinin birbirlerine oldukça yakın ve küçük çiçeklere sahip olması hem yabancı tozlama esnasında çiçekler arasında polen kontaminasyonunun gerçekleşebilme ihtimalini artırmakta hem de tozlaması yapılan çiçeklerin ayrı ayrı belirlenmesini ve korunmasını güçleştirmektedir. Bu nedenlerden dolayı uygulamadan kaynaklanabilecek bir hatanın  $F_1$  tohumlarının sayısındaki azlığa bağlı olarak telafi edilemeyeceği düşünülmüştür. Bitkilerin resiprokal melezlemelerinin yapılmamış olmasına rağmen,  $F_1$  bitkilerinin dişi ve erkek ebeveyn olarak kullanıldığı yabancı melezlemelerden elde edilen sonuçlar ekzogen DNA'nın genomdaki entegrasyon yeri ve döllere aktarımı hakkında bilgiler verebilmektedir.  $F_1$  bitkilerinden 2 tanesinin (1-2 nolu bitkiler) dişi, 2 tanesinin de (3-4 nolu bitkiler) erkek ebeveyn olarak kullanıldığı yabancı tip bitkilerle melezlemelerden elde edilen döllerde açılma görülmemiştir.  $F_1$  bitkilerinin 2 tanesinin (6-7 nolu bitkiler) dişi, 1 tanesinin de (10 nolu bitki) erkek ebeveyn olarak kullanıldığı mutant bitkilerle melezlemelerden  $F_2$  dölllerinde 1:1,  $F_3$  dölllerinde de 3:1 oranında yabancı ve mutant fenotip gözlenmiştir. Bu melezlemelerden ekzogen DNA'nın döllere aktarımının  $F_1$  bitkisinin erkek veya dişi ebeveyn olmasına bağlı olarak bir farklılık göstermediği görülmüştür. Bu sonuçlar ekzogen DNA'nın çekirdek genomu entegrasyonunu kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, transformant bitkiden 3 generasyon boyunca tiyamin sentezleyebilen döllerin elde edilebilmesi transformasyonun kararlılığını yani ekzogen DNA'nın bitki genomuna stabil olarak entegre olduğunu göstermektedir.

Genoma entegre olan ekzogen DNA'nın Mendel oranlarına uygun açılmalarla döllere aktarıldığı görülmüş ise de kopya sayısı hakkında çeşitli olasılıklar tartışılmış olmakla birlikte kesin bir yargıya varılamamıştır. Bu konuda kesin bilgilerin elde edilebilmesi ancak moleküler analizlerin yapılmasıyla mümkün olabilir.



**KAYNAKLAR**

- AKMAN, Y. 1989. Bitki Biyolojisine Giriş: Botanik. Palme Yayıncılık, Ankara.
- AN, G., WATSON, B.D. and CHIANG, C. 1986. Transformation of Tobacco, Tomato, Potato and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiol.*, 81: 301-305.
- BRAAKSMA, F.J. and FEENSTRA, W.J. 1982. Isolation and Characterization of Nitrate Reductase-Deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 64: 83-90.
- BRISSON, N., PASZKOWSKI, J., PENSWICK, J.R., GRONENBORN, B., POTRYKUS, I. and HOHN, T. 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature.* 310: 511-514.
- BRITT, A.B., CHEN, J.J., WYKOFF, D. and MITCHELL, D. 1993. A UV-Sensitive Mutant of *Arabidopsis* Defective in the Repair of Pyrimidine-Pyrimidinone (6-4) Dimes. *Science*, 261: 1571-1574.
- BUDAR, F., THI-TOONG, L., VAN MONTAGU, M. and HERNALSTEENS, J.P. 1986. *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer Results Mainly in Transgenic Plants Transmitting T-DNA as ve Single Mendelian Factor. *Genetics*, 114: 303-313.
- CROSSWAY, A., OAKES, J.V., IRVINE, J.M., WARD, B., KNAUF,, V.C. and SHEWMAKER, C.K. 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. genet.* 202: 179-185.
- DAMM, B., SCHMIDT, R. and WILLMITZER, L. 1989. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplast. *Mol. Gen. Genet.* 217: 6-12.
- DE BLOCK, M., HERRERA-ESTRELLA, L., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. and ZAMBRYSKI, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.*, 3: 1681-1689.
- DE BLOCK, M., SCHELL, J. and VAN MONTAGU, M. 1985. Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.*, 4: 1367-1372.

- DE LA PENA, A., LÖRZ, H. and SCHELL, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 325: 274-276.
- ESTELLE, M.A. and SOMERVILLE, C.R. 1986. The mutants of *Arabidopsis*. *Trends in Genetics*. 2: 89-93.
- FEENSTRA, W.J. 1964. Isolation of Nutritional Mutants In *Arabidopsis thaliana*. *Genetica*, 35: 259-269.
- FELDMANN, K.A. and MARKS, M.D. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208: 1-9.
- FRALEY, R.T., ROGERS, S.G., HORSCH, R.B., SANDERS, P.R., FLICK, J.S., ADAMS, S.P., BITTNER, M.L., BRAND, L.A., FINK, C.L., FRY, J.S., GALLUPPI, G.R., GOLDBERG, S. B., HOFFMANN, N. L. and WOO, S.L. 1983. Expression of bacterial genes plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 4803-4807.
- GOODMANN, R.M., HAUPTLI, H., CROSSWAY, A. and KNAUF, V.C. 1987. Gene Transfer in Crop Improvement. *Science*, 236: 48-54.
- GORDON-KAMM, W.J., SPENCER, J.M., MANGANO, M.L., ADAMS, T.R., DAINES, R.J., ADAMS, Jr, W.R., WILLETTS, N.G., RICE, T.B., MACKAY, C.J., KRUEGER, R.W., KAUSCH, A.P. and LEMAUX, P.G. 1990. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *The Plant Cell*, 2: 603-618.
- GRANT, J.E., DOMMISSE, E.M., CHRISTEY, M.C. and CONNER, A.J. 1993. Gene Transfer to Plants Using *Agrobacterium*. In: D. R. Murray. 'Advanced Methods in Plant Breeding'. Chapman & Hall. London.
- HAIN, R., STABEL, P., CZERNILOFSKY, A.P., STEINBISS, H.H., HERRERA-ESTRELLA, L. and SCHELL, J. 1985. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplast. *Mol Gen Genet.* 199: 161-168.
- HORSCH, R.B., FRALEY, R.T., ROGERS, S.G., SANDERS, P.R., LLOYD, A., HOFFMANN, N. 1983. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science*, 223: 496-498.

- KLEIN, T.M., WOLF, E.D., WU, R. AND SANFORD, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327: 70-72.
- KOCABAŞ, Ş. 1997. *Arabidopsis thaliana* Tiyamin Mutantlarında Bakteriyel DNA ile Transformasyon. Doktora Tezi (yayımlanmamış). Ankara.
- KRANZ, A.R. and KIRCHHEIM, B. 1987. Genetic Resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*, No. 24.
- KRENS, F.A., MOLENDIJK, L., WULLEMS G.J. and SCHILPERORT, R.A. 1985. The role of bacterial attachment in the transformation of cell-wall regenerating tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* 166: 300-308.
- LANGRIDGE, J. 1955. Biochemical Mutations in the Crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.). Heynh. *Nature* 176: 260-261.
- LANGRIDGE, J. 1957. The Aseptic Culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Aust. J. Biol. Sci.*, 10(3): 243-252.
- LEDOUX, L, HUART, R. and JACOBS, M. 1971. Fate of Exogenous DNA in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 23: 96-108.
- LEDOUX, L., HUART, R. and JACOBS, M. 1974. DNA-mediated genetic correction of thiamineless *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 249: 17-21.
- LEUTWILER, L.S., HOUGH-EVANS, B.R. and MEYEROWITZ, E.M. 1984. The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 194: 15-23.
- LÍ, S.L. and REDEI, G.P. 1969. Thiamine Mutants of the Crucifer, *Arabidopsis*. *Biochemical Genetics*, 3: 163-170.
- LLOYD, A.M., BARNASON, A.R., ROGERS, S.G., BYRNE, C.M., FRALEY, R.T. and HORSCH, R.B. 1986. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 234: 464-466.
- MEINKE, D.W. 1985. Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theor. Appl. Genet.*, 69: 543-552.
- MEYEROWITZ, E.M. 1987. *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Rev. Genet.*, 21: 93-111
- MEYEROWITZ, E.M. 1989. *Arabidopsis*, a Useful Weed. *Cell*, 56: 263-269.

- MULLER, A., MANZARA, T. and LURQUIN, P. 1984. Crown gall transformation of tobacco callus cells by cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (2): 458-462.
- MULLER, A.J., MENDEL, R.R., SCHIEMANN, I., SIMOENS., C. and INZE, D. 1987. High meiotic stability of a foreign gene introduced in to tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Gen. Genet.* 207: 171-175.
- OTTEN, D., DE GREVE, H., HERNALSTEENS, J.P., VAN MONTAGU, M., SCHIEDER, O., STRAUB, J. and SCHELL, J. 1981. Mendelian Transmission Of Genes Introduced into Plants by the Ti Plasmids of *Agrobacterium tumefacines*. *Mol. Gen. Genet*, 183: 209-213.
- PANG, P.P. and MEYEROWITZ, E.M. 1987. *Arabidopsis thaliana*: A Model System for Plant Molecular biology. *Biotechnology* 5: 1177-81.
- PASZKOWSKI, I., BAUR, M., BOGUCKI, A. and POTRYKUS, I. 1988. Gene targeting in plants. *The EMBO Journal*. 7, 13, 4021-4026.
- POTRYKUS, I., PASZKOWSKI, J., SAUL, M.W., PETRUSKA, J. and SHILLITO, R. 1985. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet*, 199: 169-177.
- POTRYKUS, I. 1993. Gene transfer to plants: approaches and available techniques. In: M.D. Hayward, N.O. Bosermark and I. Romagosa (Eds.). 'Plant Breeding': Principles and prospects. Chapman & Hall. London.
- REDEI, G.P. 1961. Supervital Mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 47: 443-460.
- REDEI, G.P. 1965. Genetic Blocks in The Thiamine Synthesis of The Angiosperm *Arabidopsis*. *Amer. Jour. Bot.*, 52(8): 834-841.
- REDEI, G.P. 1969. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: A review of the genetics and biology. *Bibliographia Genetica*, 21: 1-151.
- REDEI, G.P. and KONCZ, C. 1992. Classical Mutagenesis. In: C. Koncz, N. Chua and J. Schell (Eds.). *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific., Singapore.
- REICH, I.I., IYER, V.N. and MIKI, BL. 1986. Efficient Transformation of Alfalfa Protoplasts by The Intronuclear Microinjection of Ti Plasmids. *Bio/technology*, 4: 1001-1004.



- RHODES, C.A., PIERCE, D.A., METTLER, I.J., MASCARENHAS, D. and DETMER, J.J. 1988. Genetically Transformed Maize Plants from Protoplast, *Science*, 240: 204-207.
- SHAHIN, E.A., SUKHAPINDA, K., SIMPSON, R.B. and SPIVEY, R. 1986. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA. *Theor Appl Genet*, 72: 770-777.
- SHIMAMOTO, K., TERADA, R., IZAWA, T. and FUJIMOTO, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature*, 338: 274-276.
- SNAPE, J.W. and LAWRENCE, M.J. 1971. The breeding system of *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 27: 299-302.
- SPIELMANN, A. and SIMPSON, R.B. 1986. T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol Gen Genet*, 205: 34-41.
- SUKHAPINDA, K., SPIVEY, R., SIMPSON, R.B. and SHAHIN, E.A. 1987. Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) transformed with a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: Non-chimeric origin of callus clone and low copy numbers of integrated vector T-DNA. *Mol Gen Genet*, 206: 491-497.
- UCHIMIYA, H., HIROCHIKA, H., HASHIMOTO, H., HARA, A., MASUDA, I., KASUMIMOTO, T., HARADA, H., IKEDA, T.E. and YOSHIOKA, M. 1987. Co-expression and inheritance genes in transformants obtained by direct DNA transformation of tobacco protoplast.
- WALLROTH, M., GERATS, A.G.M., ROGERS, S.G., FRALEY, R.I. and HORSCH, R.B. 1986. Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*, *Mol. Gen. Genet*, 202: 6-15.
- WEBB, J.K. and MORRIS, P. 1994. Methodologies of Plant Transformation. In: A. Gatehouse, V.A. Hilder and D. Boulter (Eds.). 'Plant Genetic Manipulation for Crop Improvement. Chapman & Hall, London.
- WEISING, K., SCHELL, J. and GUNTER, K. 1988. Foreign Genes in Plants Transfer, Structure, Expression and Applications. *Ann. Rev. Genet.*, 22: 421-477.



## ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu.

1993 yılında Zootekni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

1993 yılından beri MEB'na bağlı Sınıf Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.

