

AKÜ FEMÜBİD 17 (2017) 021004 (377-392)
DOI: 10.5578/fmbd.58669

AKU J. Sci. Eng.17 (2017) 021004 (377-392)

Araştırma Makalesi / Research Article

Gen Teknolojisi ve Bitkilerde Genetik Transformasyon Yöntemleri

Tuğçe Kalefetoğlu Macar¹, Oksal Macar¹, Emine Yalçın², Kültiğin Çavuşoğlu²

¹Giresun Üniversitesi, Şebinkarahisar Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Giresun

²Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun

e-posta: tugce.macar@giresun.edu.tr

Geliş Tarihi: 26.12.2016 ; Kabul Tarihi: 21.08.2017

Özet

Genetik mühendisliği uygulamaları tarla bitkilerinin modern moleküler ıslahında önemli biyoteknolojik araçlar haline gelmiştir. 1990lardan itibaren, bitki hücrelerine yabancı DNA'yı aktarmak için çeşitli yeni ve etkili genetik transformasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Yaygın gen aktarma metodları genellikle doğrudan ve dolaylı transformasyon diye ayrılmaktadır. Her tekniğin belli avantajları ve dezavantajları olsa da, günümüzde transgenik bitkilerin üretimi birçok bitki türü için rutin bir süreç haline gelmiştir. Yine de, tekrarlanabilir bir transformasyon metodu elde edebilmek için ihmal edilmemesi gereken birçok önemli etken vardır. Bu çalışma transgen teknolojisini kısaca gözden geçirmeyi ve bitki genetik transformasyonu için günümüzde kullanılmakta olan metodları yeniden derlemeyi amaçlamaktadır.

Anahtar kelimeler

Bitki; Biyoteknoloji;
GDO; Gen Teknolojisi;
Transformasyon;
Transgenik.

Gene Technology and Plant Genetic Transformation Methods

Abstract

Genetic engineering applications have become important biotechnological tools in the modern molecular breeding of crops. Since 1990s, various new and efficient genetic transformation methods for delivering exogenous DNA to plant cells have been developed. Common gene insertion methods are usually divided into direct and indirect transformation. Despite each technique has certain advantages and disadvantages, production of transgenic plants has become a routine process for many plant species nowadays. Still, In order to obtain a reproducible transformation methodology, there are many important factors those should not be omitted. This work aims to overview the transgene technology and to review the currently used methods for plant genetic transformation.

Keywords

Plant; Biotechnology;
GMO; Gene
Technology;
Transformation;
Transgenic.

1. Giriş

Dünyadaki tarım ve çiftçilik; gıda ya da hayvan yemi olarak kullanılmak üzere yetiştirilen tarla bitkileri üzerine kuruludur. Bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler de dahil olmak üzere verimi ve kaliteyi etkileyecek çok sayıda sınırlayıcı faktör mevcuttur. Bu güçlüklerle karşı binlerce yıldır ıslah çalışmaları yapıyor olsa da, tarla bitkilerinin klasik ıslah

© Afyon Kocatepe Üniversitesi çalışmalarından elde edilen verimlilik artışı; ekilebilir alanların kritik sınırlara gelmesi nedeniyle, giderek artan dünya nüfusunun temel gıda ihtiyaçlarının karşılanmasına yetmemektedir. Bu durum bitki ıslah çalışmalarında yeni teknolojilerin kullanılmasını gündeme getirmiştir (Safitri *et al.*, 2016; Halford, 2012). Gen teknolojisi; transgenler oluşturarak akraba olmayan türler arasında genetik değişim ve rekombinasyon yapabilmek için biyolojik

barrierleri aşabilen ve böylece ıslah edilmiş bitki ve hayvanların geliştirilmesinde kullanılan bir yoldur (Holst-Jensen, 2009). Bu teknoloji sayesinde; bitkilere, besin değerlerinin, kirleticilere karşı hoşgörülerinin, patojen dirençlerinin geliştirilmesi ya da bitki metabolizması çalışmaları yapmak gibi amaçlar ile yeni genler aktarılmakta ve böylece tarla bitkilerinde kalite ve ürün artışını sağlamak için geleneksel bitki ıslah yöntemlerine katkıda bulunmaktadır (Rivera *et al.*, 2012; Barampuram and Zhang, 2011).

Gen teknolojilerinin uygulanmaya başlanmasıyla, konak bitkilere evrimsel olarak uzak olan diğer bitkilerin, fungusların, virüslerin, bakterilerin ve hatta hayvanların bile genlerini aktarmak mümkün olmuştur (Rivera *et al.*, 2012). “Transgenik bitki” ve “Genetiği değiştirilmiş organizma” kavramları bu şekilde ortaya çıkmış ve 1980’lerden itibaren mısır, tütün, petunya, domates, pirinç, kereviz, *Brassica napus*, buğday, üzüm, manyok, darı ve krizantem gibi genetik olarak kararlı gen aktarımlı bitkiler elde edilmiştir (Rivera *et al.*, 2012). Günümüzde; dünyadaki toplam zirai alanların %3.7’sinde transgenik tahıllar yetiştirilmekte (Int Kyn. 1) ve 2014 yılı itibarıyla ABD, Brezilya, Arjantin, Hindistan ve Kanada başta olmak üzere transgenik tahıl yetiştiren 28 ülke bulunmaktadır (Int Kyn. 2). Gelecekte transgenik tahılların çeşitliliğinin ve ekildikleri alanların artacağına kesin gözüyle bakılmaktadır (Hansen and Wright, 1999).

Bir moleküler biyoloji terimi olarak “transformasyon”; yabancı DNA’nın hücre zarından geçerek bir konak hücrenin içine doğrudan alınması ve bu hücrenin genomuna başarılı bir şekilde katılması olarak tanımlanmaktadır (Saeed and Shahzad, 2015). Bitki transformasyonu temel olarak yeni gen dizilerinin bitki genomuna rastgele kaynaşması ile sonuçlanır. Bununla beraber 15 yılı aşkın süredir gerçekleşen büyük gelişmeler bu kaynaşma üzerinde daha çok kontrol sağlanmasını ve bitki hücrelerindeki DNA dizilerine daha kesin ve hedeflenmiş modifikasyonları mümkün kılmaktadır (Baltes and Voytas, 2015). Transformasyon ilk kez

1920’lerin sonlarında F. Griffith tarafından keşfedilmiştir (Griffith, 1928). Bazı tarla bitkilerinde yabancı DNA’nın bitki hücrelerine aktarımı için etkili transformasyon yöntemlerinin eksikliği, bitki genetik mühendisliği uygulamalarında hala bir güçlük olarak görünmektedir (Barampuram and Zhang, 2011). Transformasyonu güçleştiren en büyük sorun; DNA’nın oldukça büyük bir elektriksel yüke sahip, yönlendirilmesi güç ve hücre zarından geçemeyen bir makromolekül olmasıdır (Rivera *et al.*, 2012). Buna rağmen son yıllarda transformasyona karşı 10 nm’lik hidrofobik bir bariyer gibi davranan hücre zarını delmek için biyolojik, kimyasal ve fiziksel yöntemler geliştirilmiştir (Rivera *et al.*, 2014). Böylece bitkilerdeki yeni ve tekrarlanabilir transformasyon yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli başarılar kazanılmıştır (Barampuram and Zhang, 2011).

Transgenik bitki üretiminin başarılı sayılabilmesi için gerekli temel unsurlar;

- Güvenilir doku kültürü rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi,
- Gen yapılarının ve genlerinin bitki hücrelerine girmesi için gerekli olan etkili transformasyon tekniklerinin hazırlanması,
- Transgenik bitkilerin geri kazanılması ve çoğaltılması,
- Etkili ve kararlı gen ifadesi için transgenik bitkilerin moleküler ve genetik karakterizasyonu,
- İhtiyaç duyulması halinde genlerin elit çeşitlere geleneksel ıslah yöntemleriyle aktarılması,
- Transgenik bitkilerin çevredeki biyotik ve abiyotik stresleri hafifletmedeki etkinlikleri açısından değerlendirilmeleri olarak sıralanabilir (Sharma *et al.*, 2005).

2. Bitkilerde Kullanılan Etkili Transformasyon Yöntemleri

Etkili transformasyon tekniklerinin uygulanması transgenik bitki üretimindeki en zorlu noktalardan biridir. Uygun transformasyon tekniğinin seçilmesi ve geliştirilmesi gibi transgenik tarla bitkilerinin rejenerasyonu da otuz yıllık teknolojik ilerlemeden

sonra bile hala aşılması gereken bir güçlük olarak bilinmektedir (Altpeter *et al.*, 2016).

Genetik transformasyonun başarılı olması kadar tekrarlanabilir olması da önemlidir. Bunun için göz önünde bulundurulması gereken bazı gereklilikler şöyle sıralanabilir:

- Tek seferde çok sayıda transformasyona izin veren düşük maliyetli kolay teknikler kullanılması,
- Tehlikeli yöntemlerden ve maddelerden kaçınarak kullanıcı güvenliğinin sağlanması,
- Tekniğin asgari ayar gerektirmesi,
- Arzu edilen DNA'nın istenmeyen vektör diziler olmaksızın kararlı bir şekilde hücreye sokulabilmesi, böylece sadece istenen genin entegrasyonunun sağlanması ve ifade edilebilmesi,
- Her bir hücreye az sayıda genetik kopya sokulması,
- Gen aktarılmış tek bir hücreden tüm bir transgenik bitkinin rejenera edilebilmesi (Rivera *et al.*, 2012).

Bitki transformasyonu birbirini izleyen iki basamaktan oluşmaktadır:

(1) Geçici transformasyon: DNA'nın bitki hücrelerine sokulmasıdır. Bu aşamada transgenler henüz genomla kaynaşmamıştır.

(2) Kararlı transformasyon: Bitki hücrelerine aktarılan DNA'nın genomla kaynaştığı aşamadır.

Temel bitki biyoteknolojisinde her iki aşama da kullanışlıdır. Ancak istenilen özellikleri sonraki kuşaklara aktarabilen transgenik bitkilerin üretimi için ikinci aşama şarttır (Altpeter *et al.*, 2016).

Yabancı DNA'nın bitki hücrelerine aktarılabilmesi için mevcut olan transformasyon yöntemleri genel olarak doğrudan ve dolaylı yöntemler olmak üzere iki büyük kategoriye ayrılabilir (Rao *et al.*, 2009; Rakoczy-Trojanowska, 2002). Dolaylı yöntemlerde yabancı genin konak hücreye aktarılması bir bakteri hücrelerine ihtiyaç duyarken; doğrudan transformasyon yöntemlerinde böyle bir aracı hücreye gereksinim yoktur (Rao *et al.*, 2009; Tzfira and Citovsky, 2006). Bitkilerde en çok kullanılan

transformasyon yöntemleri tabloda karşılaştırılmıştır (Rivera *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2012; Barampuram and Zhang, 2011) (Tablo 1).

2.1. Gen transformasyonundadolaylı yöntem

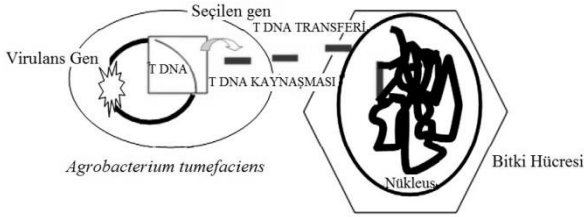
2.1.1. *Agrobacterium aracılığıyla transformasyon*

Bitkilerde dolaylı transformasyon, istenilen genin hedef hücreye *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium rhizogenes* gibi plazmid bulunduran bakteriler aracılığıyla taşınmasını ifade eden yöntemdir (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Patnaik and Khurana, 2001; Zupan *et al.*, 1997). *Agrobacterium* türleri üzerine ilk çalışmalar 100 yıl kadar önce bitkilerdeki taç gali hastalığı etkeninin araştırılması sırasında başlamış ve *A. tumefaciens* ilk kez 1897 yılında asma bitkisinde bulunan gallerden izole edilmiştir (Hwang *et al.*, 2015). *A. tumefaciens*, bitkilerde taç tümörüne sebep olan Ti plazmidine, *A. rhizogenes* ise saçak kök hastalığını teşvik eden Ri plazmidine sahiptir (Barampuram and Zhang, 2011; Meyers *et al.*, 2010). *Agrobacterium* ve bitki hücreleri arasındaki ilk etkileşim, bitkinin rizosfere salgıladığı çeşitli sinyallerin, bakteride bulunan Ti plazmidinde kodlanan virulans genin (*vir gen*) ve kromozomal virulans genin (*chv gen*) ürünlerinin yardımıyla bakteri tarafından algılanmasıyla başlamaktadır. Sonrasında hareketli olan bakteriler konak bitki hücrelerine doğru yüzerek bu hücrelerle temas ederler. Enfekte olan bitki hücreleri VIP1(*AgrobacteriumVirE2* ile etkileşen protein 1)'in bitki nükleusuna doğru fosforilasyonuna ve translokasyonuna sebep olan MAP kinaz (mitogen activated protein kinase) sinyalizasyonunu başlatarak savunma genlerinin ifadesini teşvik eder. Aktarılabilecek DNA'nın bitki nükleusuna girişini kolaylaştırmak için *Agrobacterium* da VIP1'in kontrolünü ele geçirebilir (Hwang *et al.*, 2015). *A. rhizogenes* aracılığıyla kök transformasyonu, *A. tumefaciens* transformasyonundan daha az ilgi çekmektedir. Bunun temel nedeni, *A. rhizogenes* tarafından saçak kök transformasyonuna uğrayan bitkilerde rejenerasyonun zor olmasıdır (Barampuram and Zhang, 2011).

Tablo 1. Bitkilerde en çok kullanılan transformasyon yöntemleri; avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Prosedür	Avantajlar	Dezavantajlar
Agrobacterium	Transgen taşıyan bir plazmidi aktaracak olan bitki patojeni bir bakteri kullanılır.	Genom entegrasyonu kesindir, düşük kopya sayısı ile transgenlerin yerleştirilmesi kolaydır, genin entegrasyonu, ifadesi ve kalıtımı nesiller boyunca kararlıdır. Birçok dikotil bitki ve bazı monokotil tarla bitkileri için etkili ve tekrarlanabilir protokolleri vardır. Yüksek verimliliğe sahiptir.	Süreç yavaştır. Bitkide bilinmeyen genetik ifadelerle sebep olabilecek gereksiz vektörler aktarılabilir. Steril protokoller gerektirir.
Elektroporasyon	DNA kuvvetli elektrik atımları ile geçirgenliği artırılan hücre zarındaki porlardan hücre içine sokulur.	Tüm bitki protoplast çeşitlerine uygulanabilir. Farklı hücre tipleri kullanılabilir. Kolay, hızlı ve ucuzdur.	Zahmetli protokolleri vardır. Çoğunlukla protoplastlara uygulanır. Transformasyon verimi düşüktür.
Biyolistik	Genlerle kaplanmış yüksek yoğunluktaki taşıyıcı partiküller hücrelere doğru hızla atılır ve bir adsorbsiyon mekanizmasıyla DNA'yı hücre içine bırakırlar.	Kolaydır. Hücre duvarına herhangi bir ön işlem gerekmez. Farklı hücre tipleri için uygundur ve hücrenin fizyolojik özelliklerinden bağımsızdır. Çoklu transgen aktarımı mümkündür.	Pahalıdır. Transgenlerin çoklu kopyalarının aktarılması riski vardır. Transformasyon verimi düşüktür. Sürekli optimizasyon gerektirir. DNA ve hücreler hasar görebilir.
Vakum infiltrasyon	Vakum uygulaması, negatif bir atmosferik basınç yaratarak <i>Agrobacterium</i> gibi bakterilerin sızmasına izin veren hücreler arası hava boşluklarını artırır.	Kolay ve hızlıdır. Orta derecede verimlidir. Çok sayıda bağımsız hücre transformasyonu gerçekleşir.	Bazı <i>Agrobacterium</i> suşları belirli hücre tiplerini enfekte edemez. Genin birden fazla kopyasının sokulması riski vardır.
Ultrason	Akustik kavitasyon zar geçirgenliğini değiştirerek DNA'nın adsorbsiyonunu kolaylaştırır.	Yüksek verime sahiptir. Orta derecede maliyetlidir. Farklı hücre tiplerine uygulanabilir.	Hücre zarını parçalayarak hücrelere zarar verebilir.
Mikroenjeksiyon	Bir enjeksiyon pipeti aracılığıyla DNA'nın doğrudan bitki hücresinin içine sokulmasıdır.	Transformasyon verimi olağanüstü yüksektir. Plazmidlerin ve bütün kromozomların aktarılmasına olanak sağlar.	Pahalı, zahmetli ve yavaştır.
Silikon karbid fiberler	Silikon karbid fiberler doku süspansiyonu ile karıştırılır ve aşınmaya yol açarak DNA'nın içeri girmesini sağlar.	Kolay, hızlı ve düşük maliyetlidir. Farklı hücre tiplerine uygulanabilir.	Verim çok düşüktür. Hücreler zarar görebilir ve rejenerasyon yetenekleri düşebilir. Fiberlerin solunması araştırmacıya zararlıdır.
Cam boncuklarla çalkalama	Cam boncuklarla hızlı bir şekilde çalkalama plazmid DNA'sının içeri girmesine olanak verir.	Kolay, hızlı ve düşük maliyetlidir. Gelişmiş cihazlara, kimyasal uygulamalara ve enzim karışımlarına gereksinim yoktur.	DNA hasarından dolayı verim düşüktür.
PEG	Plazmid izole edilmiş protoplastlarla hafifçe karıştırılır. Ortama CaCl ₂ , mannitol gibi maddeler içeren PEG çözeltisi eklenir.	Kolaydır ve pahalı ekipmana ihtiyaç duymaz.	Transformasyon verimi düşüktür. Transformasyonda protoplastlar kullanılmadan dolayı, gen aktarılmış olan protoplastların tam bir bitki oluşturmak üzere rejenerasyonu zordur.

Plazmidler tek bir bakteri hücresinde 50 ya da daha çok sayıda bulunabilen, bakteriyel kromozomlardan ayrı, bağımsız ve genellikle halkasal DNA molekülleridir (Rivera *et al.*, 2012). Bakteriyel kromozomlara benzer bir şekilde kopyalanabilen ve konak içinde kendi replikasyonlarını düzenleyebilen genler taşımaktadırlar. Transformasyon için kullanılacak bir plazmidin boyutu 5-12 kilobaz çifti (kbp) arasında değişebilmektedir (Hagemann, 2004; Bendich, 1987). Genetik bitki transformasyonunda *Agrobacterium*'un patojenitesinden yararlanılmakta ve bakterinin taşıdığı plazmid, yabancı genin bitki hücresine aktarılmasını sağlayan bir vektör rolü üstlenmektedir (Şekil 1) (Rao *et al.*, 2009). Vektör plazmidlere yeni genler eklenirken; plazmidlerdeki tümör oluşturan genler uzaklaştırıldığından transformasyonda kullanılan plazmidler tümör oluşturma yeteneğini yitirmektedirler (Rivera *et al.*, 2012).



Şekil 1. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi (Rao *et al.*, 2009).

A. tumefaciens taşıdığı DNA'nın bir kısmını (transfer DNA; T-DNA) çeşitli bitkilere aktarabilmekte ve bu sayede üretilmiş pek çok transgenik bitki bulunmaktadır (Safitri *et al.*, 2016; Harst *et al.*, 2015; Mozsár *et al.*, 2015; Hiei *et al.*, 2014; Yesmin *et al.*, 2014; Rahmawati *et al.*, 2010; Toki, 1997). *A. tumefaciens* aracılığıyla gen transfer mekanizması bakteri kolonizasyonu, bakterilerdeki hastalık yapıcı sistemin aktifleşmesi, T-DNA transfer kompleksinin oluşması, T-DNA transferi ve T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonunu içeren birkaç basamaktan oluşmaktadır (Barampuram and Zhang, 2011). *Agrobacterium* – aracılığıyla T-DNA transferini etkili şekilde gerçekleştirmek için; bitki genotipleri, bitki dokularının kaynağı, *Agrobacterium* suşları, ortamın tuz miktarı ve pH'ı, *Agrobacterium* - doku etkileşimlerinin süresi ve sıcaklığı ile T-DNA teşvik edici bileşiklerin kullanımı

gibi birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır (Opabode, 2006). *Agrobacterium* hücrelerinin yaralı doku bölgelerinin etrafındaki bitki hücreleriyle yakın temasa geçmesini teşvik eden prosedürlerin, T-DNA transferini arttırdığı göz önünde bulundurulmalıdır. *Agrobacterium* – aracılığıyla transformasyon için hedef materyal olarak embriyonik kültürler, olgunlaşmamış veya olgunlaşmış zigotik embriyolar, olgunlaşmış tohumdan elde edilen kallus, meristemler, gövde uçları, birincil yaprak nodları, kesilmiş yaprak ayaları, kökler, kotiledonlar (nod kısımları dahil ya da hariç), gövde segmentleri ve kallus süspansiyon kültürleri gibi çeşitli eksplantlar kullanılabilir (Barampuram and Zhang, 2011).

Basitliği ve etkinliği sayesinde, bu yöntemle çok sayıda kararlı transformant üretmek mümkün olmaktadır (Michielse *et al.*, 2005). Ayrıca büyük, tek parça DNA segmentlerinin aktarılabilmesi, düşük kopya sayılarına sahip basit transgenlerin sokulabilmesi, kararlı entegrasyon ve aktarılan genlerin nesiller boyunca kalıtılabilmesi gibi sebeplerden *Agrobacterium* aracılığıyla gen transformasyonu hem diğer bakteri suşlarıyla gerçekleştirilen dolaylı yöntemlere göre (Broothaerts *et al.*, 2005) hem de doğrudan transformasyon tekniklerine göre daha çok tercih edilmektedir (Barampuram and Zhang, 2011). Bakterinin taşıdığı tek bir T-DNA'ya bağlı birden çok genin aktarılması mümkündür. Yöntem, her biri farklı transgen taşıyan farklı bakteriyel suşların aynı bitki dokusunu aynı anda enfekte etmesine ve böylece birden çok genin tek bir bitki dokusuna aktarılmasına da olanak vermektedir (Naqvi *et al.*, 2010).

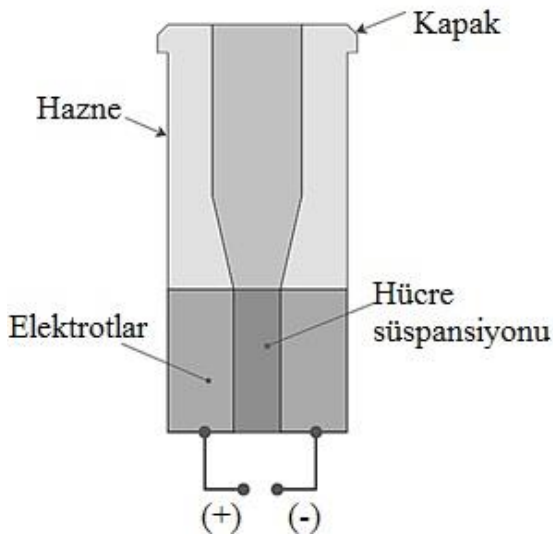
2.2. Gen transformasyonundadoğrudan yöntem

2.2.1. Elektroporasyon

Elektroporasyon, elektrik atımları aracılığıyla hücre membranları üzerinde polarite değişimine sebep olarak hücre yüzeyinde por oluşturan ve böylece DNA'nın hücrelere girişini kolaylaştıran bir tekniktir (Saulis *et al.*, 1991; Fromm *et al.*, 1986). Birçok bitkisel doku için basit, hızlı ve yüksek verimliliğe

sahip olduğundan, genetik transformasyonda sıklıkla kullanılmaktadır (Hjouj and Rubinsky, 2010; Danilova, 2007). Elektroporasyon yöntemi kullanılarak, hem monokotil hem de dikotil bitkilerin protoplastlarında başarılı transformasyonlar yapılmıştır (Barampuram and Zhang, 2011). Mısır, buğday, pirinç, çavdar, havuç gibi birçok transgenik tarla bitkisi üretiminde yaygın olarak kullanıldığı halde (Sorokin *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 1990; Toriyama *et al.*, 1988; de la Peña, 1987; Fromm *et al.*, 1986; Fromm *et al.*, 1985, Zimmermann and Vienken, 1982) transformasyondan sonraki rejenerasyon için zahmetli protokoller gerektirdiği bilinmekte ve çoğunlukla protoplastlara uygulanabilmektedir (Qayyum *et al.*, 2009; Rakoczy-Trojanowska, 2002). Yine de ekonomik öneme sahip tahılların da içinde bulunduğu monokotil bitkilerin *Agrobacterium* enfeksiyonuna direnç göstermesi sebebiyle önemini korumaktadır (Fromm *et al.*, 1986).

Elektroporasyonla genetik transformasyon gerçekleştirebilmek için kullanılan cihaz elektroporator olarak adlandırılır (Şekil 2). Elektroporator; alüminyumdan iki paralel plaka elektrot bulunduran 4 mm'lik bir yarığa sahip olan 80-800 µl'lik bir haznedir. Elektrotlar; süspansiyon içinde bütün halinde bulunan hücreleri ve hücre içine sokulması istenen DNA'yı içeren sulu bir elektrolit ile temas halindedir.



Şekil 2. Elektroporator (Rivera *et al.*, 2012).

Her bir uygulama 1.6 - 2.0 kV arasında değişen ve 10^{-6} 'dan 10^{-2} s'ye kadar süren bir ya da daha fazla

elektriksel atım uygulamasından oluşur. Uygulanan bu voltaj, normal basınç ve sıcaklık koşulları altında, potansiyel farkı 0.5 V'tan daha büyük olduğunda (membran voltaj eşiği 0.5-1 V arasındadır), plasma membranındaki bir elektrikel dengesizliğe bağlı olarak hücrel geçirgenliğe yol açar. Bu sayede DNA, membran bütünlüğünü ya da hücrel işlevleri değiştirmeksizin, hücrelerin içine sokulabilir (Djuzenova *et al.*, 1996). Sonrasında, hücrel membranların eski haline dönmesi ve gen aktarılmış hücrelerin izolasyonu teşvik edilir (Rivera *et al.*, 2012).

DNA'nın yüzey konsantrasyonu ve hücrelerin membran delinmesine karşı dayanıklılığı gibi faktörler elektroporasyon verimini etkileyebilir. Ayrıca, çoğunlukla protoplastların eksplant olarak kullanılması transformantların rejenerasyonunu zorlaştırmaktadır; çünkü pek çok bitki türünde protoplasttan-bitkiye rejenerasyon sistemi geliştirilmemiştir. Yöntem intakt dokulara uygulandığında, bu dokuların kalın hücre duvarlarının elektroporasyon için fiziksel bariyerler oluşturduğu görülmüştür (Barampuram and Zhang, 2011).

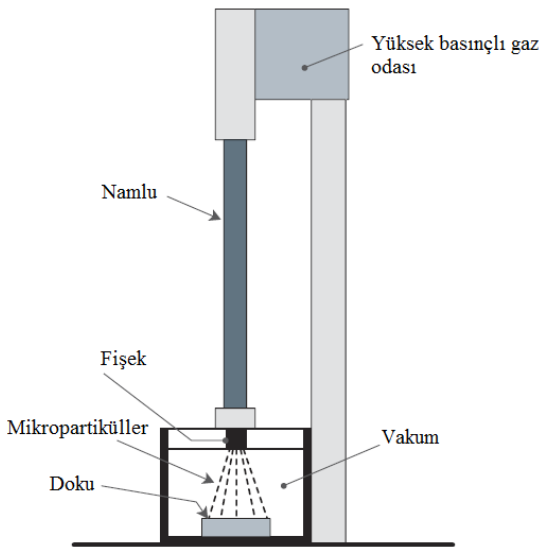
2.2.2. Biyolistik (Gen tabancası)

Partikül bombardımanı ya da gen tabancası tekniği olarak da bilinen biyolistik yöntemi; yaklaşık 2 mikron çapındaki yüksek yoğunluklu taşıyıcı makropartiküllerin (mermiler) bitki hücrelerine doğru hızla atılması ve hücrelerden geçerken taşıdıkları DNA'yı hücre içine bırakmaları esasına dayanır. Aktarılabilecek olan DNA ile kaplı altın, tungsten ya da platin partiküller kullanılır (Southgate *et al.*, 1995). Yöntem, başlangıçta, *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyona dirençli monokotillerin transformasyonunu sağlamak amacıyla denenmiştir (Rivera *et al.*, 2012). 1987'de Cornell Üniversitesi'nde tahıllarda gen aktarımının üstesinden gelebilmek için geliştirilmiş (Sanford *et al.*, 1987) olsa da hemen hemen tüm bitkilerin tüm doku tipleri için uygundur (Hansen and Wright, 1999). *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon dışında en çok kullanılan transformasyon yöntemidir (Matsumoto and Gonsalves, 2012).

Doğrudan transformasyon yöntemleri içinde oldukça popüler olmasının sebebi; biyolistik yöntemin birçok tür, organel, bakteri, fungus ve hatta hayvansal hücrelerde kullanılabilmesi (Rakoczy-Trojanowska, 2002); sürecin kısa sürede tamamlanması, transgenik bitki üretiminin düşük maliyet gerektirmesi; çoklu genlerin veya kimerik DNA'nın (farklı organizmalardan ve homolog olmayan kaynaklardan gelen DNA'ların birleşmesi) aktarım kolaylığıdır (Rivera *et al.*, 2012).

Hücreler, protoplastlar, meristemler gibi düzenli dokuların, embriyoların ya da kallusun hedef olarak kullanılabilmesi, bir vektöre ihtiyaç duyulmaması ve hücrenin membran bileşenleri ile elektriksel potansiyeli gibi elektrofizyolojik özelliklerinden bağımsız olması biyolistik yöntemin en önemli avantajlarıdır (Sanford *et al.*, 1993).

Gen tabancası (Şekil 3), ortada bir diyaframla ayrılan bir yüksek basınç odası ile bir alçak basınç odasından oluşur (Rivera *et al.*, 2012). Diyafram aşırı basınca bağlı olarak yırtıldığında oluşan basınç farkı, bir makropartikülü durdurma perdesine çarpana kadar namlu boyunca hızlandırır. Makropartikülün uç kısmı önceden DNA ile kaplanmış mikropartiküllere sarılmıştır. Durdurma perdesi; mikropartiküllerin geçmesine izin verirken, makropartikülleri tutmak için tasarlanmış bir tel ağıdır.



Şekil 3. Gen tabancası (Rivera *et al.*, 2012).

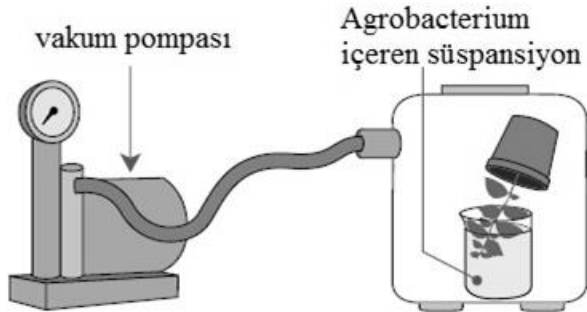
Sonuç olarak, makropartikülün yüzeye çarpmasını takiben, mikropartiküller, petri kabında bulunan hedef dokuya doğru yol almayı sürdürürler. Mikropartiküllerin hücreye çarpmasıyla beraber bazı transgenler serbest kalır ve kromozomal DNA ile kaynaşır (Sanford *et al.*, 1993).

Biyolistik süreci, süreci izleyecek doku kültürü boyunca hedef dokunun kontaminasyonunu engellemek için, steril koşullar altında gerçekleştirilmelidir (Barampuram and Zhang, 2011). Bu teknikteki transformasyon verimliliği; sıcaklık, hücre miktarı, hücrelerin rejenerasyon yeteneği, DNA-kaplı parçacık sayısı gibi birçok değişkene bağlıdır (Rivera *et al.*, 2012). Mikropartiküllerin tipi ve boyutları önemli tercihlerdir; çünkü bunlar, hızlandırılmış mikropartiküllerin hücreleri delme derinliği kadar hedef hücrelerdeki hasarın derecesini de etkilemektedir (Barampuram and Zhang, 2011). Mikropartikülleri hücre içine sokma olasılığı parçacıkların kinetik enerjileri ile orantılıdır. Bombardımandan önce hedef hücrelerin kısmen kurutulması ya da osmotik ön muameleye tabi tutulması, başarılı transformasyon sıklığını arttırmak için yaygın olarak kullanılan bir stratejidir (Schmidt *et al.*, 2008). Bombardıman ortamında osmotik değer oluşturmak için mannitol ya da sorbitol kullanılır ya da kısa süreli hava-kurutması kullanılarak yüksek kararlılıkta transformant oluşumu sağlanır (Kikkert *et al.*, 2004). Tüm bu parametreler kullanılacak olan hedef dokuya göre sürekli optimize edilmelidir (Taylor and Fauquet, 2002).

Bugüne kadar geliştirilen transformasyon yöntemlerinin her biri kendine özgü avantajlara sahip olsa da *Agrobacterium* ve partikül bombardımanı günümüzde en çok kullanılan yöntemlerdir (Dai *et al.*, 2001). Hem monokotil hem de dikotil bitki türlerinde mikromermi teknolojisinin uygulandığı pek çok çalışma yayınlanmıştır (Sparks and Jones, 2009; Wright *et al.*, 2001; Sagi *et al.*, 1995).

2.2.3. Vakum infiltrasyonu

Agrobacterium aracılığıyla bitki transformasyonunu kolaylaştırmak için kullanılan yöntemlerden biridir (Şekil 4). Vakum infiltrasyonu uygulamasında; bakteriler mitotik ve mayotik bölünmelerin yoğun olarak gerçekleştiği bitki kısımlarına doğrudan sokulur. Bunun için erken generatif dönemdeki bitkiler *Agrobacterium* içeren %5'lik sukroz süspansiyonu içeren bir kaba, sadece çiçek durumları bakteriler ile temas edecek şekilde, baş aşağı yerleştirilir. Bu kaplar genellikle birkaç dakika boyunca 0.05 bar'lık basınca maruz bırakılır (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Belirli bir zaman sürecinde yapılan bu vakum uygulamasında fiziksel olarak bitki dokusundaki hücreler arasında hava boşluklarının azalmasına sebep olan bir negatif atmosferik basınç yaratılmış olur. Böylece patojenik bakterilerin hücrelerarası boşluklara girmesi sağlanır. Bir bitki parçasının ya da dokusunun vakuma maruz kaldığı sürenin uzaması halinde aşırı hidrasyon gerçekleşebileceğinden, vakum süresinin ayarlanması hayati öneme sahiptir (Rivera *et al.*, 2012). Vakum infiltrasyonunun bu amaçla kullanımı ilk kez 1993 yılında *Arabidopsis* bitkisinde gerçekleşmiş (Bechtold *et al.*, 1993) ve yöntem o zamandan beri farklı bitkilerdeki *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonu geliştirmek üzere uygulanmaya devam etmiştir (Safitri *et al.*, 2016; Mariashibu *et al.*, 2013; Nanasato *et al.*, 2013; Chopra and Saini, 2012). Yöntemin en büyük avantajı *in vitro* kültüre ihtiyaç duymamasıdır (Rakoczy-Trojanowska, 2002).



Şekil 4. Vakum infiltrasyonu (Rivera *et al.*, 2012).

2.2.4. Ultrason

Agrobacterium aracılığıyla gerçekleştirilen bitki transformasyonu; hem konak bitki özgülüğü hem de *Agrobacterium*'un hedef dokudaki uygun hücrelere ulaşamaması sebepleriyle kısıtlanabilmektedir. Dikotiller, monokotiller ve gimnospermler gibi çeşitli bitki gruplarındaki bu engelleri aşmak ve DNA transferini arttırmak amacıyla geliştirilen yöntemlerden biri de ultrasonik dalgalardır. Bitki protoplastlarına ya da bütün halindeki bitki hücrelerine yeni genlerin aktarılması için kullanılan bir yöntemdir (Trick and Finer, 1997; Joersbo and Brunstedt, 1992). Sonoporasyon olarak da bilinen bu yöntem; ultrasonik dalgalar aracılığıyla akustik kaviteasyon kabarcıkları oluşturarak hücre zarı geçirgenliğinin geçici olarak değiştirilmesi ve DNA gibi makromoleküllerin hücre içine alınması esasına dayanmaktadır (Miller *et al.*, 2002). Bu sırada oluşan kanallar sayesinde içsel bitki dokusunun *Agrobacterium*'a maruz kalma yoğunluğu ve DNA'nın hücrelere alınma sıklığı artmaktadır (Liu *et al.*, 2006). Bu işlem için kullanılacak olan dokular; bir mikrosantrifüj tüpündeki birkaç mililitrelik sonikasyon ortamında süspansiyon edilir. Daha sonra ortama plazmid DNA eklenir ve ortam hızla karıştırıldıktan sonra, örnekler sonikasyon için hazırlanmış olur. Ultrasonik dalgalar oluşurken biyolojik hücrelerde ya da dokularda fiziksel düzensizliklere sebep olabilecek birçok olay gerçekleşir. Transformasyonda kullanılan ultrasonik dalgaların canlılarda oluşturduğu biyolojik etkilerin en önemli iki mekanizması kaviteasyon ve ısınmadır. Isınma olayı hem ultrasonik probun kendisinin ısınmasından hem de kaviteasyon sırasındaki ısı oluşumundan kaynaklanmaktadır (Miller *et al.*, 2002). Ultrasonik yöntemde oluşan akustik kaviteasyon ve dokuların sıcaklığının biyolojik sıcaklığın birkaç derece yukarısına kadar ısınması; hücre metabolizmasını arttırabilir ve dokunun perfüzyonuna yol açabilir (Nyborg *et al.*, 2001). Ultrason uygulamasının yol açtığı kaviteasyon kabarcıklarının membranları tamamen yıkarak hücreye zarar vermesi riski mevcuttur (Liu *et al.*, 2006). Buna rağmen bu yöntemin yaprak dokuları, olgunlaşmamış kotiledonlar, somatik ve zigotik

embriyolar, kökler, gövdeler, sürgün uçları, embriyonik süspansiyon hücreleri ve bütün halindeki fidelerde transformasyon verimini arttırdığı bilinmektedir (Trick and Finer, 1997). Bu teknikten yararlanılarak gen aktarılmış birçok transgenik bitki bulunmaktadır (Subramanyam *et al.*, 2015; Yenchon and Te-chato, 2015; Beranová *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2001; Sawahel, 1996).

2.2.5. Mikroenjeksiyon

Madeni yağ içeren, cam bir mikro-kapiler enjeksiyon pipetiyle DNA'nın bitki hücresine doğrudan ve kesin olarak aktarılması esasına dayanır (Rao *et al.*, 2009; Crossway *et al.*, 1986). Bu işlem pahalı bir mikromanipülatör gerektirir. DNA'nın hücre nükleusuna girişi sırasında hücreler hassas bir emme gücüne sahip olan ve yine madeni yağ içeren bir tutma pipeti ile sabitlenir (Rao *et al.*, 2009). Enjeksiyon yapılmış hücreler ya da hücre yığınları daha sonra doku kültürü sistemlerinde çoğaltılarak bitki oluşturmak üzere rejenere olurlar (Barampuram and Zhang, 2011). Teknik oldukça yavaş ve zahmetli olmasına karşın oldukça verimlidir. Ayrıca aktarım açısından oldukça kesindir ve bitki hücrelerine sadece plazmidlerin değil kromozomların tamamının girişine olanak vermektedir (Jones-Villeneuve *et al.*, 1995).

Yine de kalın bir lignin ve selüloz tabakası içeren bitki hücre duvarlarının mikrokapiler cam pipet girişine engel olmasından dolayı bitki hücrelerindeki kullanımı kısıtlıdır. Mikroenjeksiyon için hedef olarak protoplastların kullanımı bu kısıtlamayı teorik olarak çözmektedir. Ancak bu durum; hidrolazların ve toksik bileşiklerin vakuolden sitoplazmaya geçerek protoplastın hızlı bir şekilde ölümüne sebep olmaları riskini taşımaktadır (Rao *et al.*, 2009).

2.2.6. Lazer mikroışınlar

Doğrudan bitki transformasyon yöntemlerinin sorunlarından biri birçok türün protoplastının bir bitkiyi yeniden oluşturamayacak kadar kırılğan olmasıdır. Ayrıca yabancı genin kloroplast gibi organellere sokulması, DNA'nın hem plazma

membranından hem de organel zarından geçmesini gerektirdiğinden oldukça zordur (Weber *et al.*, 1988). Genetik materyallerin hücrelerin içine lazer mikroışınları kullanılarak sokulması ile bu zorluklardan üstesinden gelinmektedir. Lazer ışını sayesinde; sadece bitki hücrelerinin değil organeller gibi hücre içi yapıların ve hatta tek tek DNA moleküllerinin üzerinde bile nazıkçe ve kesin olarak çalışılmalar yapılabilmektedir (Rivera *et al.*, 2012).

Lazer mikroışınları aracılığıyla transformasyon; bitki hücre duvarlarını lazer mikro ışınlarıyla delinmesi ve böylece yabancı genlerin hücre içine alınmasının kolaylaştırılması esasına dayanan bir yöntemdir (Weber *et al.*, 1990). Bu metotta, UV atımı yapan odaklanmış bir lazerden çıkan mikroışınlar ile bitki hücre duvarında kendiliğinden iyileşen delikler (yaklaşık 0.5 µm) açılması söz konusudur (Tsukakoshi *et al.*, 1984). Bu deliklerin açık kalma süresi beş saniyeden kısa olup bu süre yabancı DNA'nın içinde bulunduğu hipotonik tamponun hücre içine alınması için yeterlidir.

Bu yöntem ile çok sayıda hücreye ışınım yapılabilmekte ve hücreler DNA girişinden sonra tamamen iyileşebilmektedir. Bu avantajlarına rağmen, 100 nm'lik bir lazer ışınını odaklayabilecek, pahalı donanıma gereksinim duyduğundan yöntem fazla popüler değildir. Ayrıca lazer ışınımı biyolojik materyale zarar verebileceğinden büyük dikkat isteyen bir tekniktir (Rivera *et al.*, 2012; Lin and Ruddle, 1981). Lazer mikroışınları aracılığıyla üretilen transgenik bitkiler arasında; kavun (Khames *et al.*, 2009), buğday (Badr *et al.*, 2005), piriç (Guo *et al.*, 1995) gibi ticari bitkiler mevcuttur.

2.2.7. Silikon karbid fiberler aracılığıyla transformasyon

Silikon karbid fiberler aracılığıyla transformasyon, bitki transformasyonu için en ucuz ve en az karmaşık yöntemlerden biri olup uygulanması için fazla teknik ekipmana ve yeteneğe gereksinim göstermez (Hassan *et al.*, 2016; Kaeppler *et al.*, 1990). Bitki hücre duvarları bitki genetik

mühendisliği çalışmalarının önemli bir kolu olan DNA aktarım teknolojisi bakımından bir bariyerdir. Bu yöntemde kullanılan silikon karbid elyaflar 10-80 mm uzunluğunda, 0.6 mm çapında, karakteristik olarak sert ve kolayca kırılarak keskin uçlar oluşturan materyallerdir (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Bu materyaller keskin uçları sayesinde hücrelerde DNA'nın girişine imkan tanıyan delikler açarlar. Silikon karbid elyaflar bitki dokusu ve plazmid DNA'sı içeren bir süspansiyona eklenir ve daha sonra bir vorteks yardımıyla çalkalanır. DNA-kaplı elyaflar bitki hücreleri ve elyaflar arasındaki çarpışmalardan kaynaklanan küçük deliklerden geçerek hücre duvarına girer (Wang *et al.*, 1995). Silikon karbid elyaflar negatif yüklü olduklarından DNA'ya bağlanmaz ve böylece aktarım verimini düşürmezler (Mutsuddy, 1990). Aktarım yapılacak bitki dokuları olarak hücre yiğınları, olgunlaşmamış embriyolar ya da kallus kullanılır (Wang *et al.*, 1995).

Yöntemin verimliliği; elyaf boyutuna, vorteksleme koşullarına, kullanılan kapların şekline, bitki materyaline ve bitki hücrelerinin niteliklerine, özellikle de hücre duvarının kalınlığına, bağlıdır (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Transformasyon veriminin düşük olması, hücrelere ilerdeki rejenerasyon yeteneğini olumsuz etkileyecek zararlar verebilmesi ve elyafların solunması haline araştırmacılarda ciddi hastalıklara yol açabilmesi yöntemin en önemli dezavantajlarıdır (Songstad *et al.*, 1995). Bunlar arasında en önemli kısıtlama düşük verimliliktir. Bu sebeple, silikon karbid elyaflar aracılığıyla transformasyon; ancak gen tabancasının olmadığı ve *Agrobacterium*-aracılığıyla transformasyonun zor olduğu ya da mümkün olmadığı (çoğu monokotilde olduğu gibi) belirli durumlarda bitki transformasyonu için cazip bir alternatif yöntem olarak önerilmektedir (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Bu yöntem mısır, tütün, pamuk ve yerfıştığı gibi bitkilerde genetik transformasyon için başarıyla uygulanmıştır (Hassan *et al.*, 2016; Arshad *et al.*, 2013; Kaepler *et al.*, 1990).

2.2.8. Cam boncuklarla alkalama

Hücrelerin plazmid DNA ile cam boncuklarla dolu bir ortamda çalkalanması esasına dayanan bir yöntemdir. Karmaşık cihazlar ve özel kimyasal uygulamalar ile enzim karışımları olmadan uygulanabilen bu teknik; kolay ve ucuz olmasının yanı sıra elektroporasyon kadar kısa sürede gerçekleşebilmektedir. Ancak alkalanma sırasında çok sayıda DNA'nın hasar görmesi ve hücrelerin canlılıklarını kaybetmelerinden dolayı en verimsiz uygulamalardan biridir. Bitkilerde nadiren kullanılır (Rivera *et al.*, 2014). Grayburn ve Vick (1995) cam boncuklarla çalkalayarak yara oluşturulmuş genç *Helianthus annuus* fidelerinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla plazmid transformasyonu üzerinde çalışmalar yapmıştır.

2.2.9. Elektroforez

Monokotil embriyoları başta olmak üzere olgunlaşmamış embriyoların transformasyonu için seksenli yılların sonunda geliştirilmiş kolay ve maliyeti düşük bir transformasyon yöntemidir (Songstad *et al.*, 1995; Griesbach *et al.*, 1994).

Gen aktarımı yapılacak embriyolar, elektrotlara bağlanan iki pipet ucunun arasına yerleştirilir. Anoda bağlı pipetin dar ucunda agar, geri kalanında bir elektroforez tamponu bulunur. Katoda bağlı pipet DNA ve bir elektroforez tamponu ile karışık agar içerir. Bu pipet embriyonun apikal meristemi ile temas halindeyken; ikinci pipet embriyonun bazal apikal kısmına yerleştirilir. 15 dakika boyunca, 25 mV'luk bir voltaj ve 0.5 mA'lik bir akım elektroforez için en çok kullanılan parametrelerdir (Songstad *et al.*, 1995). Akımın açılması; embriyo boyunca DNA'nın katottan anoda doğru –apikal meristemden bazal kısma doğru- yavaşça akmasına sebep olur. Kolay ve ucuz bir teknik olmasına rağmen embriyoların hayatta kalma oranı çok düşük olduğundan bitki transformasyonunda tercih edilmez (Rakoczy-Trojanowska, 2002).

2.2.10. PEG aracılığıyla transformasyon

Geçici gen transformasyonu, son yıllarda, in vivo koşullarda proteinlerin ve protein komplekslerinin

hücre altı lokalizasyonu ile gen ifadelerinin susturulması için en etkili tekniklerden biri haline gelmiştir. Geçici gen transformasyonunun yararlarından biri kararlı gen transformasyonuna göre daha hızlı olması ve rekombinant bir proteinin haftalar içerisinde ifadesine ve analizine olanak vermesidir (Baur *et al.*, 2005). Bu amaçla en çok kullanılan tekniklerden biri de oldukça etkili bir yöntem olan polietilen glikol (PEG) aracılığıyla gerçekleştirilen protoplast transfeksiyonudur (Wang *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2013; Baur *et al.*, 2005). Polietilen glikol (PEG)-aracılığıyla transformasyon, DNA'nın protoplastların eksplant olarak kullanılmasıyla aktarıldığı bir yöntemdir (Barampuram and Zhang, 2011). Transformasyon için kullanılan protoplastlar genellikle yaprakların ya da fidelerin klorofil ve kloroplastlar bakımından zengin olan mezofil hücrelerinin enzimatik sindirimi ile izole edilirler (Wang *et al.*, 2015). Yöntem, DNA'nın izole edilmiş protoplast ile basitçe karıştırılarak aktarılması bakımından elektroporasyona benzer; fakat sonrasında DNA'nın alınması elektriksel bir atım yerine PEG eklenmesi ile tetiklenir (Barampuram and Zhang, 2011). Kolay olması ve özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarının bulunmasına karşın transformasyon sıklığının düşük olması ve birçok türde protoplastlardan tüm bir bitkiye rejenerasyonun gerçekleşmemesi gibi dezavantajları bulunan PEG-aracılığıyla transformasyon yönteminin kullanılması ile transgenik arpa ve mısır üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Barampuram and Zhang, 2011; Daveya *et al.*, 2005). PEG-aracılığıyla protoplast transformasyon sistemi *Arabidopsis*, tütün, mısır, pirinç, üzüm gibi çeşitli bitkilerde çalışılmıştır (Cao *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2013; Saumonneau *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011).

3. Sonuç

Gen teknolojisi; hücrelerdeki genetik yapının aydınlatılması ve gen ifadesi çalışmaları için kullanılmasının yanı sıra ticari öneme sahip bitkilerin verim ve kalite kriterlerini yükseltmek ile farklı biyotik ve abiyotik etkenlere karşı dirençli bitkiler üretmek için vazgeçilmez bir araç haline

gelmiştir. Genetik transformasyon bitkilerde doğal olarak mevcut olmayan ve geleneksel yöntemlerle elde edilemeyen pek çok önemli özelliğin kazanılması açısından gen teknolojisinin günümüzdeki en önemli uygulama alanlarından biridir. Farklı hücre tipleri ve farklı bitkiler için yirmi yılı aşkın süredir doğrudan ve dolaylı birçok transformasyon yöntemi geliştirilmiştir. Ancak tüm transformasyon yöntemlerinin her bitkiye uygun olmaması, hücrelerin canlılıklarının azalması, düşük verimlilik ile rejenerasyon zorlukları gibi problemler araştırmacıları sürekli olarak yeni yöntem arayışına ve yeni optimizasyon çalışmalarına itmektedir.

Transgenik bitki teknolojisinde sadece hedeflenmiş gen değişiklikleri ile verim ve kapasite artışının sağlanabilmesi, yakın gelecekte, dünya gıda ihtiyacının sağlanması için büyük umut vadetmektedir.

Kaynaklar

- Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V., Conrad, L.J., Gelvin, S.B., Jackson, D.P., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J.I., Orozco-Cárdenas, M.L., Tricoli, D.M., Van Eck, J., Voytas, D.F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z.J. and Stewart Jr., C.N., 2016. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, **28(7)**, 1510-1520.
- Arshad, M., Zafar, Y. and Asad, S., 2013. Silicon carbide whisker-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Transgenic Cotton: Methods and Protocols*, 79-92.
- Badr, Y.A., Kereim, M.A., Yehia, M.A., Fouad, O.O. and Bahieldin, A., 2005. Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **4(10)**, 803-807.
- Baltes, N.J. and Voytas, D.F., 2015. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in Biotechnology*, **33(2)**, 120-131.
- Barampuram, S. and Zhang, Z.J., 2011. Recent advances in plant transformation. *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols*, 1-35.
- Baur, A., Kaufmann, F., Rolli, H., Weise, A., Luethje, R., Berg, B., Braun, M., Baeumer, W., Kietzmann, M., Reski, R. and Gorr, G., 2005. A fast and flexible PEG-mediated transient expression system in plants for

- high level expression of secreted recombinant proteins. *Journal of Biotechnology*, **119(4)**, 332-342.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G., 1993. In-plant Agrobacterium-mediated gene-transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie*, **316(10)**, 1194–1199.
- Bendich, A.J., 1987. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome?. *BioEssays*, **6**, 279–282.
- Beranová, M., Rakouský, S., Vávrová, Z. and Skalický, T., 2008. Sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **94(3)**, 253-259.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodríguez, C. and Jefferson, R.A., 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, **433(7026)**, 629–633.
- Cao, J., Yao, D., Lin, F. and Jiang, M., 2014. PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: a valuable tool for signal transduction study in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36(5)**, 1271-1281.
- Chopra, R. and Saini, R., 2012. Use of sonication and vacuum infiltration for Agrobacterium-mediated transformation of an Indian lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivar. *Scientia Horticulturae*, **143**, 127-134.
- Crossway, A., Oakes, J.W., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C. and Shewmaker, C.K., 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics MGG*, **202(2)**, 179–185.
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R.N. and Fauquet, C., 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, **7(1)**, 25–33.
- Danilova, S.A., 2007. The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*, **54(5)**, 569–581.
- Daveya, M.R., Anthonya, P., Powera, J.B. and Loweb, K.C., 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, **23(2)**, 131–171.
- de la Peña, A., Lörz, H. and Schell, J., 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting young floral tillers. *Nature*, **235(6101)**, 274–276.
- Djuzenova, C.S., Zimmermann, U., Frank, H., Sukhorukov, V.L., Richter, E. and Fuhr, G., 1996. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1284(2)**, 143–152.
- Fromm, M.E, Taylor, LP. and Walbot, V., 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82(17)**, 5824-5828.
- Fromm, M.E., Taylor, L.P. and Walbot, V., 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, **319**, 791-793.
- Grayburn, W.S. and Vick, B.A., 1995. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Reports*, **14(5)**, 285-289.
- Griesbach, R.J. and Hammond, J., 1994. An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Science*, **102(1)**, 81–89.
- Griffith, F., 1928. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, **27(2)**, 113-159.
- Guo, Y.D., Liang, H., Berns, M.W., 1995. Laser-mediated gene transfer in rice. *Physiologia Plantarum*, **93(1)**, 19–24.
- Hagemann, R., 2004. The Sexual Inheritance of Plant Organelles. Daniell, H., Chase, C. (editors). In: *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. Springer, Netherlands, 93–113.
- Halford, N.G., 2012. *Genetically Modified Crops 2nd Edition*. Imperial College Press, London, UK, 1-4.
- Hansen, G. and Wright, M.S., 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, **4(6)**, 226-231.
- Harst, M., Bornhoff, B.A., Zyprian, E. and Töpfer, R., 2015. Influence of culture technique and genotype on the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, **39(3)**, 99.
- Hassan, M., Akram, Z., Ali, S., Ali, G.M., Zafar, Y., Shah, Z.H. and Alghabari, F., 2016. Whisker-mediated

- transformation of peanut with chitinase gene enhances resistance to leaf spot disease. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **16(2)**, 108-114.
- Hiei, Y., Ishida, Y. and Komari, T., 2014. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 1-11.
- Hjouj, M. and Rubinsky, B., 2010. Magnetic resonance imaging characteristics of nonthermal irreversible electroporation in vegetable tissue. *The Journal of Membrane Biology*, 236(1):137–146.
- Holst-Jensen, A., 2009. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, **27(6)**, 1071-1082.
- Hwang, H.H., Gelvin, S.B. and Lai, E.M., 2015. Editorial: "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". *Frontiers in Plant Science*, **6**, 1-3.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J., 1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiologia Plantarum*, **85(2)**, 230-234.
- Jones-Villeneuve, E., Huang, B., Prudhome, I., Bird, S. and Kemble, R., 1995. Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rape seed. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **40(1)**, 97–100
- Kaeppler, H.F., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W. and Cockburn, A.F., 1990. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports*, **9(8)**, 415-418.
- Khames, G., Mona, A.A., Gihan, M.H., Sadik, A.S. and Badr, Y., 2009. Application of laser microbeam cell surgery and Agrobacterium-mediated gene transformation systems in melon (*Cucumis melo* L). *Pakistan Journal of Biotechnology*, **6(1/2)**, 45-54.
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R. and Reisch, B.I., 2004. Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics. In: *Methods in Molecular Biology. Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Peña L. (editör). Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 61–78.
- Lin P.F. and Ruddle F., 1981. Photoengraving of coverslips and slides to facilitate monitoring of micromanipulated cells or chromosome spreads. *Experimental Cell Research*, **134(2)**, 485–488.
- Liu, Y., Yang, H. and Sakanishi, A., 2006. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnology Advances*, **24(1)**, 1-16.
- Mariashibu, T.S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Thebora, J., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A., 2013. Vacuum infiltration enhances the Agrobacterium-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35(1)**, 41-54.
- Matsumoto, T.K. and Gonsalves, D., 2012. Biolistic and other non-Agrobacterium technologies of plant transformation, In: *Plant Biotechnology and Agriculture*, Altman, A. and Hasegawa, P.M. (editors), Academic Press, Elsevier, 117-129.
- Meyers, B., Zaltsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S.V., Krichevsky, A., 2010. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances*, **28(6)**, 747–56.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A. and Ram, A.F., 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, **48(1)**, 1-17.
- Miller, D.L., Pislaru, S.V. and Greenleaf, J.F., 2002. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, **27(1-6)**, 115-134.
- Mozsár, J., Viczián, O. and Süle, S., 2015. Agrobacterium-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, **37(3)**, 127.
- Mutsuddy, B.C., 1990. Electrokinetic behavior of aqueous silicon carbide whisker suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, **73(9)**, 2747-2749.
- Nanasato, Y., Konagaya, K.I., Okuzaki, A., Tsuda, M. and Tabei, Y., 2013. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnology Reports*, **7(3)**, 267-276.
- Naqvi, S., Farre, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C. and Christou, P., 2010. When more is better: multigene engineering in plants. *Trends in Plant Science*, **15(1)**, 48-56.
- Nyborg, W.L., Carson, P.L. and Miller, M.W., 2001. Exposure Criteria for Medical Diagnostic Ultrasound: II Criteria Base on All Known Mechanisms. In:

- National Council on Radiation Protection and Measurements. Bethesda, Maryland.
- Opabode, J.T., 2006. Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **1(1)**, 12-20.
- Patnaik, D. and Khurana, P., 2001. Wheat biotechnology - A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology*, **4(2)**, 74-102.
- Qayyum, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Ali Shahid, A., Husnain, T. and Riazuddin, S., 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, **27(6)**, 753-763.
- Rahmawati, S., Jefferson, O.A., Sopandie, D. and Slamet-Loedin, I.H., 2010. Comparative analysis of rice transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Indonesian Journal of Biotechnology*, **15(1)**, 27-45.
- Rakoczy-Trojanowska M., 2002. Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **7(3)**, 849-58.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T. and Riazuddin, S., 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, **27(6)**, 753-763.
- Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F. and Loske, A.M., 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, **9(3)**, 308-345.
- Rivera, A.L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F. and Loske, A.M., 2014. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, **11(2)**, 184-203.
- Saeed, T. and Shahzad, A., 2016. Basic Principles Behind Genetic Transformation in Plants. In: *Biotechnological Strategies for the Conservation of Medicinal and Ornamental Climbers*, Springer International Publishing, 327-350.
- Safitri, F.A., Ubaidillah, M. and Kim, K.M., 2016. Efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using vacuum infiltration in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biotechnology*, **43(1)**, 66-75.
- Sagi, L., Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., De Smet, K., Swennen, R. and Cammue, B.P.A., 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Biotechnology*, **13(5)**, 481-485.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. and Allen, N., 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, **5(1)**, 27-37.
- Sanford, J.C., Smith, F.D. and Russel, J.A., 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, **217**, 483-509.
- Saulis, G, Venslauskas, M.S., Naktinis, J., 1991. Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **26(1)**, 1-13.
- Saumonneau, A., Laloi, M., Lallemand, M., Rabot, A. and Atanassova, R., 2012. Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, **63(3)**, 1495-1510.
- Sawahel, W.A., 1996. Ultrasound-mediated stable transformation of potato tuber discs. *Biotechnology Techniques*, **10(11)**, 821-824.
- Schmidt, M.A., Lafayette, P.R., Artelt, B.A. and Parrott, W.A., 2008. A comparison of strategies for transformation with multiple genes via microprojectile-mediated bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **44(3)**, 162-168.
- Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P. and Thorpe, T.A., 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **41(2)**, 102-112.
- Songstad, D.D., Somers, D.A. and Griesbach, R.J., 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **40 (1995)**, 1-15.
- Sorokin, A.P., Ke, X.Y., Chen, D.F. and Elliot, M.C., 2000. Production of fertile wheat plants via tissue electroporation. *Plant Science*, **156(2)**, 227-233.
- Southgate, E.M., Davey, M.R., Power, J.B. and Marchant, R., 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances*, **13(4)**, 631-651.
- Sparks, C.A. and Jones, H.D., 2009. Biolistics transformation of wheat. *Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization Protocols*, 71-92.

- Subramanyam, K., Arunachalam, C., Thaneswari, R.M., Sulaiman, A.A., Manickavasagam, M. and Ganapathi, A., 2015. Highly efficient Agrobacterium-mediated in planta genetic transformation of snake gourd (*Tricosanthes cucumerina* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **123(1)**, 133-142.
- Tada, Y., Sakamoto, M. and Fujiyama, T., 1990. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theoretical and Applied Genetics*, **80(4)**, 475-480.
- Tan, B., Xu, M., Chen, Y. and Huang, M., 2013. Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **114(1)**, 11-18.
- Tang, W., Sederoff, R. and Whetten, R., 2001. Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*, **213(6)**, 981-989.
- Taylor, N.J. and Fauquet, C.M., 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biology*, **21(12)**, 963-977.
- Toki, S., 1997. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15(1)**, 16-21.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H. and Hinata, K., 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Nature Biotechnology*, **6(9)**, 1072-1074.
- Trick, H.N. and Finer, J.J., 1997. SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research*, **6(5)**, 329-336.
- Tsakakoshi, M., Kurata, S., Nomiya, Y., Ikawa, Y. and Kasuya, T., 1984. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Applied Physics B*, **35(3)**, 135-140.
- Tzfira, T. and Citovsky, V., 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **17(2)**, 147-154.
- Wang, H., Wang, W., Zhan, J., Huang, W. and Xu, H., 2015. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes. *Scientia Horticulturae*, **191**, 82-89.
- Wang, K., Drayton, P., Frame, B., Dunwell, J. and Thompson, J.A., 1995. Whisker mediated plant transformation: an alternative technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **31(2)**, 101-104.
- Weber, G., Monajembashi, S., Greulich, K.O. and Wolfrum, J., 1988. Injection of DNA into plant cells with a UV laser microbeam. *Naturwissenschaften*, **75(1)**, 35-36.
- Weber, G., Monajembashi, S., Wolfrum, J. and Greulich, K.O., 1990. Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam. *Physiologia Plantarum*, **79(1)**, 190-193.
- Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H., and Artim-Moore, L., 2001. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports*, **20(5)**, 429-436.
- Yenchon, S. and Te-chato, S., 2015. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated gene transformation of oil palm secondary somatic embryo. *Kasetsart Journal, Natural Science*, **49(3)**, 319-326.
- Yesmin, S., Sarker, R.H., Hoque, M.I., Hashem, A. and Islam, M.S., 2014. Agrobacterium-mediated transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using cotyledon explants. *Nuclear Science and Applications*, **23(1&2)**, 41-46.
- Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., Wang, P., Li, Y., Liu, B., Feng, D., Wang, J. and Wang, H., 2011. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, **7(1)**, 1-14.
- Zimmermann, U. and Vienken, J., 1982. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *The Journal of Membrane Biology*, **67**, 165-182.
- Zupan, J., Zambryski, P. and Citovsky, V., 1997. The Agrobacterium DNA transfer complex. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **16(3)**, 279-295.

İnternet kaynakları

1. <http://gefreakamloops.org/wp-content/uploads/2015/07/where-in-the-world-gm-crops-foods.pdf>,(24.12.2016).

2. <http://isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp>, (24.12.2016).