

Babaoğlu, M. 1999. Bitkilerde gen transferi teknikleri. Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi, 322: 24-26.

BİTKİLERDE GEN TRANSFERİ TEKNİKLERİ

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Babaoğlu

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kampüs, Konya

1. Giriş

Bitkilerde ve diğer canlılarda genler belirli uzunlukta DNA sekanslarından oluşmakta ve diğer canlılardan ayrı olarak bitkilerde kloroplast (cpDNA) ve mitokondrilerde (mtDNA) olmak üzere 2 ayrı yerde daha genom (kalıtım materyali topluluğu) bulunmaktadır. Ayrıca politen kromozomları hariç bir kromozom çok uzun, çift şeritli bir DNA molekülü ve çeşitli histon proteinlerinin düzgün bir şekilde sıralanarak oluşturduğu kromatin denilen yapılardan oluşmaktadır.

Genlerin tezahürü için DNA-mRNA-poliipeptid-protein veya proteinler (enzim), veya DNA-transkripsiyon-translasyon-proteinler-ekspresyon zincirinin oluşması ve çalışması gerekir. Bir bitkide ister çekirdek içinde bulunsun, isterse diğer genomlarda bulunsun genetik materyalin temeli olan DNA üzerine dışarıdan belirli uzunlukta bir DNA sekansının yerleştirilmesi ve yerleştirilen bu parçanın entegrasyonu sonucu aktif hale geçerek kendi özelliğini yukarıdaki yolla dışarıya vurması (ekspresyon) ve yeni nesillere aktarılması işlemine gen transferi denilmektedir.

Genetik biliminin temeli olarak gösterilen Gregor Mendel'in 1865 yılında yayınlanan araştırma sonuçlarından bazıları olan dolgun (düz) taneli bezelyeler (RR) ile kırışık taneli (rr) bezelyelerin kalıtımı şimdiye kadar bir çok genetik kitabında okutulmuştur. Bu bezelyelerde dolgun taneliliğin ilgili genin homozigot dominant (RR, R: round) veya heterozigot (Rr) olması halinde, kırışık taneliliğin ise sadece genin her iki lokusta da homozigot resesif (rr, r: wrinkled) olması durumunda ortaya çıktığı bildirilmiş fakat genin işleyiş mekanizması ve bu karakteri ortaya çıkarma şekli ancak 1990'lı yıllarda yapılan biyoteknolojik analizler sonucu açıklığa kavuşturulmuştur. Dolgun olmayı sağlayan enzimin Nişasta-Dallandırma Enzimi I İzofomu (SBEI, gen ürünü) olduğu belirlenmiş ve düzgün amiloz zincirlerini dallı amilopetkin polimerlerine çevirdiği tespit edilmiştir. Dolgun tanelerde ilk gelişim devresinde bu gen aktif hale geçmekte fakat kırışık tanelilerde bulunmamaktadır. RR ve Rr genotipindeki tanelerde yüksek oranda amilopektin

ile birlikte fazla miktarda nişasta bulunmakta, rr genotipindeki tanelerde ise daha az nişata ve amilopektin fakat daha fazla sakkaroz bulunmaktadır. Sakkaroz ozmotik olarak aktif olduğundan kırışık taneli bezelyeler daha fazla su absorbe etmekte ve tane olgunlaşmaya başladığında ortaya çıkan su kaybı nedeniyle büzülmekte ve kırışıklılık ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan nişasta ozmotik olarak aktif olmadığından bu tür taneler daha az su almakta ve neticede kuruduklarında daha az su kaybetmektedirler (Moore vd., 1995).

Bu durum genlerin nasıl işlediğini ve fenotipi nasıl etkilediklerini gösteren iyi bir örnektir. Fakat yukarıdaki durumda ilgili karakter tek bir gen çifti tarafından idare edilmektedir. Özellikle tarımsal açıdan önemli bazı karakterler (Örnek: verim) birden fazla gen çifti tarafından kontrol edilmekte ve genetik olarak bitkilerin manipülasyonunu zorlaştırmaktadır.

Bir bitkiye gen transferi yapılabilmesi için en önemli temel ihtiyaçlardan birisi, *in vitro* şartlarda o bitkinin tek bir hücresinden tekrarlanabilir bir şekilde yeni bitkilerin meydana gelebilmesidir. Bu olaya totipotensi denilmektedir. Başka bir ifadeyle, gen transferi yapılacak bitki hücresine ilgili DNA parçasını (gen) transfer etmek ve daha sonra uygun doku kültür teknikleri ile bu hücreyi önce çoğaltıp (kallus devresi) veya direkt olarak bu hücreden (somatik embriyogenesis) yeni bir bitki oluşturulması gerekir (regenerasyon). Bunun nedeni ve amacı, transferi yapılan genin, mitoz bölünme ile tüm bitki hücrelerinde stabil olarak bulunmasının temin edilmesidir. Ayrıca bu genin nesilden nesile tohumla aktarılması gerekir. Aksi durumda kimerik bir organizma ortaya çıkar ve etkili bir gen transferi yapılmış sayılamaz. Bitkilerde gen transferi klasik bitki ıslahı çalışmalarına yardımcı olmak ve genetik varyasyonu genişletmek açılarından faydalı olabilmektedir. Ayrıca klasik ıslah çalışmaları uzun zaman almaktadır. Bitkilere gen transferinin diğer amaçları arasında kuraklık, don, yüksek asitlilik ve tuzluluk, bakteriyel, viral ve fungal hastalıklarla, herbisitlere dayanıklılık kazandırmak, besin değerini (protein, nişasta, yağ, sakkaroz vb.) artırmak ve iyileştirmek sayılabilir.

Bitkilere gen aktarımında yabancı DNA'nın kabul edilip edilmediğinin anlaşılması ve seleksiyonun daha kolay yapılabilmesi için aktarılan DNA parçası üzerinde istenilen genle birlikte genellikle markör (işaret) ve raportör genler de bulunur. En yaygın kullanılan markör genler *nptII* (neomisin fosfotransferaz) ve *hpt* (higromisin fosfotransferaz) genleridir. *NptII* geni kanamisin (Km), genetisin (G418), *hpt* geni higromisin gibi antibiyotiklere karşı dayanıklılığı sağlar. Ayrıca çoğu transformasyon çalışmalarında yine raportör genler kullanılır. Bu genler yapılan basit testlerle kısa zamanda fenotipik olarak

kendini ifade ederler ve transformasyonun başarılı olup olmadığı, eğer olduysa hangi doku/hücrelerin transforme olduğunun anlaşılmasını sağlarlar. En yaygın olarak kullanılan raportör genleri *gus* (β -glukuronidaz), *cat* (kloramfenikol asetil transferaz) ve *bar* (phosphinothricin asetil transferaz) genleridir.

Bitki genetik mühendisliğinin son yıllardaki başarılı uygulamalarıyla, ana bitkinin istenen karakterlerini hiç değiştirmeden bir veya birden fazla gen, bazı özelliklerini iyileştirmek için bitkilere kolayca aktarılabilmektedir. İlk transgenik bitki (tütün) 1984 yılında elde edilmiştir. 1997 yılına kadar 35 familyadan 120'nin üzerinde türde transformasyon başarılmıştır ve bunlardan ticari olarak ekimine izin verilen varyeteler Tablo 1.'de verilmiştir (Birch, 1997).

Bitkilere gen aktarımında değişik yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılanı, tabii genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, dikotiledon bitkilere kolaylıkla aktarılabilmektedir. *A. tumefaciens*'e ilave olarak, birçok doğrudan gen aktarım teknikleri de geliştirilmiştir. Bunlar arasında partikül tabancası, protoplastların elektroporasyonu veya PEG (polietilen glikol)'le muamelesi ve mikroenjeksiyon en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemlerle hem tek çenekli, hem de iki çenekli bitkilerde başarılı sonuçlar alınmıştır. Gen transferlerinde protoplastların kullanılmasını gerektiren tekniklerden kaçınılması gerekmektedir. Çünkü protoplastlarla çalışmak stabil olmayan sonuçlar vermekte ve daha zor olmaktadır (Birch, 1997).

Tablo 1. Ticari olarak ekimine izin verilen transgenik varyeteler (Birch, 1997).

Geliştirilen Özellik	Varyete	Geliştiren Şirket	Tarih
Kalite (raf ömrü)	Flavr Savr (Domates)	Calgene	1994
Yağ özelliği	Laurical (Kanola)	Zeneca	1994
Virüse dayanıklılık	Freedom (Kabak)	Asgrow	1995
Böceğe dayanıklılık	Ballgard (Pamuk)	Monsanto	1996-97
	New Leaf (Patates)		
	YieldGuard (Mısır)		
Böceğe dayanıklılık	Maximizer (Mısır)	Ciba Seeds	1996
Herbisite dayanıklılık	Roundup Ready (Soya)	Monsanto	1995-96

Herbisite sayanıklılık	Reundup Ready (Kanola) Roundup Ready (Soya)	Pioneer	1996-97
------------------------	--	---------	---------

2. Gen Transferi Teknikleri

2.1. *Agrobacterium*-aracılığıyla gen transferi

Günümüzde en fazla uygulanan tekniktir. *Agrobacterium*, *Rhizobiacea* familyasından gram negatif bir toprak bakterisidir ve iki türü bitkilerde kök boğazı kanseri (*A. tumefaciens*) ve saçak kök (*A. rhizogenes*) oluşumuna neden olmaktadır. Her iki tür de dikotiledon bitkilerde oldukça etkili olup buğday ve mısır gibi monokotiledonlarda fazla başarılı olmamaktadır. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi konusunda detaylı bilgiler Özcan ve Özgen (1996) tarafından bildirilmiştir.

Agrobacterium sisteminin, tahılların da içinde bulunduğu monokotil bitkilerde ve sıkı doku yapısına sahip meristemlerde kullanımının sınırlı kalması, *Agrobacterium*'un dokuya daha iyi işlemlerini sağlayan sonikasyonla desteklenmesi ve DNA'nın doğrudan aktarımını sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesi yolundaki çalışmaları hızlandırmıştır. SAAT (Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transfer: Sonikasyon destekli *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi) metodu bunlardan birisidir. Bu metotta bitki dokuları *Agrobacterium*'la birlikte çok kısa süreli ultrasonik ses dalgalarına (20 kHz) tabi tutulur. Bu işlem doku ve hücrelerde küçük boşluklar oluşturur ve bakterinin kolayca girmesini sağlar. Meristematik dokular ve embriyogenik kallus bu yolla transforme edilebilmektedir (Trick ve Finer, 1997, 1998).

Agrobacterium sistemi ile viral enfeksiyonun bir kombinasyonu olan **Agroinfeksiyon** adı verilen bir teknikte bakterinin T_i plazmidinin T-DNA bölgesine viral DNA' yerleştirilmekte ve *Agrobacterium* ile transformasyon yapılmaktadır. Yine **Agrolistik** adı verilen diğer bir kombine metotta *Agrobacterium* ile biyolistik transformasyon metodları birleştirilmekte ve istenmeyen vektor sekansının transferi engellenmektedir (Hansen ve Chilton, 1996).

3. Doğrudan DNA transferi teknikleri

3.1. Biyolistik Gen Transferi (Partikül Tabancası ile Gen Aktarımı)

Partikül tabancasıyla, spermidinle ağır metal partiküllerine (1-2 µm, altın veya tungsten) yapıştırılmış DNA parçalarının bitki hücre ve dokularına (yaprak, embriyo, sürgün ucu meristemi gibi organ kısımları), helyum gazı şokuyla bombardımanı yoluyla

yapılmaktadır. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının zor olduğu birçok iki çenekli bitki türünde bu yolla transgenik bitkiler üretilebilmiştir (Kikkert, 1993).

Partikül bombardımanı metoduyla DNA parçası yerine doğrudan faj, bakteri veya maya hücreleri hedef dokuya transfer edilebilmektedir. Bu yolla yüksek moleküler DNA transfer edilebilir ve DNA izolasyonu ve saflaştırılması gibi zor işlemlerden sakımlanabilir (Kikkert vd., 1999).

3.2. Protoplastlara Direk Gen transferi (Elektroporasyon ve PEG aracılığıyla transformasyon)

Bu yöntemlerde, yüksek voltajlı elektrik akımı veya kimyasal maddelerle (% 15-25 PEG: polietilen glikol) plazmalemma (protoplast zarı)'da DNA moleküllerinin geçebileceği büyüklükte (30 nm) geçici gözenekler oluşturulur ve yabancı genleri taşıyan DNA parçasının hücre içerisine girmesi özendirilir (Özcan ve Özgen, 1996).

3.3. Mikro enjeksiyon

Bitkiye aktarılması istenen genleri taşıyan DNA parçası çok ince (0.5-10 µm çapında) kılcal pipetlerle veya enjektörlerle doğrudan immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem, mikrospor vb. içerisine steril şartlarda mikroskop altında enjekte edilir. Mikroenjeksiyon için protoplastlar poly-L-lysine üzerine yapıştırılarak veya agarose içerisine gömülerek sabit hale getirilirler. Sistem genelde zordur ve çok başarılı sonuçlar elde edilmiş değildir (Özcan ve Özgen, 1996).

4. Diğer gen transferi teknikleri

Aşağıdaki teknikler ve benzer diğer bir çok teknik çok özel durumlarda uygulanmış olup pratikte geniş uygulamaları yoktur. Aşağıda bu tekniklerden bazıları kısaca verilmiştir.

4.1. Sonikasyon

Bazı durumlarda elektroporasyondan daha iyi sonuçlar vermiştir (Örnek: Pancar protoplastları). Esası ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında boşluklar açmak ve serbest DNA parçalarının hücre içine girişini kolaylaştırmaktır.

4.2. Lazer mikro ışınlarıyla transformasyon

UV lazer mikro ışınları (343 nm) ile hücrelerde mikro delikler açmak ve DNA parçalarının içeriye girmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır.

4.3. Silikon Karbit Fiberleri ile transformasyon

Silikon karbit fiberlerle kaplanmış DNA, süspansiyon hücrelerine gen aktarımında kullanılmıştır. Fiberler hücrelerde çok ince delikler açmakta ve DNA içeriye kolayca girebilmektedir. Çok başarılı bir yöntem değildir.

4.4. Desikasyon

Basit bir metottur. Doku desikasyonu (soldurma) ve daha sonra transfer edilmek istenen DNA parçalarının bulunduğu bir ortamda dokunun tekrar su alımı sonucu hücre zarından içeri alınmayı sağlamak sistemin temelini oluşturur.

4.5. Üreme hücrelerine DNA enjeksiyonu

DNA parçalarının çiçek durumuna enjekte edilmesi şeklinde uygulanır. Ama gen transfer yüzdesi oldukça düşüktür.

5. Sonuç

Her bitki türüne uygun genel bir gen transferi yöntemi yoktur. Eğer bir metod çalışmıyorsa diğer metodlar denenmeli veya mevcut metodlar kombine edilmelidir. Ama mevcut metodlara her gün yenileri eklenmektedir.

Bitkilere gene transferleri konusunda hem yeni bir metod olarak hem de değişik metodların karışımı olarak son yıllarda yapılan önemli çalışmalar vardır. Bunlar arasında; uyumlu eriyebilir maddelerin transformasyonu (Bohnert ve Shen, 1999), biyolojik parça transferi (Kikkert vd., 1999), sonikasyon yardımlı *A. tumefaciens* aracılığıyla gen transformasyonu (Trick ve Finer, 1997, 1998), *Agrobacterium*'un bitkilerde endojen hormon metabolizmasını değiştirmede kullanımı (Lutova vd., 1998), çok genli bitki transformasyonu (Gelvin, 1998) ve tahıllarda gen transferinde gelişmeler (Komari vd. 1998) sayılabilir.

6. Kaynaklar

Birch RG., 1997. Plant transformation. Problems and strategies for practical application. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:297-326.

- Bohnert HJ., Shen B., 1999.** Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4): 237-260
- Gelvin SB., 1998.** Multigene plant transformation: More is better! *Nature Biotechnology*, 16(11): 1009-1010.
- Hansen G., Chilton MD., 1996.** 'Agrolistic' transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(25): 14978-14983.
- Kikkert JR., 1993.** The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33**:221-226.
- Kikkert JR., Humiston GA., Roy MK., Sanford JC., 1999.** Biological projectiles (phage, yeast, bacteria) for genetic transformation of plants, *In vitro Cellular & Dev. Biology-Plant*, 35(1): 43-50
- Komari T., Heiei Y., Ishida Y., Kumashiro T., Kubo T., 1998.** Advances in cereal gene transfer. *Current Opinion in Plant Biol.* 1(2):161-165.
- Lutova LA., Pavlova ZB., Ivanova MM., 1998.** Agrobacterium-mediated transformation as a way to change hormonal metabolism in higher plants. *Genetika*, 34(2): 165-182.
- Moore R., Clark WD., Stern KR., Vodopich D., 1995.** *Botany*. WCB Publishers Inc. 202-203.
- Özcan S., Özgen M., 1996.** Bitki genetik mühendisliği. Genetic engineering of crop plants. *Kükem Dergisi*, cilt: 1996, sayı: 1, s. 69-95.
- Trick HN., Finer JJ., 1997.** SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6(5): 329-336.
- Trick HN., Finer JJ., 1998.** Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*, 17(6-7): 482-488