

## MELEZ - DİNÇLİĞİ VE RİBONUKLEİN ASİDİ SENTEZİ <sup>1)</sup>

### HYBRID VIGOUR AND RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS

Prof. Dr. Nebahat YAKAR

İstanbul Üniversitesi, Botanik ve Genetik Kürsüsü

#### GİRİŞ

1939 da Caspersson (Caspersson 1950) tümörler, oositler ve bitkisel meristemler gibi hızla büyüme gösteren dokuların veya protein salan bezlerin hücrelerinin fazla gelişmiş nukleoluslara malik olduklarını müşahede etmiş, bu müşahedesine dayanarak protein sentezi bakımından aktif olan hücrelerde nukleolusun mühim rol oynadığı kanısına varmıştır. Daha sonraları nukleer ribonuklein asidinin (RNA) büyük bir kısmının nukleoluste bulunduğu ortaya konunca, RNA sentezinde ve bununla ilgili olarak protein sentezinde nukleolusun rol oynadığı fikrine varılmıştır. Yakın zamanlara kadar nukleolusun nukleer RNA sentezinin esas yeri olduğu kanaati hüküm sürmüştü de, son zamanlarda protein sentezinde rol oynayan RNA sentezinin kromatine dayandığı ortaya konmuştur. Bu hipotezin tartışmasını burada yapacak değiliz. Bu konu üzerinde bir çok simpozyumlar tertip edilmiş ve yapılan araştırmalar topluca gözden geçirilmek üzere yazılar yayımlanmıştır (Caspersson 1950, Brachet 1955 ve 1956, Bonner 1959). Bununla beraber her ne kadar RNA sentezinin kromatinde yapıldığı kabul edilmekteyse de, bir kısım RNA sentezinin de nukleoluste vukua geldiği kanaati üzerinde hala durulmaktadır. Sirlin (1960), Woods (1959) radyoaktif RNA prekürsörlerinin kromatin kadar nukleolusun yapısına da girdiğini göstermişlerdir.

Biz bu çalışmaya nukleoler kromozomlardaki nukleoler bölgelerin yer değişikliğinin RNA sentezi üzerinde etkili olup olmayacağını veya başka bir deyimle

1) Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, II. Bilim Kongresinde tebliğ edilmiştir; Ankara, 17 Kasım 1969.



RNA sentezi üzerinde yer-etkisinin (Position effect) söz konusu edilip edilemeyeceğini araştırma gayesiyle başladık.

## MATERYEL VE METOD

Materyel olarak Hagberg (Swedish Seed Association, Svalöf, İsveç) tarafından elde edilen Bonus varyetesiinden resiprokal translokasyon gösteren arpa mutantlarının homozigot iki tipiyle ( $\chi T2$  ve  $\gamma a T2$ ) bunların normal Bonus varyetesiyle meydana getirdikleri hibridler (Bonus  $\times$   $\chi T2$  ve Bonus  $\times$   $\gamma a T2$ ) kullanıldı ve normal tipe kıyaslamaları yapıldı (Yazıda  $\chi T2$  a,  $\gamma a T2$  b harfleriyle gösterildi).

Bir gece çeşme suyunda şişmeye maruz bırakılan her bir tipten 50 adet arpa tanesi büyük bir petri kutusu içerisinde alt yüzüne kadar su ile doldurulan bir tel örgü üzerine kondu ve nemli bir oda temini amacıyla petri kutusunun üzerine ters olarak bir cam huni kapatıldı. Üç gün oda ısısında bırakılan tohumların çimlenme yüzdesi tayin edildi ve çıkan fidelerin kök uzunlukları ölçüldükten sonra kök uçları White ortamında (DIFCO Laboratuvarları, Detroit, Michigan) 2,5  $\mu\text{C}/\text{ml}$  yoğunluğunda hazırlanmış tritium ile işaretli uridin (New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts) eriyiğine batırılarak 10 dakika veya 1/2, 2 ve 7 saat gibi değişik sürelerde radyoaktif maddenin etkisine maruz bırakıldı. 1/3 aseto-alkol (1 kısım glasiyal aset asidi, 3 kısım absölü etil alkol karışımı) ile fikse edilen köklerin uç kısımlarından yaklaşık olarak 1/2 cm uzunluk-taki parçalar standard metoda uygun olarak absölü etil alkol, etil alkol-butil alkol karışımlarından geçirilerek saf butil alkole ve parafine getirildi, kalıplara döküldü, uçlarından itibaren 3  $\mu$  kalınlığında enine kesitler alındı. Her kökten alınan birbirini takip eden kesitler iki ayrı lam üzerine tesbit edildi, ksilol ile parafinden kurtarıldıktan sonra suya getirildi. Suya getirildikten sonra otoradyografik film (AR-10 Kodak) ile örtüldü ve 7, 20, 45 ve 65 gün gibi sürelerle radyasyonun tesirine maruz bırakılan preparatlar develope edildikten (D-19 Kodak) sonra fikse edildi (% 50 oranında sulandırılmış F-6 Kodak). Sudan % 50 etil alkole alınan preparatlar, faz-kontrast mikroskopla yapılan incelemelere uygun olan W15 ortamında (nD-1.515 Carl Zeiss) kapatıldıktan sonra lamellerin kenarları verniklendi.

İşaretlenmiş maddenin RNA olduğunu gerçekleştirmek amacıyla aynı kökten hazırlanmış iki preparattan diğeri film konmadan önce, 1,5 saat süresince 37°C da kristalize ribonukleaz fermentinin (pH 7, 1 mg/10 ml) tesirine maruz bırakıldı. Sonra üç defa damıtık su ile çalkandı. Doku tarafından tesbit edilen radyoaktif maddenin nisbî miktarının tayini bütün hücrede veya sitoplasma ve nukleus üzerinde belli bir yüz ölçümündeki gümüş tanelerinin sayılmasıyla yapıldı.



## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

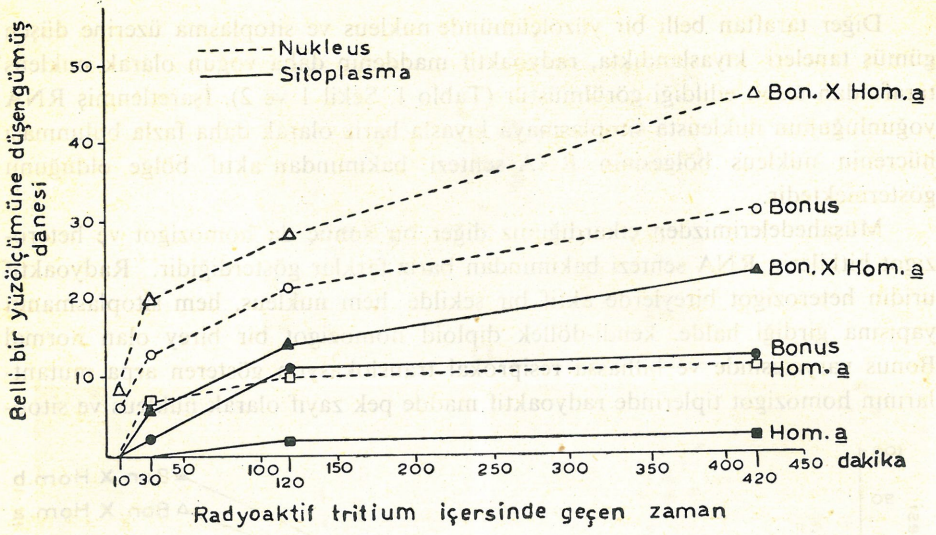
Faz-kontrast mikroskop ile yapılan incelemelerde kromozom ve nukleolusların sınırları ayırdedilememiş, ancak nukleus ve sitoplasmadaki radyoaktif maddenin yoğunluğu tesbit edilebilmiş, bundan ötürü nukleoler bölgelerin ve bu bölgelerin kromozom üzerindeki yer değişikliklerinin RNA sentezi üzerindeki rolü hakkında bir kanıya varılamamıştır. Bununla beraber RNA sentezi bakımından bazı ilginç müşahedelerde bulunulmuştur.

Kısa zaman (10 ve 30 dakika) radyoaktif maddenin etkisinde kalan kök meristemi hücrelerinde sitoplasmaya ya hiç veya eser miktarda radyoaktif madde girdiği halde, 10 dakikalık bir muamele süresi bile radyoaktif maddenin genellikle (homozigot mutantlar hariç) nukleus (kromatin ve nukleolus) tarafından alınmasını sağlamıştır (Tablo I). Daha uzun süre muameleye tabi tutulan köklerde radyoaktif maddenin nukleusla birlikte sitoplasmada da bulunduğu müşahede edilmiştir. Bu sonuç bundan evvel kabul edilen hipotezi desteklemektedir (Caspersson 1950, Brachet 1955 ve 1956, Prescott 1957, Zalokar 1959, Bonner 1959, Woods 1959). Bu hipoteze göre radyoaktif madde nukleus tarafından alınmakta ve sitoplasmaya iletilmektedir.

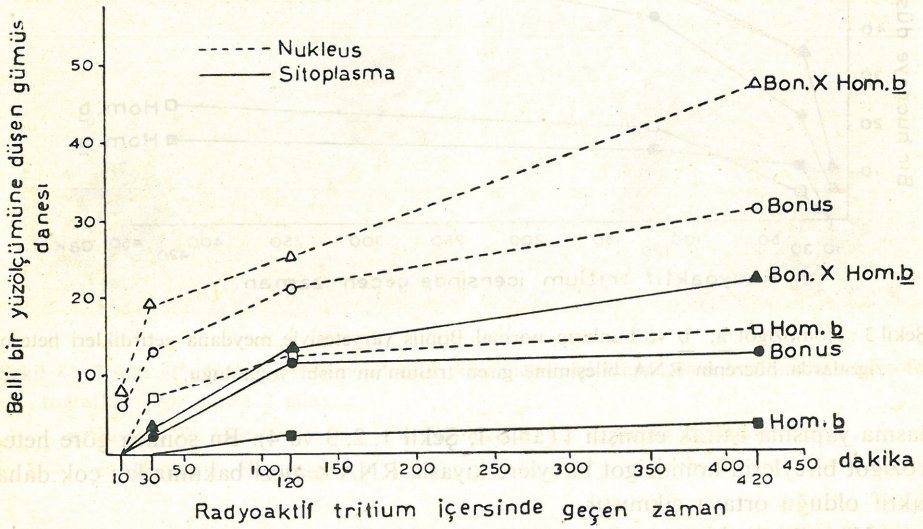
**Tablo I.** RNA bileşimine giren tritium'un nisbi yoğunluğu (Gümüş tanelerinin sayılmasıyla tayin olunmuştur).

| Muamele süresi<br>(Saat)   | Belli bir yüzölçümünde |     |    |    |         |     |    |    |            |     |    |    |
|----------------------------|------------------------|-----|----|----|---------|-----|----|----|------------|-----|----|----|
|                            | Hücrede                |     |    |    | Nukleus |     |    |    | Sitoplasma |     |    |    |
|                            | 1/6                    | 1/2 | 2  | 7  | 1/6     | 1/2 | 2  | 7  | 1/6        | 1/2 | 2  | 7  |
| Bonus                      | 7                      | 21  | 42 | 61 | 6       | 13  | 21 | 31 | 0          | 2   | 11 | 12 |
| Homozigot a                | 0                      | 12  | 15 | 17 | 0       | 7   | 10 | 11 | 0          | 0   | 2  | 2  |
| Homozigot b                | 0                      | 7   | 20 | 25 | 0       | 7   | 12 | 15 | 0          | 0   | 2  | 3  |
| Heterozigot<br>(Bonus × a) | 11                     | 36  | 52 | 89 | 8       | 20  | 28 | 46 | 0          | 6   | 14 | 23 |
| Heterozigot<br>(Bonus × b) | 10                     | 34  | 48 | 95 | 8       | 19  | 25 | 47 | 0          | 3   | 12 | 22 |
| Poz süresi<br>(gün)        | 65                     | 45  | 20 | 7  | 65      | 45  | 20 | 7  | 65         | 45  | 20 | 7  |





Şekil 1 : Homozigot a ve bunun normal Bonus varyetesiyle meydana getirdiği heterozigotlarda nukleus ve sitoplazmanın RNA bileşimine giren tritium'un nisbi yoğunluğu.

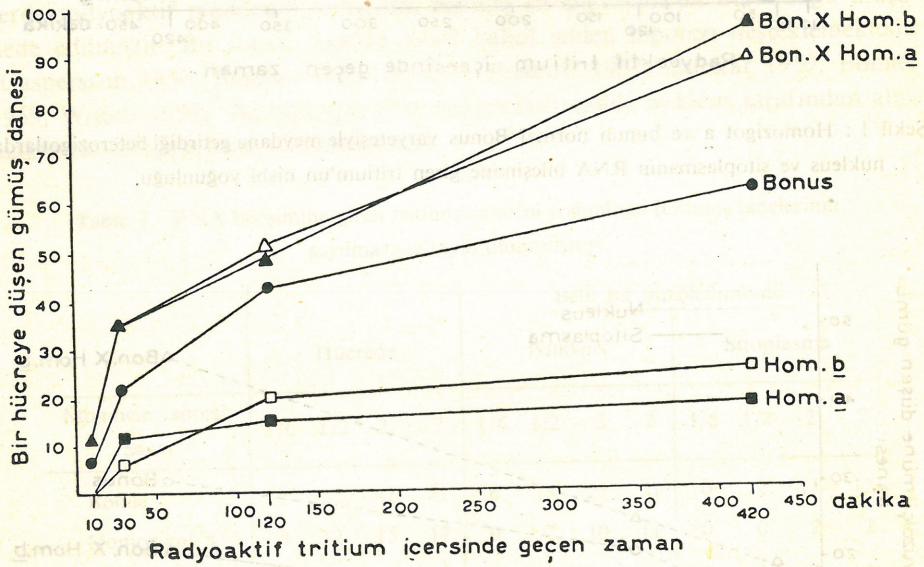


Şekil 2 : Homozigot b ve bunun normal Bonus varyetesiyle meydana getirdiği heterozigotlarda nukleus ve sitoplazmanın RNA bileşimine giren tritium'un nisbi yoğunluğu.



Diğer taraftan belli bir yüzölçümünde nukleus ve sitoplasma üzerine düşen gümüş taneleri kıyaslandıkta, radyoaktif maddenin daha yoğun olarak nukleus tarafından tesbit edildiği görülmüştür (Tablo I, Şekil 1 ve 2). İşaretlenmiş RNA yoğunluğunun nukleusta sitoplasmaya kıyasla bariz olarak daha fazla bulunması hücrenin nukleus bölgesinin RNA sentezi bakımından aktif bölge olduğunu göstermektedir.

Müşahedelerimizden çıkardığımız diğer bir sonuç da homozigot ve heterozigot bitkilerin RNA sentezi bakımından bariz farklar gösterdiğiidir. Radyoaktif uridin heterozigot bireylerde aktif bir şekilde hem nukleus, hem sitoplasmının yapısına girdiği halde, kendi-döllek diploid homozigot bir birey olan normal Bonus varyetesinde ve bilhassa resiprokal translokasyon gösteren arpa mutantlarının homozigot tiplerinde radyoaktif madde pek zayıf olarak nukleus ve sitop-

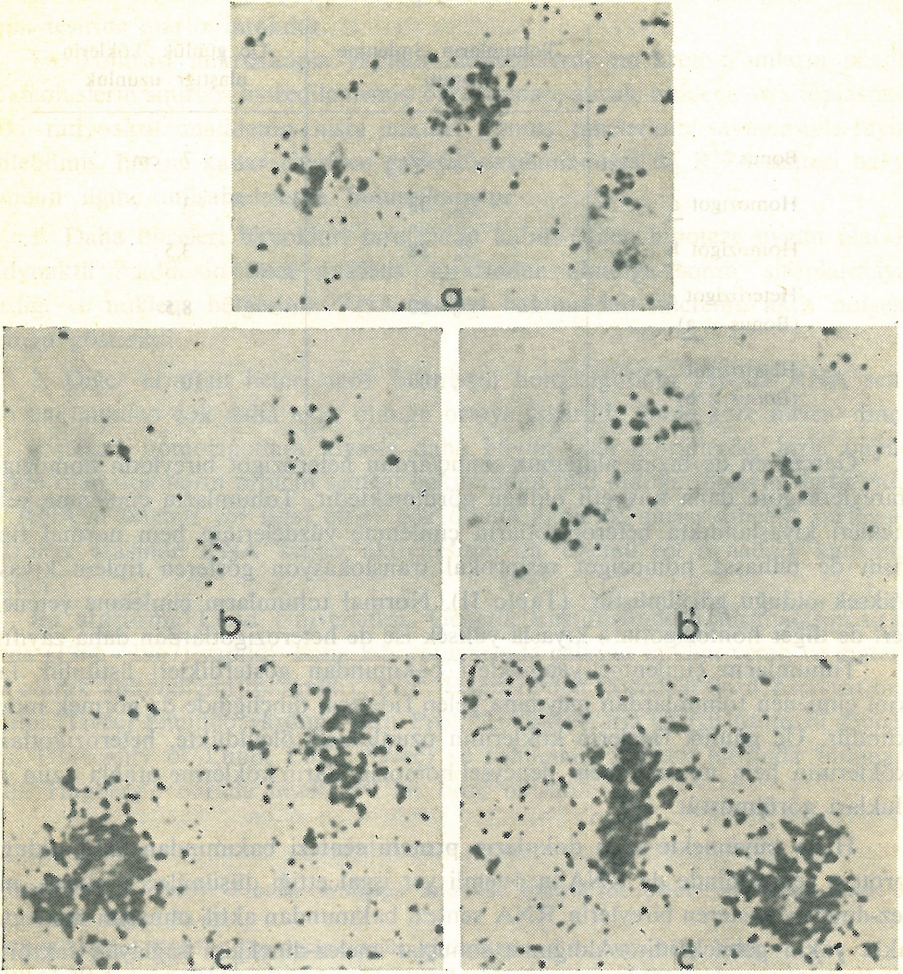


Şekil 3 : Homozigot a, b ve bunların normal Bonus varyetesiyle meydana getirdikleri heterozigotlarda hücrenin RNA bileşimine giren tritium'un nisbi yoğunluğu.

lasma yapısına iştirak etmiştir (Tablo I, Şekil 1, 2, 3 ve 4). Bu sonuca göre heterozigot bireylerin homozigot bireylere kıyasla RNA sentezi bakımından çok daha aktif olduğu ortaya çıkmıştır.

Yüzyıllardanberi birçok türlerde kendileşme yolu ile meydana gelen döllerin çaprazlama ile meydana gelen döllerden daha zayıf olduğu müşahede edilmiş ve bu hal literatüre melez-dinçliği (Hybrid vigour) veya heterosis olarak geçmiştir. Arpa kendi-döllek diploid bir bitkidir. Kendi-döllek bitkilerin de, ken-





Şekil 4 : 7 saat H<sup>8</sup>-uridin ile muamele edilen kök meristemi hücrelerinin faz-kontrast mikrofotoğrafları (Poz süresi 7 gün).

a. Bonus, b. Homozigot a, b'. Homozigot b, c. Bonus × Homozigot a,  
c'. Bonus × Homozigot b.

dileşme ile meydana çıkan zayıf ırkların yok olması sonucu, karşı-döllek bitkiler kadar verimli ve kuvvetli oldukları bilinmektedir. Bununla beraber bütün dinçlik meydana getiren sayıları pek çok olan faktörlerin homozigot olarak bir bireyde toplanabilmesi ihtimali pratik bakımdan çok zayıftır.



**Tablo II.** Tohumların çimlenme oranı ve üç günlük fide köklerinin ulaştığı uzunluk.

|                                 | Tohumların çimlenme oranı | Üç günlük köklerin ulaştığı uzunluk |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Bonus                           | % 57                      | 7 cm                                |
| Homozigot <u>a</u>              | % 33                      | 3                                   |
| Homozigot <u>b</u>              | % 38                      | 3,5                                 |
| Heterozigot (Bonus × <u>a</u> ) | % 80                      | 8,5                                 |
| Heterozigot (Bonus × <u>b</u> ) | % 100                     | 10                                  |

Gerçekten de bizim aldığımız sonuçlardan heterozigot bireylerin homozigot bireylere göre daha kuvvetli olduğu görülmektedir. Tohumların çimlenme yetenekleri kıyaslandıkta heterozigotların çimlenme yüzdelerinin hem normal tipe, hem de bilhassa homozigot resiprokal translokasyon gösteren tiplere kıyasla yüksek olduğu görülmüştür (Tablo II). Normal tohumların çimlenme yetenekleri de diğer homozigotlara kıyasla yüksek ise de heterozigotlardan daha zayıftır.

Tohumların çimlenme yetenekleri bakımından gösterdikleri üstünlük farkını çimlenen tohumlardan meydana gelen fidelerin dinçliğinde de görmek mümkündür. Üç günlük fidelerin köklerinin uzunlukları ölçüldükte, heterozigotların köklerinin hem normal, hem deneysel homozigotların köklerine oranla uzun oldukları görülmüştür.

Hızla büyümekte olan dokuların protein sentezi bakımından aktif olduğu, protein sentezinde de RNA'nın önemli yer işgal ettiği düşünülecek olursa, melez-dinçliği gösteren bireylerin RNA sentezi bakımından aktif olmasını beklemek akla yakın gelmektedir. Aldığımız sonuçlar melez-dinçliğini sağlayan faktörler arasında RNA sentez aktivitesini destekleyen faktörlerin önemli yer işgal ettiğini ortaya koymuştur.

### ÖZET

Bu çalışmaya otoradyografik metoddan faydalanılarak kromozomlar üzerindeki nukleoler bölgelerin yer değiştirilmesiyle ribonukleik asidi (RNA) sentezi üzerinde bir etki meydana gelip gelmeyeceğininin araştırılması amacıyla başlandı.

Materyel olarak Bonus varyetesinden resiprokal translokasyon gösteren arpa mutantlarının homozigot tipleriyle, bunların normal Bonus varyetesiyle meydana getirdikleri hibridler kullanıldı ve normal tiplere kıyaslamaları yapıldı.



Radyoaktif uridinin RNA bileşimine girdiğini gerçekleştirme amacıyla aynı kökten hazırlanmış iki preparattan biri film konmadan önce ribonukleaz fermentinin tesirine maruz bırakıldı.

Faz-kontrast mikroskopla yapılan incelemelerde ne kromozomların ne de nukleolusların sınırları ayırdedilememiş olduğundan, ancak nukleus ve sitoplasmadaki radyoaktif maddenin nisbi miktarı gümüş tanelerinin sayılmasıyla tayin edilebilmiş, her ne kadar istenilen gayeye ulaşılamamışsa da RNA sentezi bakımından ilginç müşahedelerde bulunulmuştur :

1. Daha önceleri birçokları tarafından kabul edilen hipoteze uygun olarak radyoaktif maddenin önce nukleus tarafından alındığı, sonra sitoplasmaya girdiği ve nukleus bölgesinin RNA sentezi bakımından hücrenin aktif bölgesi olduğu gösterildi.

2. Diğer taraftan heterozigot bireylerin homozigotlara kıyasla RNA sentezi bakımından çok daha aktif olduğu ortaya çıkarıldı. Buna göre melez-dinçliği gösteren, homozigotlara kıyasla daha büyük olan hibridlerde, hızla büyümekte olan dokuların protein sentezi bakımından faal olduğu, protein sentezinde de RNA'nın önemli yer işgal ettiği göz önüne alınarak, melez-dinçliği sağlayan faktörler arasında RNA sentez aktivitesinin de önemli rol oynadığı kanısına varıldı.

Bu araştırma Lund Üniversitesi, Genetik Enstitüsündeki çalışmalarım sırasında (1966 - 1967) yapıldı. Bana laboratuvarında çalışma imkânı veren ve materyel olarak kullandığım tohumları Prof. Hagberg'den (Swedish Seed Association, Svalöf, İsveç) teminde yardımcı olan Prof. Lima-de-Faria'ya (Institute of Genetics, University of Lund, Lund, İsveç) ve tohumları vermek lütfunda bulunan Prof. Hagberg'e burada teşekkürü bir borç bilirim.

#### BİBLİYOGRAFYA

1. BONNER, J. (1959) : Protein synthesis and the control of plant processes. - Amer. J. Bot. 46(1) : 58-62.
2. BRACHET, J. (1955) : The nucleic acids, chemistry and biology. New York.
3. BRACHET, J. ve CHANTRENNE, H. (1956) : The function of the nucleus in the synthesis of cytoplasmic proteins. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 329-337.
4. CASPERSSON, T.O. (1950) : Cell growth and cell function. New York.
5. HAGBERG, A. (1962) : Production of duplications in barley breeding. - Hereditas 48 (1-2) : 243-246.
6. PRESCOTT, D.M. (1957) : The nucleus and ribonucleic acid synthesis in *Amoeba*. - Exper. Cell. Res. 12 : 196-198.
7. SIRLIN, J. (1960) : The cell nucleus. London.
8. WOODS, P. S. (1959) : RNA in nuclear-cytoplasmic interaction. - Brookhaven Symp. Biol. 12 : 153 - 174.
9. ZALOKAR, M. (1959) : Nuclear origin of ribonucleic acid. - Nature 183 : 1330.