Doç. Dr. Mehmet KARACA

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR. DR. MEHMET KARACA

GEN TRANSFERİNİN PRENSİPLERİ

- Genel bakış: Günümüze kadar değişik trasformasyon sistemleri geliştirilmiş olup bunların bir kısmı tam anlamıyla pratikte kullanılmaktadır.
- *Agrobaketerium* yönteminden sonra partükul Bombardment (Particle bombardment), veya Biyolistik (biolistics) yöntemi günümüze degin ekonomik önemi olan bir çok bitkide kullanılmıştır.
- Gen transfer yötemleri salt gen transferinde kullanılmakla yetmeyip biyokimyasal ve moleküler genetikte etkin bir araç olarakta kullanılmaktadır.
- Gen transfer yötemleri günümüzde büyük oranda tek bir genin (dominant özellik) transferinde kullanılmakta olup çoğunlukla herbisit, insektisit, tuza ve soğuka dayanıklıl genlerinin transferleriyle gerçekleşmiştir.

- Gen transferi yada genetik transformasyon, tek bir hücreden bütün bir organizma üretmeyi hedefler.
- Transformasyon için kullanılacak hücreler; yaprak, gövde, hipokotil, kotiledonlar, embriyolar, üreme hücreleri ya da kallus, süspansiyon ve protoplast kültürüne ait hücrelerdir.
- Bitkilere gen aktarımı; fonksiyonel olarak belirlenmiş doğal ya da sentetik nükleik asit dizilerinin bitki hücrelerine genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak aktarılmasıdır.
- Genetik transformasyon olarak tanımlanan bu süreç yabancı nükleik asit molekülünün hücreye girişi (insersiyon), genoma bağlanması (entegrasyon), genin anlatımının yapılması (ekspresyon, ifade) ve yavru döllere aktarımı aşamalarından oluşur.

- Bazı somatik bitki hücreleri, yabancı DNA'nın kendi genomuna entegrasyonu için yeterliliğe sahip olup, aynı zamanda farklı doku veya tam bir bitki gelişimi gösterebilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliğe "kompetant" özelliği adı verilir.
- Tek bir hücrenin gelişerek doku, organ ve nihayetinte bir organizma oluşturma özelliğine ise Totipatent özelliği denir.

- Başarılı bir transformasyon için bazı koşullar gereklidir.
- - Kompetant Özelliği
- - Alıcı hücreye belirli bir özelliği kodlayabilen ve gerekli olan diğer gen dışı elementlerin (promotör, enhenser vd) trasfer edilebilmesi ve bu gen kastinin organizmanın genomuna entegrasyonu.
  - Aktarılmak istenen genin bitki dokularında ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (promotörler),
  - Sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için seçici bir işaret (markır) geni,
  - Aktarılan genin bitkide ifade edilip edilmediğinin anlaşılmasına yardımcı olmak üzere yer alan raportör genden oluşur.

BİLGİ PAYLAŞTIK ÇOĞALDIKÇA - MEHMET KARACA

- Promotörler:
- Gen aktarımı çalışmalarında kullanılan promotorlar; bitki, virüs veya bakteri kökenli olabilirler. Promotorların bazıları konstitütif (sürekli ve bitkilerin tüm organlarında aktif) ifade sağlarken, bazıları doku- veya organ-spesifik ifadeye sahiptirler veya ifadeleri çevresel koşullar tarafından başlatılır..
- Gen aktarımı çalışmalarında promotor seçimi, aktarılan genin istenilen etkiyi gösterebilmesi (konstitütif veya geçici ifade) özelliğine göre yapılır.
- Stabil bir transformasyon çalışmalarında seleksiyon için kullanılacak genlerin promotorları konstitütif ve yüksek düzeyde ifade sağlamalı ve böylece gen aktarılan materyalin kolayca seçimine izin vermelidir.
- Karnabahar mozayik virüsüne ait (CaMV) 35S RNA geninin promotoru, bu amaçla yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. CaMV 35S promotoru konstitütif'dir.
- CaMV 35S promotorunun bazı kısımları duplike edilerek raportör genlerin ifadesi 100 kattan daha fazla artırılabilmiştir.

- Bitkilere gen aktarımı çalışmalarında kullanılan organ- veya doku-spesifik promotorlar, aktarılan genlerin sadece bitkilerin tohum, yumru, meyve gibi yenen kısımlarında ifadeleri istendiği durumlarda önemlidirler.
  - Tohum depo protein genlerinin promotör dizileri, depo proteinlerin organellerde depolanmasını sağlayan amino asit sinyal dizileri ile bir araya getirilerek, yabancı genin organ- veya doku-spesifik ifadesi sağlanabilir..
- Bazı durumlarda aktarılan genin gerekli olduğu zaman ifade edilmesi istenir. Bu amaç için kullanılan promotörler "uyarılabilir promotör" denir.
  - Örneğin, patojene karşı dayanıklılık sağlayan bir genin, bitki patojenle enfekte olduğu zaman ifade edilmesi gerekir. Aksi halde, patojene karşı dayanıklılık sağlayan böyle bir genin konstitütif olarak ifadesi bitkinin normal büyüme ve gelişmesini engelleyebilir.

- Markır Genleri (İşaret Genleri):
- **Bir gen transfer çalışmasında transformantların (hedef hücrelerin), istenilen DNA'yı (transfer edilen DNA) alan hücreyi almayanlardan ayırt edilebilmesi için, aktarılan DNA parçasında seçici işaret (markır) gen yada genleri eklenmektedir.**
- **İşaret genleri arasında en yaygın olarak kullanılanı bakteriyal bir transpozon olan Tn5'den elde edilen *npt*II genidir. Bu, gen neomisin fosfotransferaz enzimini kodlamaktadır. Neomisin fosfotransferaz, kanamisin (Km) ve genetisin (G-418) gibi antibiyotikleri fosforilasyon ile inaktif hale getirerek bu antibiyotiklere karşı direncin gelişmesini sağlamaktadır.**
- ***Npt*II geni aktarılmış tütün bitkilerinin 5-500 mg/l kanamisin ve 10-200 mg/l G-418 içeren besin ortamlarında canlılıklarını sürdürdükleri gözlenmiştir. Oysa ki, gen aktarımı yapılmamış dokuların 50 mg/l kanamisinin veya 5 mg/l G-418 konsantrasyonlarında bile canlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir.**

- ***E. coli*'ye ait bir gen olan higromisin fosfotransferaz (*hpt*) bitki ve hayvansal gen transferi sistemlerinde kullanılan uygun bir seçici işaret genidir.**
- **Km ve G-418, duyarlı dokularda kloroza neden olurken, higromisin yaprak rengini koyu kahve rengine dönüştürmektedir. Transformantların seçimi için kullanılan 25-50 mg/l higromisin konsantrasyonunda kontrol grup her zaman negatif cevap vermeyebilir. Higromisine dayanıklılık genini kullanmanın bir diğer dezavantajı ise bu antibiyotiğe karşı tamamen dayanıklılık kazanılamayışıdır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla *hpt* geni kuvvetli promotorlarla birlikte kullanılmaktadır.**

BİLGİ PAYLAŞTIK... DR. MEHMET KARACA

- Çeşitli herbisitlere karşı dayanıklılık oluşumundan sorumlu olan genler (*bar*, *aroA, als*) de seçici işaret geni olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında bakteriyel ya da memeli sistemine ait dihidrofolat redüktaz (*dhfr*) bazı vektörlerde işaret geni olarak kullanılmakla beraber, *npt*II ve *hpt* kadar yaygın değildir. Seçici işaret geni kullanımında dikkat edilmesi gereken nokta, bitkinin seleksiyon ajanına (antibiyotik gibi) endojen duyarlılığının gen aktarımından önce deneylerle tespit edilmesidir. Gen aktarımı yapılmamış hücre ya da dokuların ölmesine neden olan minimal dozunda önceden saptanması gerekmektedir. MÖD: Minimal Öldürücü Doz:

- Raportör Genler:
- Bitkilere aktarılan belli genlerin aktarılmış oldukları dokularda ifade edilip edilmedikleri çoğu zaman kolayca anlaşılamamaktadır. Pek çok örnekte, aktarılan genin ürünü olan protein belirli koşullarda ve belirli hücre tiplerinde sentezlenmekte ve bu genlerin ürünleri her zaman kolaylıkla saptanabilecek bir enzimatik aktivite veya diğer fonksiyonel aktiviteler ile ilişkili olmayabilmektedir. Bu nedenle, gen aktarımı için kullanılan vektörlere ürünün kolaylıkla ayırt edilebileceği raportör genlerin yerleştirilmesi gerekebilmektedir. İyi bir raportör gen şu özellikleri taşımalıdır:
  - Ürünü bir enzim olmalı ve konakta endojen aktiviteye sahip olmamalı,
  - Gen ve gen ürünleri genetik ve biyokimyasal olarak iyi karakterize edilmiş olamalı,
  - Gen ürünü farklı fizyolojik koşullarda (organ, doku, pH, ışık vb.) stabil olmalı,
  - Enzimatik aktivite kolaylıkla saptanabilmeli ve ölçülebilmeli,
  - İfadesi gen aktarımı yapılmış hücrelerde kolaylıkla gözlenebilen bir fenotipik değişikliğe (renk oluşumu gibi) neden olmalıdır.

- Raportör olarak kullanılan genler arasında en yaygın olanı *E. coli*'ye ait *gus* geni olup, β-glukuronidaz enzimini kodlamaktadır. Raportör olarak *gus* geninin sıklıkla kullanılmasının nedeni bitkiler arasında yaygın endojen aktiviteyi sahip olmayışı ve gen ifadesi sonucu oluşan ürünlerin spektrofotometrik, histokimyasal veya florimetrik metotlarla kolaylıkla belirlenebilmesidir.
- Bitkiler için kullanılan ilk raportör gen olan oktopin sentez (*ocs*) *Agrobacterium* ile enfeksiyon sonucu oluşan kökboğazı tümörlerinde üretilen ve bakteri tarafından C ve N kaynağı olarak kullanılan bir opin olan oktopine aittir.
- *Oct* ve *nos* sentaz genleri sadece *Agrobacterium* ile enfekte olmuş bitki hücrelerinde çalışabildiğinden raportör gen olarak çok uygun genlerdir. Bu genlerin ürünü olan enzimler stabil olup, ucuz ve kolay bir biçimde saptanabilirler. *Npt*II bitkilere gen aktarımı çalışmalarında seçici işaret geni olarak kullanılmasının yanısıra, raportör gen olarak da kullanılmaktadır.

- Son yıllarda belirli bir dalga boyunda yeşil parlak ışık veren yeşil floresan proteini (GFP) adı altında bir gen aktarım çalışmalarında önemli bir yer kazanmıştır.
- GFP, deniz anasında izole edilmiş olup, 27 kDa ağırlığında ve 238 amino asitten oluşan bir proteindir. 395 nm dalga boyunda en üst emilme oranına sahiptir. Parlak yeşil ışık verme özelliği bir fotoprotein olan aequorin'den enerji transferi nedeniyledir.
- *Gus* ve *luc* (lusiferaz) gibi diğer raportör genlerinden farklı olarak *gfp* geninin transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği canlı doku veya hücrelerde yeşil renk vermesiyle anlaşılabilmekte ve dokuların canlılığı korunmaktadır.

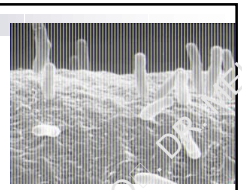
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR. MEHMET KARACA

- Gen aktarım sistemi yada tekniği ne olursa olsun temel amaç ve işlemleri benzerdir. Bu çalışmalarda 1) genin transformasyon kastine yerleştirilmesi, 2) transformasyon kasteinin bir vektöre eklenmesi, 3) vektör-transformasyon kaseti sayısının klonlama yöntemiyle çoğaltılması, 4) vektör-transformasyon kasetinin hücre duvarı, 5) hücre membranı, 6) hücresel içeriklerden (endoplasmik retikulum, golgi vs) zarar vermeden uygun bir şekilde geçerek 7) çift sarmallı nükleus membranından da geçerek 8) kromatinde uygun bir noktadan genoma entegre olması ve hücreyle birlikte yaşamayı gerçekleştirmesidir.

- Gen aktarım tekniklerinin uygulanmasında 3 temel unsur vardır. Bunlar:
- Transferi düşünülen genin bulunmas, izolasyonu ve karaketerizasyonu:
  - En önemli aşama olup tam anlamıyla moleküler genetiğin ve DNA teknolojilerdeki gelişmeler bağlıdır.
- Genin transfer edileceği organizmaya ait rejenerasyon sisteminin belirlenmesi için uygun kültür sisteminin geliştirilmesi:
  - Rejenarasyonda en kısalık ve ekonomiklik yanında olası mutasyonların minimize edilmesi.
- En az zararla bitki hücresine istenilen DNA'nın girmesi ve döllere aktarılması.
  - İnsersiyonal mutasyon (gen silensing), stable transformasyon.

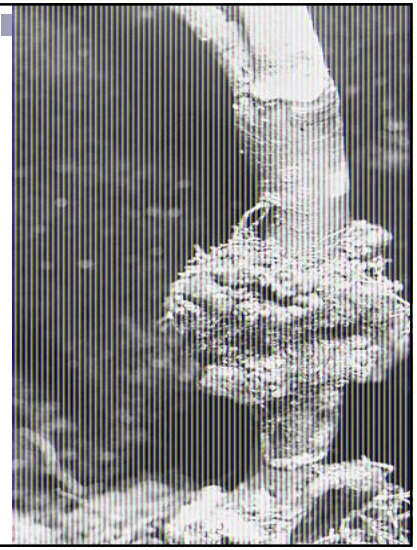
- *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı:
- Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri sayesinde hemen hemen tüm kültür bitki türlerinde transgenik bitkiler elde edilebilmiştir.
- *Agrobacterium*'un gen aktarımında kullanılan 2 türü vardır. Bu türler tarım topraklarında yüzyıllardır çiftçilerin önemli baş belalarından olmuştur.
- *Agrobacterium tumefaciens* (Bitkide ur-tümör-oluşumuna neden olur. Daha çok dikotiledon bitkileri konukçu olarak seçer.
- *Agrobacterium rhizogenes* (Bitkide saçak kök oluşumuna neden olur. Hem dikotoledonlarda hem de monokotiledonlarda etkilidir

Agrobacterium: toprakta doğal olarak yaşayan , gram negatif , spor oluşturmayan , hareketli , çubuk şekilli (Basil) bir bakteri olup , yaralanmış dokulardan bitkilere girerek tümör benzeri dokular oluşturur.

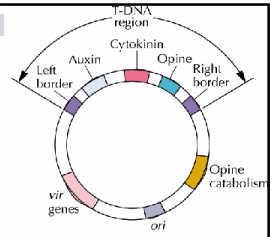


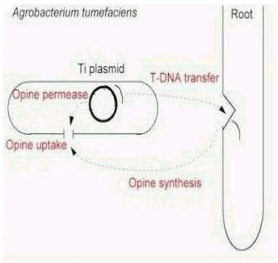
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Başta yaklaşık 10 000 dikotilde ve otlar ve tahıllar gibi monokotillerde **taç tümörü (**crown gall**)** oluşumuna neden olur.

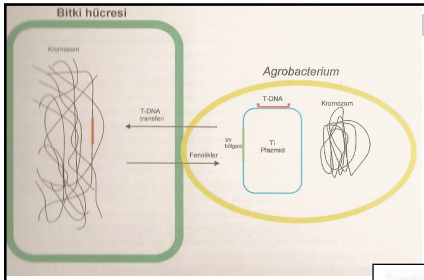


A.tumefaciens 'in taç tümör oluşurmasının nedeni sahip olduğu **Ti** (**T**umour **i**nducing= tümör oluşumunu teşvik eden) **plazmitinin** T-DNA bölgesini bitki genomuna entegre etmesidir.





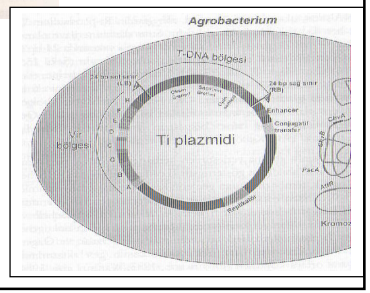
Ti plazmid 4 bölgeden oluşmuştur.
Vir bölgesi ⇒ T-DNA aktarımı için gerekli
Ori bölgesi⇒ replikasyon orijin noktası
Opin bölgesi⇒ bakteri metabolizması için gerekli olan proteinlerin ,octopin ve nopalinin katabolizmasından sorumlu gen bölgesi.
T-DNA bölgesi ⇒ 24 bp'lık sağ ve sol sonlanma bölgeleriyle sınırlandırılmış , bitki büyüme düzenleyici ve opin genlerini taşıyan , bitkilerde tümör oluşumdan sorumlu bölge.



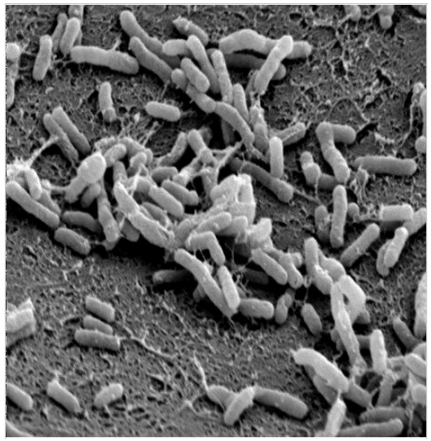
T-DNA AKTARIMINDA GEREKLİ OLAN ÖĞELER

1) T-DNA bölgesi
2) Vir genleri
3) Kromozomal genler

T-DNA'nın bir bitki hücresine aktarımı 4 aşamada gerçekleşir:
1.*Agrobacterium'u*n bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması
2.Virulens genlerin uyarılması
3.T-DNA transferi
4.T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu



- *Agrobacterium tumefaciens,* toprak kökenli bir bakteri olup iki çenekli veya bazı tek çenekli bitkilerin yara dokularında tümör oluşturur.
- Ur (tümör) oluşumunda bu bakteriye gerek duyulmasına rağmen, tümörün devamlılığı ve büyümesi için bakterinin ortamda bulunmasına gerek yoktur.
- Bakteri, bulaştığı toprakta saprofit olarak yaşamakta ve birkaç yıl canlılığını sürdürebilmektedir. Çoğu çift çenekli bitkiyi kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek kök boğazı uruna neden olmaktadır.
- Enfeksiyon bölgesindeki aşırı ve düzensiz hücre bölünmeleri, tarımı yapılan bir çok bitkide büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır.
- Hastalık önce, gövde ve köklerin bilhassa toprak yüzeyine yakın bölgelerinde küçük ve aşırı büyümeler şeklinde görülür. Gelişmenin erken döneminde tümörler az çok küremsi, beyaz ya da ten rengi ve oldukça yumuşaktır. Daha sonra, bu hücrelerin ölümü ve çürümesi sonucu dış dokular kahverengi veya siyaha renge dönüşür.



Agrobacterium rhizogenes

- *A. rhizogenes,* saçak kök hastalığı etkenidir (Riker *et al.,* 1930; Hildebrand, 1934).
- 450 türden fazla bitkinin *A. rhizogenes* ile infekte olabildiği bilinmektedir.
- *A. rhizogenes* ile infekte edilmiş birçok türün eksojen hormon gereksinimi olmaksızın hızlı üreidiği gözlenmiştir (Tepfer ve Tempé, 1981; Willmitzer ve ark., 1982).
- Bu özelliklerinden dolayı saçak kök kültürleri **sekonder metabolit** çalışmaları için önemli bir doku kültürü yöntemidir.



Agrobacterium rhizogenes
ve saçak kök
("hairy root") oluşumu

A. rhizogenes,

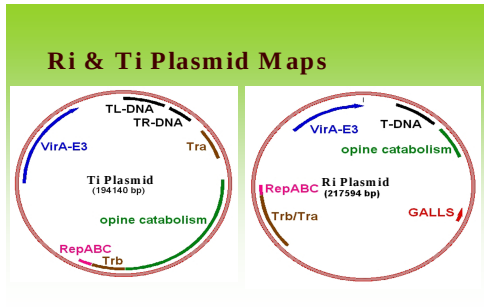
- Yaralanan bitki bölgelerinden salgılanan fenolik bileşiklere karşı kemo-hassas,
- hem kendi genomlarında hem de plazmidlerinde (Ri-'root inducing') taşıdıkları genler aracılığı ile kendi DNA bölgesini bitki genomuna aktarır ve bitkilerde saçak kök ("Hairy Root") hastalığına yol açar.

BİLGİ PAYLAŞTIK_ARŞ. GÖR. DOÇ. DR. MEHMET KARACA

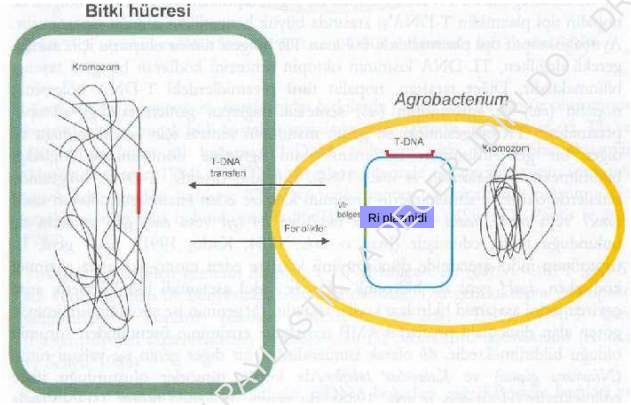
- Saçak kökleri büyümek için bitki büyüme düzenleyicilerine gerek yoktur.
- Enfeksiyon sonucu oluşan dokunun normalde bitkide bulunmayan opinler olarak bilinen bazı aminoasit türevlerini sentezler.
- Opinler bakteri tarafından katabolize edilir.

saçak kök oluşumu ve opin sentezi için;

- 200 kb'dan daha büyük bir megaplazmid üzerinde bulunan hareketli bir DNA parçası (T-DNA) iş görür.
- T-DNA bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonu sonucunda saçak kök oluşumu ve opin sentezi gerçekleşmektedir.



Agrobacterium hücresinde bulunan Ri plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı



- *A. rhizogenes*'in ırkları opin sistemine göre sınıflandırılmıştır. Agropine, mannopin, mikimopin veya cucumopin
- Ri plazmidinin T-DNA bölgesi bakteri ırkına göre değişebilen iki bölgeden ibarettir (TL ve TR DNA).
- TL DNA bölgesi saçak kök oluşumundan sorumlu genleri taşırken, TR DNA ise opin sentezinden sorumlu genleri taşır.

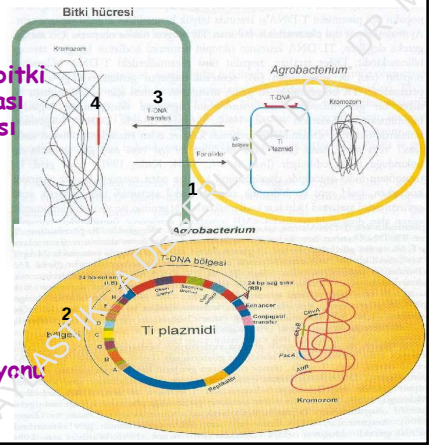
- Ri plazmidinde T-DNA bölgesinden başka vir bölgesi de bulunmaktadır.
- Vir bölgesinde *A. rhizogenes*'in infeksiyonu için gerekli faktörleri sentezleyen genler bulunur. Bu genler *vir*A, *vir*B, *vir*C, *vir*D, *vir*E, *vir*F, *vir*G, *vir*H dir. Ayrıca bakteri kromozomunda bulunan *chv*A, *chv*B, *psc*A ve *att*R genleri de mekanizmanın işlemesinde görev alırlar.

- *A. rhizogenes'in* bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması saçak kök oluşumu için ilk aşamadır.
- Bakteri bitki duvarına tutunduktan sonra selüloz lifleri sentezlemektedir. Bakteri bitki hücre duvarına tutunduktan sonra bitki duvarından salınan fenolik bileşiklerce virülens genleri uyarılır.

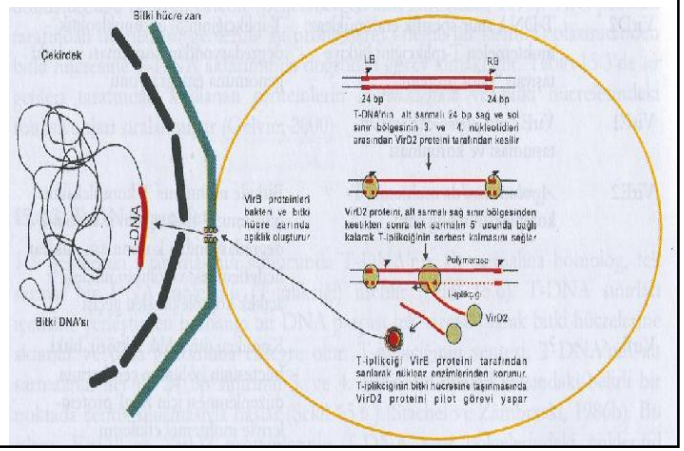
BİLGİ PAYLAŞTIK DERSLERİ DOÇ. DR. MEHMET KARACA

T-DNA aktarımının moleküler mekanizması

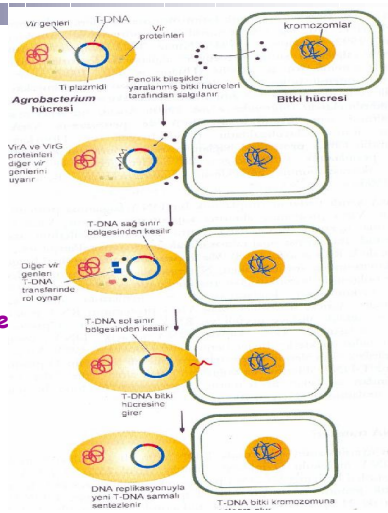
1. *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması
2. Virülens genlerin uyarılması
3. T-DNA transferi
4. T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu



Agrobacterium'dan bitki hücresine T-DNA aktarımında *Vir* genlerinin fonksiyonu



Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin (asetosiringon) vir genlerini uyarması ve bitki hücresine T-DNA transferi



Agrobacterium aracılığı ile gen aktarımı için gerekli olan koşullar

- Gen aktarımı için uygun gelişme safhasındaki eksplant sağlanmalıdır.
- Tür içerisindeki farklı transformasyon oranları elde edilebilir. Geliştirilen gen aktarım tekniği, kültürü yapılan yüksek verimli çeşitlerde başarılı olmadıkça önemi yoktur.

BİLGİ PAYLAŞTIK... DR. MEHMET KARACA

- Çok sayıda bireysel transgenik bitki elde edebilmek için yöntem etkili, ekonomik ve tekrarlanabilir olmalıdır.
- Gen aktarımı yapılan hücrelerden transgenik bitkilerin elde edilebilmesi için etkili bir seleksiyon sistemi geliştirilmelidir.
- Maliyet ve somaklonal varyasyonu en düşük seviyede tutmak için, doku kültüründe geçen süre mümkün olduğu kadar kısaltılmalıdır.

BİLGİ PAYLAŞIMA AÇIKTIR! Ö.Ü., DR. MEHMET KARACA

- Gerek tohumla gerekse vejetatif çoğaltım için stabil ve tek tip transgenik bitkiler elde edilmelidir.
- Sadece istenilen özellikleri kodlayan genler bitkilere aktarılmalı, istenmeyen DNA dizilerinin geçişi engellenmelidir.

- Fazla kopya sayısından kaynaklanan, aktarılan genin inaktivasyonu ve entegrasyon bölgelerinde oluşabilecek gen zararlarını engellemek için, genler düşük kopya sayısında aktarılmalıdır.
- Aktarılan genler istenilen fizyolojik devrede ve arzu edilen seviyede aktivite göstermelidir.

Gen aktarımında kullanılacak DNA parçası, aktarılmak istenen gene ilave olarak;

- Aktarılmak istenen genin bitki dokularında ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (promotorler)
- Sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için seçici bir işaret geni ('marker')
- Aktarılan genin bitkide anlatım yapıp yapmadığının anlaşılmasına yardımcı olmak üzere yer alan haberci ('reporter') genler gereklidir.

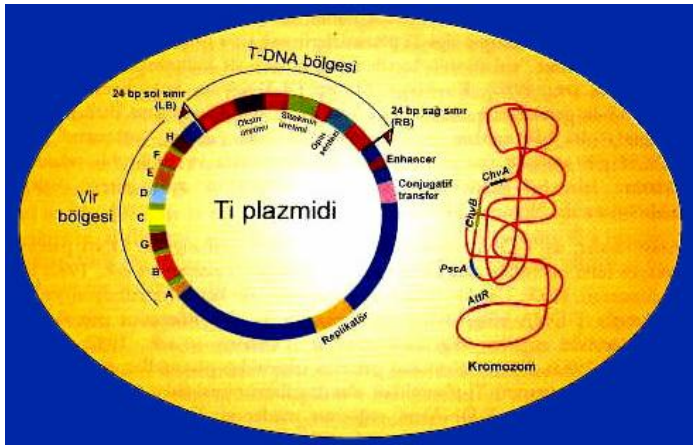
A. rhizogenes ile gen transferi;

A. rhizogenes aracılığı ile gen aktarımı basit bir yöntem olmasına karşın, son yıllarda *A. tumefaciens* ve fiziksel yöntemlerle gen aktarımı daha önemli gelişmeler kaydetmiştir. Böylece *A. rhizogenes*in transforme bitki üretimi için vektör olarak kullanımına ilgi giderek azalmıştır. Diğer taraftan *A. rhizogenes* biyolojik çalışmalar yapmak üzere sekonder metabolit üretime ve metabolizma mühendisliği çalışmaları için saçak kök üretiminde etkin bir biçimde kullanılmaktadır.

BİLGİ PAYLAŞTIĞI İÇİN TEŞEKKÜR EDERİZ... DR. MEHMET KARACA

"Hairy Root"ların avantajları,

- **Temel avantaj, köklerin kolaylıkla dışarıdan hormon gerektirmeden basit besiyerlerinde kolayca üreyebilmeleridir. Sıklıkla kökler, disorganize hücre kültürlerinin ikilenme zamanına benzer şekilde hızla büyürler. Ama hücre süspansiyon kültürlerinden farklı olarak transforme edilen kültürlerin karakteristiği, sekonder metabolitleri tamamen farklılaştırırlar.**
- **Genel olarak normal köklere benzerler. Morfolojik olarak normal bitki köklerinden çok daha fazla dallanmış oldukları için farklıdırlar. Gelişme süresince çok fazla yeni yanal (lateral) meristematik büyüme noktaları meydana getirirler ve bu sayede normal köklerden daha hızlı bir büyüme oranı ortaya koyarlar.**



- **Bazı bitki hormonları, bitki hücrelerinin *in vitro* şartlarda çoğalarak kallus oluşturabilmeleri için mutlak gereklidirler.**
- ***Agrobacterium* enfeksiyonu sonucu oluşan dokularda normal bitkide bulunmayan bazı aminoasitleri ve opin'ler olarak bilinen şeker türevleri sentezlenmektedir.**
- **Bu bileşikler bakteri tarafından karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır.**
- ***Agrobacterium* hatları oktopin ve napolin olarak iki ana grup altında toplanmaktadır.**

- Tümör oluşturan (virulent) *Agrobacterium* hatları ile yapılan ayrıntılı çalışmalar tümör oluşumu ile opin sentezinin, bakteride bulunan 200 kb'dan daha büyük bir megaplazmid üzerinde bulunan hareketli bir DNA parçası (T-DNA, transferred-DNA) ile ilişkili olduğunu göstermiştir.
- *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve kromozomlarla stabil olarak bütünleşmektedir.
- T-DNA bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonu sonucunda tümör ve saçak kök oluşumu ile opin sentezi gerçekleşmektedir. T-DNA bölgesini taşıyan ve *A. tumefaciens* bakterisinde bulunan plazmid, Ti (tumourinducing/tümör oluşturan) plazmidi; *A. rhizogenes* bakterisindeki ise Ri (root inducing/saçak kök oluşturan) plazmidi olarak adlandırılmıştır.

BİLGİ PAYLAŞIM PLATFORMUDIR © DR. MEHMET KARACA

- *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla her çeşit bitki hücresine gen aktarmak mümkün iken, gen aktarılan hücre oranı son derece düşüktür.
- Bu nedenle, çok sayıda gen aktarımı yapılmayan hücre içerisinde gen aktarımı yapılan hücrelerin belirlenerek seçilmesi gerekmektedir.
- Gen aktarımının başarısını en fazla etkileyen faktör ise gen aktarımı yapılan hücrelerin rejenerasyon kabiliyetidir.
- Rejenerasyon kabiliyeti olmayan hücrelere yapılan gen aktarımı hiçbir anlam ifade etmemekte ve mutlaka gen aktarımının yapıldığı hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir.
- Ancak, bitki dokularındaki hücrelerin son derece az bir bölümü hem gen aktarımını hem de rejenerasyon yeteneğine sahiptirler. Bundan dolayı, tarımsal öneme sahip olan genleri bitkilere aktarabilmek için, bitki doku ve hücrelerinden etkili rejenerasyon yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

- *Agrobacterium* aracılığıyla yüksek oranda bir gen aktarımı için gerekli olan koşulları şu şekilde sıralamak mümkündür:
- Gen aktarımı için uygun gelişme safhasındaki eksplant devamlı olarak sağlamalıdır.
- Tür içerisindeki farklı çeşitlerde başarılı olmalıdır. Geliştirilen gen aktarım tekniği, kültürü yapılan yüksek verimli çeşitlerde başarılı olmadıkça hiçbir önemi yoktur.
- Çok sayıda bireysel transgenik bitki elde edebilmek için yöntem etkili, ekonomik ve tekrarlanabilir olmalıdır.
- Gen aktarımı yapılan hücrelerden transgenik bitkilerin elde edilebilmesi için etkili bir seleksiyon sistemi geliştirilmelidir.
- Maliyet ve somaklonal varyasyonu en düşük seviyede tutmak için, doku kültüründe geçen süre mümkün olduğu kadar kısaltılmalıdır.
- Gerek tohumla, gerekse vejatatif çoğaltım için stabil ve üniform transgenik bitkiler elde edilmelidir.

- Sadece istenilen özellikleri kodlayan genler bitkilere aktarılmalı, istenmeyen DNA dizilerinin geçişi engellenmelidir.
- Fazla kopya sayısından kaynaklanan, aktarılan genin inaktivasyonunu ve entegrasyon bölgelerinde oluşabilecek gen zararlarını engellemek için, genler düşük kopya sayısında aktarılmalıdır.
- Aktarılan genler istenilen fizyolojik devrede ve arzu edilen seviyede aktivite göstermelidir.
- T-DNA aktarımı
- *Agrobacterium* bakterisi, bitki hücrelerine T-DNA aktarımı için gerekli olan üç öğeyi taşımaktadır: T-DNA bölgesi, Virülens (vir) bölgesi ve Bakteri kromozomlarında bulunan *chv*A, *chv*B, *psc*A ve *att*R genleri.

- T-DNA bölgesi: T-DNA bölgesi çift sarmal Ti veya Ri plazmidi üzerinde bulunan ve bakteriden bitki hücresine aktarılarak bitkinin genomuyla birleşen küçük bir DNA parçasıdır.
- Enfeksiyon sonucunda bitkinin genomik DNA'sına bir veya birden fazla T-DNA aktarılabilmektedir. Oktopin ve nopalin tipi T-DNA'lar genelde birbirlerine benzemekle birlikte, bazı özellikler bakımından önemli farklılıklar gösterirler.
- Oktopin tipi plazmidler, bitkinin genomuyla bağımsız olarak birleşebilen TL (left/sol), TC (center/merkez) ve TR (right/sağ) olarak simgelenmiş T-DNA bölgelerine sahiptir.
- Öte yandan, nopalin tipi plazmidlerde ise tek bir T-DNA bölgesi bulunmaktadır. Her iki plazmid tipinin 23 kb büyüklüğündeki T-DNA'larında 13 adet gen belirlenmiştir.

BİLGİ PAYLAŞIMA DESTEKLİDİR © DR. MEHMET KARACA

- Oktopin tipi plazmidlerde bulunan TR bölgesi tümör oluşumu için mutlak gerekli değilken, TL-DNA kısmının oktopin sentezini kodlayan bir geni taşıdığı bilinmektedir.
- Diğer taraftan, nopalin tipi plazmidlerdeki T-DNA bölgesinin nopalin (nos) ile agrosinopin (acs) sentezini sağlayan genleri taşıdığı, oktopin plazmidinin TR bölgesindeki iki genin mannopin sentezi için gerekli olduğu ve diğer bir gen ürününün ise mannopin dönüşümünü sağladığı bilinmektedir.

- Virülens (vir) bölgesi: T-DNA aktarımında gerekli olan ürünlerin önemli bir kısmını sağlamaktadır.
- Bu bölgede meydana getirilen mutasyonların, bitki hücrelerine gen aktarımını önemli ölçüde engellediği bilinmektedir. Bu bölgenin, aynı bakteri hücresinde, ancak başka bir plazmid üzerinde bulunduğu zaman da T-DNA aktarımının gerçekleşebilmesi onun "trans-hareket" bir yapıda olduğunu göstermektedir.
- T-DNA'nın dışında ve sol sınıra yakın olan, yaklaşık 30-40 kb uzunluğundaki "virülens" (vir) bölgesi T-DNA aktarımında mutlak gerekli olan 6 ana operon (VirA, VirB, VirC, VirD, VirE ve VirG) ve gerekli olmayan diğer 2 operon (VirF ve VirH)'dan meydana gelmektedir.

- Bakteri kromozomlarında bulunan *chv*A, *chv*B, *psc*A ve *att*R genleri:
- *Agrobacterium'un* kendi kromozomu üzerinde bulunan dört adet lokus [*chv*A, *chv*B, *psc*A (*exo*C) ve *att*R] bakterinin bitki hücrelerine tutunması, yaralanmış bitki dokularında bakterinin çoğalması ve Ti plazmidi üzerinde bulunan *vir* genlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.
- Büyüklüğü 8.5 kb olan *chv*B geninin, β-1,2 glukanın oluşumunda etkili olan 235 kDa'luk bir proteini şifrelediği, 7 kb büyüklüğündeki *chv*A lokusunun ise β-1,2 glukanın periplazm içerisine taşınmasıiçin gerekli bileşikleri sentezlediği, 3 kb'lık *psc*A geninin ise nötr ve asidik yapıdaki önemli hücre dışı polisakkarid bileşiklerinin yapılmasında gereklidir.

- *Agrobacterium*'un bitkiye gen transfer mekanizması çok kompleks bir süreç olup bazı aşamaları gerektirmektedir. Temel aşamalar ise 4 ana başlık altında şu şekilde sıralanabilir:
- 1) Agrobacterium'um bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması.
- 2) Virülens genlerinin uyarılması.
- 3) T-DNA transferi
- 4) T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- *1) Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması tümör oluşumu için gerekli olan ilk aşamadır.
- *Agrobacterium* hücrelerinin yüzeylerindeki polisakkaritlerin bitki hücrelerine tutunmada önemli rol oynadığı bildirilmektedir.
- Polisakkarit sentezi için 20 kb büyüklüğündeki kromozomal *att*R lokusuna ihtiyaç duyulmaktadır.
- Bu lokus bakterinin bitki hücresine tutunması için gerekli olan genleri taşımaktadır.
- Bakteri hücre duvarına tutunduktan sonra bakteri tarafından selüloz lifleri sentezlenmekte ve böylece bitki hücre duvarında çok sayıda bakteri yığılması gözlenmektedir.
- Kromozomal *chv*A, *chv*B ve *psc*A virülens genlerinin β-1,2 glukon ve diğer şekerlerin sentezlenmesinde ve dolaylı olarak bakterinin tutunmasında rol aldığı belirtilmektedir.

- 2) Bakteri bitki hücre duvarına tutunduktan sonra, yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan fenolik bileşikleri, *Agrobacterium*'un algılanmasıyla T-DNA aktarım işlemi başlatılır.
- Normalde bitkilerde fitoaleksin ve lignin biyosentezinde rol aldığı tahmin edilen asetosringon (AS) gibi fenolik bileşikler, bakteri hücresine girerek *vir* genlerini uyarmaktadır.
- Fenolik bileşiklerle birlikte bu uyarılma işleminde belirli monosakkaritler de rol oynamaktadır.
- Fenolik bileşikler bitki türleri ve dokuları arasında farklılık göstermektedir. Örneğin; tütün, patates ve domates gibi *Solanaceae* familyasındaki türlerde AS asıl uyarıcı bileşik iken, diğer türlerde benzoik asit ve sinamik asit türevleri uyarıcı olarak yer almaktadır.
- Bazı bitki türlerinde salgılanan bileşikler optimum T-DNA transferi için yeterli olmamakta ve böyle durumlarda T-DNA transfer frekansını artırmak için enfeksiyon sırasında AS kullanılmaktadır.

- Yeterli fenolik bileşik bulunmadığı durumlarda, besin ortamlarındaki şeker konsantrasyonunun yüksek olması gerekmektedir.
- Optimum T-DNA aktarımı için besin ortamının pH'sı 5-6, sıcaklık ise 20-30°C arasında olmalıdır. 32°C'den daha yüksek sıcaklıklar *vir* genlerinin ifadelerini engellemektedir.
- *Agrobacterium* bakterisinin hücre zarı içerisinde lokalize olan algılayıcı/sensör VirA proteini (91.6 kDa) yaralanmış hücre tarafından salgılanan sinyal proteinlerini, yani fenolik bileşikleri yakalar.

- VirA proteini, bir priplazmik ve iki transmembran (TM1 ve TM2) olmak üzere üç bölge (domain)'den oluşmaktadır.
- Priplazmik kısım monosakkaritlerin yakalanmasında rol oynarken, TM1 ve TM2 algılama ve sinyal verme görevini üstlenmektedir.
- *Vir* genlerinin uyarılmasında, önemli bitki hücre duvarı polisakkarit monomerleri olan D-galakturonik ve D-glukoronik asit gibi asidik monosakkaritlerin AS ile birlikte rol oynadığı bildirilmektedir.
- Uyarılan VirA kendi fosfatını sitoplazmik bir DNA bağlanma proteini (binding protein) olan VirG proteinine aktarma kapasitesine sahiptir. VirA tarafından fosforilizasyona uğrayan VirG daha sonra diğer *vir* genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde transkripsiyonal faktör olarak görev yapar .

- 3) T-DNA transferi:
- Bitki hücresine aktarılan T-DNA'nın genlerinin geçici (transient) ifade seviyesi, kararlı (stabil) olarak entegre olan T-DNA'larınkinden daha yüksek olmaktadır. Bu ise, bitki çekirdeğine aktarılan T-DNA'ların önemli bir kısmının stabil olarak bitki genomuna entegre olmadığını göstermektedir. T-DNA bitki hücre çekirdeğine tek sarmal olarak girmekte ve kromozomlarla zorunlu bir rekombinasyon sonucunda birleşmektedir. T-DNA çekirdeğe girdikten sonra, bir veya birkaç kopya halinde rastgele, bitki kromozomlarıyla birleşmekte ve bu birleşmede kromozomların aktif kısımları tercih edilmektedir.

- Bitki hücresi içerisinde tek sarmal T-DNA kompleksinin çekirdek zarını geçerek kromozomlara yönelmesinde en önemli görevi VirD2 ve VirE2 proteinleri üstlenmektedir.
- VirD2'nin bağlı bulunduğu T-iplikçiği ile bitki DNA'sında mikro-homolog bölgeler açılmakta ve T-DNA'nın 3' ucu veya bu uca yakın bölgeler bitki DNA'sında buldukları homolog bölgeler ilk teması (sinapsis) kurmaktadır.
- Bitki DNA'sında 3'→5' yönünde yapısal açıklık oluşmakta ve bu açıklığın 3' ucu endonükleaz enzimleri tarafından kesilerek, T-iplikçiğinin VirD2 proteinine bağlanan 5' ucundaki ilk nükleotid üst sarmal bitki DNA'sıyla 5'→3' yönünde eşleşmektedir.
- T-iplikçiğinin 3'ucundaki fazla bölgeler ve açılan bitki DNA parçası endonükleaz veya 3'→5' ekzonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. T-iplikçiğinin VirD2'ye bağlanan 5' ucu ve diğer 3' ucu, kesilen bölgeden bitkinin alt sarmal DNA'sı ile birleşmektedir.

- T-iplikçiğinin 3'→5' yönündeki bitki DNA sarmalına entegrasyonu tamamlandıktan sonra, bitki DNA'sı onarılmakta ve T-iplikçiği replikasyonla çift sarmal DNA'ya dönüşmektedir.
- T-DNA, köken olarak prokaryotik yapıda olmasına karşın, bitkinin kromozomuyla bütünleşmesinden sonra ökaryotik kromatin yapı özelliklerine uyum sağlamaktadır.
- T-DNA'nın opin sentezi ve *onc* genlerinin transkripsiyonları neticesinde opin üretimi ve tümör oluşumu meydana gelmektedir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR © DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Bunlardan ilkinde; “T-pilus” olarak adlandırılan bir nükleoprotein kompleksinin T-DNA aktarımında köprü görevi yaptığı belirtilmektedir. T-pilus’un oluşumu için 11 adet VirB proteinine de ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. Muhtemelen, T-pilus’unun moleküler bir şırınga görevi yaparak T-kompleksini bitki hücre sitoplazmasına enjekte ettiği bildirilmektedir. Diğer bir teoriye göre de; T-pilus kompakt bir yapıya dönüşerek, bakteri hücresini bitki hücresine doğru çekmekte ve bakteri ile bitki hücre zarı arasında gerçekleşen füzyondan sonra, VirB proteinleri tarafından oluşturulan gözenekten T-kompleksi bitki hücresine aktarılmaktadır.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR. MEHMET KARACA

- Tarımsal özelliklerini iyileştirmek amacıyla bitkilere aktarılmak istenen gen ya da genler ile işaret genlerinin doğrudan Ti plazmidlerinin T-DNA bölgesine klonlanması pratikte pek mümkün olmamaktadır. Bu durum, Ti plazmidlerinin büyüklüğünden ve düşük kopya sayılarından kaynaklanmaktadır. Karşılaşılan bu sorunu aşmak için “ko-entegratif” ve “binari” (ikili) vektör sistemleri geliştirilmiştir. Bu vektörler hem *E. coli*, hem *Agrobacterium* ve hem de bitkide fonksiyonel olacak şekilde tasarlanmıştır.

Doğrudan gen aktarım teknikleri

Agrobacterium’a dayalı gen aktarım sisteminin etkin bir biçimde kullanılamadığı bitki türlerine gen aktarımı için çoğunlukla doğrudan gen aktarım yöntemleri kullanılmaktadır.

Bitkilere doğrudan gen aktarımının ilk başarılı örneği, *Agrobacterium*’a ait 120 kb’lik Ti plazmidinin Petunya ve tütün protoplastlarına aktarılmasıdır. Bunu, işaret ve raportör genleri taşıyan daha küçük boyutlu plazmidlerin (5-10 kb) aktarımları izlemiştir.

Doğrudan gen aktarım teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemler; kimyasal yöntem, elektroporasyon, mikro-enjeksiyon ve biyolistik (partikül tabancası veya bombardımanı)’dir.

-

- **Agro-enfeksiyon**
- Bu yöntem, *Agrobacterium* sistemi ile viral enfeksiyonun bir kombinasyonudur. Ti plazmidinin T-DNA bölgesine viral DNA’nın entegrasyonu yapıldıktan sonra, *Agrobacterium* ile transformasyon yapılır. Viral genom T-DNA’nın bir parçası olarak bitki hücresine girer ve ardından fonksiyonel virüs replike olur. Böylece transgenik bitki normal T-DNA transformasyonundaki gibi entegre olmuş viral DNA’yı taşır.

BİLGİ PAYLAŞTIRMA DERSİ / DR. MEHMET KARACA

Makro-enjeksiyon

Makro-enjeksiyonda, aktarılmak istenen DNA'yı taşıyan plazmid solüsyonunun fideciklere enjeksiyonu ile gen aktarımı gerçekleştirilir. Çavdarın olgunlaşmamış çiçek meristeminin altındaki gövde bölgesine *npt*II geni aktarılmış ve enfeksiyon yapılmış bitkiden elde edilen tohumlar kanamisine dayanıklılık bakımından seçilmişlerdir. Kanamisine dayanıklı fideciklerde yapılan Southern analizi ile stabil bir entegrasyon gösterilmiş, ancak bu yöntem diğer tahıllara uygulanamamış ve yeterince geliştirilememiştir.

Protoplastlara gen aktarımı

Enzimatik yollarla hücre duvarları uzaklaştırılmış bitki hücreleri, (yani protoplastlar) hücre süspansiyon kültürü, kallus kültürü ve farklılaşmış bitki dokularından izole edilebilir. Kimyasal maddeler yardımıyla, lipozomlarla veya membran geçirgenliğinin elektrik akımı ile değiştirilmesi (elektroporasyon) sonucunda protoplastlar gen aktarımında kullanabilmektedir.

- Protoplastlar sadece hücre membranı ile çevrili olduklarından deneysel olarak belirlenmiş konsantrasyonlardaki DNA'yı içlerine almaları kolaydır.
- Enzimatik veya mekanik yolla yapılan izolasyon işlemleri aynı zamanda hücre yaralanmalarını artırmakta, bu durum hücrelerin rejenerasyon yeteneğini ve entegratif transformasyonu teşvik edebilmektedir.
- Hücrelerin DNA molekülleri ile teması kolay olduğundan transgenik bitki elde etme şansı fazladır.
- Gen transferi için biyolojik vektör kullanılmadığından DNA'nın hücre içine alınması fiziksel bir süreçtir ve bu da konukçu sınırı engelini ortadan kaldırmaktadır.

- Bu avantajların yanında, protoplast sisteminin en büyük dezavantajı her bitki grubu için (örneğin tahıllar) protoplastlardan rejenerasyonunun kolay olmayışıdır.

a) Kimyasal maddeler yardımıyla gen aktarımı:

Polietilen glikol (PEG), polivinil alkol veya kalsiyum fosfat gibi kimyasal maddelerle protoplastların hücre zarlarının geçirgenlikleri geri dönüşümlü olarak artırılabilir.

Genetik transformasyon için protoplastlar, DNA ve kimyasal maddeler ile birlikte inkübe edilir.

Bitki türü, kültür koşulları, protoplast kaynağı ve izolasyon için kullanılan yöntemlerin yanısıra, transformasyon için kullanılan tampon ve katyonla, taşıyıcı DNA'nın varlığı ve konsantrasyonu, plazmid ve taşıyıcı DNA formu, hücre döngüsü, PEG gibi gen aktarımına yardımcı kimyasal maddelerin konsantrasyonu gibi parametreler, protoplastlara gen akatrım frekansı üzerine etkilidir.

b) Lipozomlarla protoplastlara gen aktarımı:

DNA molekülleri, lipozomlar içinde kapsüllendikten sonra çeşitli dokulara, hücre ve protoplast kültürlerine, polen tüplerine gen aktarımı için kullanılır.

Çıplak DNA'nın PEG veya elektroporasyon ile protoplastlara yüksek frekanstaki aktarımı bu yönteme olan ilgiyi azaltmakla birlikte, lipozomlarla DNA aktarımının en önemli avantajı, DNA'nın lipozomlar tarafından korunması nedeniyle büyük boyutlu plazmidlerin (19 kb'den büyük) entegrasyonunun etkin bir biçimde gerçekleşmesidir.

Lipozomlarının hücre zarlarıyla füzyonu (kaynaşması) yoluyla gen aktarımında kullanımlarının yanısıra, lipozomlarının vakuollerin içine mikro-enjeksiyonu da mümkündür.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA GÜÇLENİR - DR. MEHMET KARACA

c) Elektraporasyon ile protoplastlara gen akatrımı: Süspansiyon halindeki protoplastlara yüksek voltajlı elektrik akımı uygulandığında hücre zarının geçirgenliği geri dönüşümlü olarak artar ve mikroporlar oluşur. Elektroporasyon sırasında protoplastların bulunduğu solüsyonda DNA da bulunduğundan membranda açılan porlardan DNA hücre içine girer porlar kapanarak hücrenin bütünlüğü sağlanır.

Genellikle kullanılan elektroporasyon sistemleri ya düşük voltaj/uzun süreli elektrik akımı (pulse), ya da yüksek voltaj/kısa süreli elektrik akımı şeklindedir. Elektroporasyon ile gen aktarım frekansı plazmid konsantrasyonu, elektriksel koşullar, protoplast boyutu ve yoğunluğu ile protoplastların fizyolojik özelliklerine bağlıdır.

Biyolistik



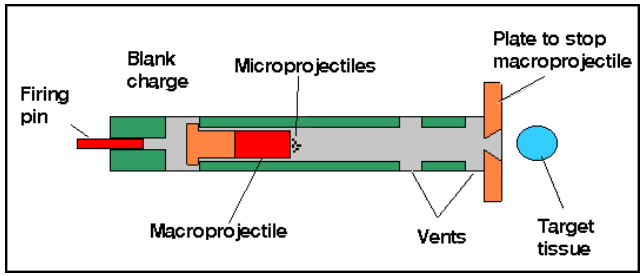
Biyolistik, biyolojik ve balistik kelimelerinin kısaltmalarının birleştirilmesi şeklinde adlandırılan, hücrelerin DNA ile kaplı hızlandırılmış mikro taşıyıcılarla transfekte edilmesinde kullanılan bir metod /alettir.

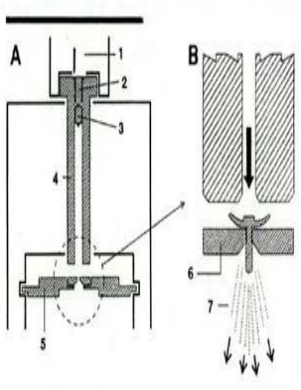




BİLGİ PAYLAŞTIKLA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

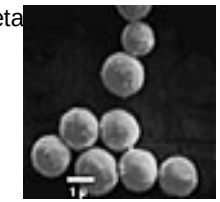






- 1.Ateşleme mili
- 2.Barut ateşleyicisi
- 3. Mikro taşıyıcıları(tungsten partikülleri) taşıyan makro taşıyıcı (plastik mermi)
- 4. Hızlanma tüpü
- 5. Durdurucu tabaka rafı ve durdurucu tabaka
- 6. Makro taşıyıcıyı tutmuş haldeki durdurucu tabaka
- 7. Ateşlenmiş mikro taşıyıcılar

Meta





- Altın partikülleri partikülleri Tungsten
- Tungsten partiküllerinin ortalama çapları 0,5-2,0 µm'dir. Ancak düzensiz şekilleri ve belli hücre tipleri için toksik etkili olmaları, DNA çökelmesine neden olabilen yüzey oksidasyonuna neden olmaları nedeniyle tercih edilmezler. Bunun yerine daha pahalı olan ancak 1-3 µm çapta düzenli şekillere sahip olan altın partikülleri kullanılması tercih edilebilmektedir.

Partiküllerin Hazırlanması

- 1.Aşama: Partiküllerin sterilizasyonu ve birbirlerinden ayrılması:
- 30mg altın partikülü tartılır ve steril bir silikon santrifüj tüpüne yerleştirilir konur ve üstüne 0.5ml %100'lük etanol eklenir, yüksek hızda 1-2 dk vortexlenir. Ardından 10.000 rpm'de 10 sn döndürülür. İşlem üç kez tekrarlanır.
- Tüp 1 dk boyunca santrifüjlenir, ardından süpernatan alınır yerine 0.5 ml steril ve iki kere distile edilmiş su eklenir. Daha sonra vortekslenir ve santrifüje konur. İşlem bir kez daha tekrar edilir.
- Partiküller son kez 0.5 ml steril ve iki kere distile edilmiş suda çözünür ve 50 µl ayrılır diğer karışım 4o C'de saklanır.

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLI HAZIRLANMIŞTIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Partiküllerin Hazırlanması

- 2.Aşama: Partiküllerin kaplanması:
- 50 µl altın partikülünün bulunduğu sıvıya yapılabilirse vorteks sırasında 5 µl DNA (1 mg/ml), 50 µl 2.5 M CaCl2, 20 µl 0.1 M taze spermidine eklenir.
  - Vortekslemeye 3 dk boyunca devam edildikten sonra en yüksek hızda 6 sn santrifüjlenir ve ardından tüpten mümkün olduğunca çok süpernatan uzaklaştırılır.
  - 250 µl %100'lük etanol eklenip, vorteks, santrifüj ve süpernatanın uzaklaştırılması sırası uygulanır.
  - Partiküller 100 µl %100'lük etanol içine konulup düşük hızda vortekslenirken her makro taşıyıcıya 15 µl'lik eşit miktarlarda aktarılırlar.

Gen aktarımında etkili faktörler

- 1.Partikül hızlandırmada kullanılan helyum gazının basıncı
- 2. Mikro taşıyıcının boyutu, tipi ve sayısı
- 3. Makro taşıyıcı ile hedef doku arasındaki uzaklık
- 4. DNA'nın mikro taşıyıcı partiküllere yapışması için kullanılan spermidin ve CaCl2'ün konsantrasyonu

Yöntemin avantajları/dezavantajları

- Kullanım kolaylığı
- Her ateşlemede mikro taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi
- Dokulara zarar verebilmesi
- Mikro taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması
- Bir çok doku, hücre ve canlı türüne uygulanabilmesi
- Başarılı yöntem için denemelerin gerekmesi
- Başarılı aktarımın sınırlı yüzdesi olması
- Kullanılan malzemeler bazı modellerde pahalı

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR - DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Biyolistik (partikül bombardımanı)

Bu yöntemin esası, yüksek derecede hızlandırılmış *mikro-taşıyıcı* adı verilen 1-2 µm çapındaki metal (çoğunlukla altın ya da tungsten) partiküller aracılığıyla, bir ateşleme mekanizmasından yararlanılarak DNA'nın hedef dokulara aktarılmasıdır.

Mikro-taşıyıcılar *makro-taşıyıcı* olarak adlandırılan plastik bir silindir üzerinden hedef dokulara doğru genellikle helyum gazı basıncı ile hızlandırılır.

Ateşleme gerek mikro-taşıyıcıların sürünmesinden doğan sürüklenmeyi, gerekse yüksek basınçlı gaz şokundan doğabilecek hücre parçalanmasını ve sesi engellemek için vakum altında yapılır.

Biyolistlik yönteminin başlıca üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

-Kullanım kolaylığı,

-Her ateşlemede mikro-taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi,

-Mikro-taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması,

-Polen, hücre kültürleri, bitki organları, meristemler, kallus, olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo parçaları, yaprak parçaları, mikrosporlar gibi çeşitli hedef dokulara uygulanabilmesi,

-Mikro-taşıyıcıların derin hücre katmanlarına ulaşabilmesidir.

- Biyolistlik yöntemi başlangıçta maya ve kültüre alınan hayvan hücreleri ile kloroplastlar gibi bitki organellerine ve daha sonra çeşitli bitki hücre ve dokularının transformasyonu için kullanılmıştır.
- Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, partikül bombardımanı metoduyla bir DNA parçası yerine doğrudan faj, bakteri veya maya hücrelerinin hedef dokuya aktarılabileceğini göstermiştir.
- Bu yolla büyük moleküler yapıdaki DNA aktarılabilmekte ve DNA izolasyonu ve saflaştırılması gibi zor işlemlerden sakınılabilmektedir.
- Bu yöntemin uygulanmasıyla, regülatör dizilerin analizi, intronların gen ifadesi üzerindeki etkileri ve mRNA stabilitesinin incelenmesi mümkün olmaktadır.

Mikro-enjeksiyon

En kesin biçimde hücrenin istenilen bölmesine DNA'nın enjekte edilmesini sağlayan mikro-enjeksiyon, kapiller mikropipetler yardımıyla ve mikroskop altında gerçekleştirilir.

Mikro-enjeksiyonla protoplastlara, izole edilmiş hücrelere, kallus, meristemler, zigotik ve mikrospor türevli pro-embriyolar gibi çok hücreli dokulara DNA aktarımı mümkündür.

Alıcı hücreler veya dokular sodyum alginat, agaroz veya poli-L-lisin ile ya da kapiler sistem kullanılarak sabitlenir. DNA mikromanipülatör sistemine bağlı kapiler bir mikropipet aracılığı ile doğrudan hücrenin çekirdeğine aktarılır.

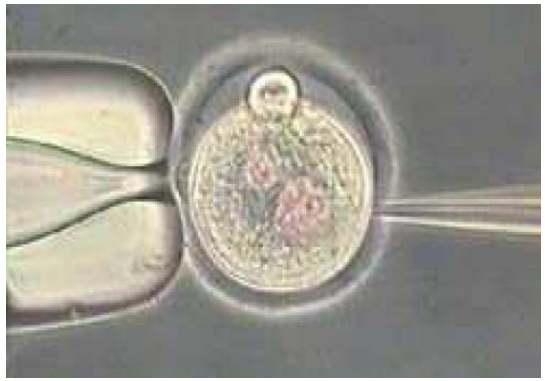
Hücre ve protoplastlara mikro-enjeksiyon yoluyla gen aktarımı tütün, yonca ve bazı *Brassica* türleri gibi çeşitli bitkilerde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

Mikro-enjeksiyon yönteminin avantajları:

- Aktarılan DNA'nın miktarı optimize edilebilir.
- İstenilen hücreye DNA aktarılabilir.
- İstenilen hücre kısmına DNA aktarımı görsel olarak kontrol edilebilir.
- Mikrosporlar ya da birkaç hücreli proembriyolar gibi küçük boyutlu hedef dokular kullanılabilir.
- Zigotik embriyo kültürü ve mikro-enjeksiyon yöntemleri birlikte kullanılarak her bitki türüne gen aktarımı yapabilmek mümkün olabilir.

- **Mikro-enjeksiyon yönteminin dezavantajları;**
  - Sadece bir hücreye DNA aktarabilmesi
  - Deneyim gerektirmesi.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR - DOÇ. DR. MEHMET KARACA



Elektroforez ve Mikrolazer

Elektroforez, elektroporasyonun tersine DNA'nın taşınmasına neden olan ve analitik amaçlarla kullanılan bir yöntemdir.

Platin elektrodlarla delinmiş arpa tohumlarının GUS geni içeren plazmid DNA'sı ile bir saat boyunca 2-10 V/cm voltaj ve 0.1 mA akım altında tutulması sonucunda çimlenen embriyolarda GUS aktivitesi saptanmıştır.

Lazer ışığının hücre zarı ve duvarında delik oluşumuna yol açması, vektör kullanmaksızın ortamdaki DNA'nın hücre içene aktarımı için mikrolazer uygulaması olasılığını güçlendirmiştir. Bununla beraber, bu yöntemde hücre duvarı yapısına DNA adsorbsiyonu nedeniyle, DNA'nın hücre içene girişi ile ilgili sorunlar vardır.

Polen transformasyonu

Çimlenmekte olan polenlerin DNA ile muamele edilmesi yoluyla yapılan gen aktarım metodudur.

DNA'nın ya polen çekirdeği ya da polen tüpü aracılığı ile zigota ulaşabilmesi nedeniyle bu yöntem *in vitro* manipülasyonu gerektirmeden, doğrudan gen aktarımı için ideal yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, moleküler olarak gen aktarımı kanıtlanamamıştır. Polen transformasyonunda hücre duvarı engeli, ekzonükleazlar ve endonükleazlar ile DNA yıkımı ve alıcı DNA'nın heterokromatik evrede oluşu DNA entegrasyonu için başlıca dezavantajları oluşturmaktadır

- Polen yoluyla gen aktarımı:
- Polenin, doğal bir transformasyon vektörü olarak biyolistik aracılığıyla bombardımanı yapılmıştır. Bombardıman edilmiş polenler polinasyon için kullanılmış ve tohumlar doğrudan üretilmiştir. DNA'yı olgun bir polen içine sokmak için mikroprojectile bombardımanı en iyi yöntemlerden biri olarak tercih edilir. Transforme olmuş polen taneleri canlı kalır ve böylece polinasyonda kullanılabilirler.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR © DR. MEHMET KARACA

Polen tüpü yoluyla DNA aktarımı

Tozlanmayı takiben kesilmiş stigmaya DNA uygulaması ile DNA aktarımı yöntemidir.

Zigotik embriyoya DNA emdirilmesi

İzole edilen embriyoların DNA solusyonu ile muamele edilmesi yoluyla DNA aktarımı yapılabilmektedir.

Embriyoların izolasyonu sırasında uygulanan işlemler (organik çözücülerin kullanımı gibi) belli ölçüde hücrelere zarar verdiğinden DNA'nın hücrelere girişi kolaylaştırılır.

Fiberler aracılığı ile DNA aktarımı:

DNA ile kaplanmış silikon karbit fiberler (0.6 µm çap X 10-80 µm uzunlukta), süspansiyon kültüründeki hücrelere gen aktarımı için kullanılabilmektedir.

DNA solusyonu ile hücre süspansiyonunun, silikon karbit fiberler varlığında kuvvetli bir biçimde karıştırılması, fiberlerin mikro-enjeksiyon iğnelerine benzer şekilde hücre duvarında delikler açmasına neden olmakta ve DNA bu deliklerden hücre içine girmektedir.

Sonikasyon:

Ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında boşluklar açarak serbest DNA parçalarının hücre içine girişini sağlamak esasına dayanan bu metot bazı durumlarda elektroporasyondan daha iyi sonuçlar vermiştir.

Desikasyon:

Dokuların önce soldurulup, daha sonra aktarılmak istenen DNA'nın da bulunduğu bir ortamda tekrar su alımı sonucu, DNA'nın hücre içerisine alınması tekniğine dayanan basit bir yöntemdir.

- BİTKİ HÜCRELERİNE DOĞASIYLA BU HÜCRELERDEN ELDE EDİLECEK BİTKİLERE HERBİSİTLERE, BÖCEKLERE, KURAĞA, SOĞUĞA, HASTALIK VE ZARARLILARA DAYANIKLILIK, VİTAMİN, KARBOHİDRAT, YAĞ VE PROTEİN İÇERİKLERİNİN ARTIRILMASI, ÜREME FİZYOLOJİSİ VE METABOLİK FAALİYETLERİN DEĞİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK GEN TRANSFERİ, BİYOTEKNOLOJİNİN VEYA GENETİK MÜHENDİSLİĞİNİN AMAÇLARIDIR.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR - DR. MEHMET KARACA

GELENEKSEL BİTKİ ISLAHI

- Bugüne kadar uygulanan ıslah programlarında daha çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışılmış, kültür bitkilerine hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması ikinci planda kalmıştır.
- Tarımsal üretimi olumsuz olarak etkileyen en önemli faktörlerden olan hastalık ve zararlılar nedeniyle ortaya çıkan ürün kayıpları yüksek maliyetli kimyasal ilaçlarla önlenmeye çalışılmış, ancak kullanılan kimyasal maddelerin kalıntıları gerek üründe, gerekse toprakta uzun süre ayrışmadan kalabildiğinden; insan, hayvan ve çevre sağlığını önemli ölçüde tehdit etmeye başlamıştır.

- Klasik bitki ıslahının olumsuz olan bir diğer yönü de; türleriçi genetik çeşitlilikle sınırlı kalması ve oldukça zaman alıcı bir uğraş olmasıdır.
- Günümüzde, özellikle insan beslenmesinde önemli yeri olan ürünlerde, bu genetik çeşitliliğin sınırlarına yaklaşılmıştır.
- Klasik bitki ıslahı yöntemlerinden beklenen başarı, üzerinde çalışılan populasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılı olduğundan, populasyonda var olan çeşitliliğin daha da artırılması gerekmektedir.
- Melezleme ile aktarılan genin özelliklerinin bitkilerde fenotipik olarak gözlenebilmesi için, Mendel Açılmaları'nın belirlediği çok sayıda bitkiden oluşan melez populasyona gereksinim vardır.

- biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan, öncelikle farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorunluluğu ortadan kaldırılmakta, klasik ıslahta yabani gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan doğal izolasyon, bir başka deyişle, kısırlık ve uyuşmazlık sorunu da çözülmektedir.
- Modern biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla, klasik ıslahta farklı cinsler arası gen aktarımında ikinci büyük engel olan, bağlılık (linkage) nedeniyle istenen genlerle birlikte istenmeyen genlerin de melezlere geçmesi sorun olmaktan çıkmaktadır.
- Klasik bitki ıslahının temelini oluşturan varyasyon ve seleksiyon, yeni teknolojide karşımıza transformasyon ve *in vitro* seleksiyon olarak çıkmaktadır. *In vitro* seleksiyonlar, tüm bitki yerine hücre seçimine olanak sağlamakta; bu ise tarlada binlerce bitki yerine, petri kutularında hücre düzeyinde çalışmak anlamına gelmektedir. *In vitro* koşullarda seleksiyonun herhangi bir zamanda yapılabilmesi nedeniyle, bitkinin gelişme dönemlerine bağlı kalınmaması da önemli bir olanak sağlamaktadır.

Biyoteknoloji ve Modern biyoteknoloji

- Özel bir kullanıma yönelik olarak ürün ya da işlemleri dönüştürmek ya da oluşturmak için biyolojik sistem ve canlı organizmaları ile bunların türevlerini kullanan teknolojik uygulamalara BİYOTEKNOLOJİ
- Rekombinant DNA'nın hücre çekirdeğine ya da organellerine doğrudan enjeksiyonu ya da farklı taksonomik gruplar arasında uygulanan hücre füzyonu gibi doğal çoğalma ve rekombinasyon engellerini ortadan kaldıran ve klasik ıslah ile seleksiyon yöntemlerince kullanılmayan *in vitro* nükleik asit tekniklerinin tamamı olarak tanımlanmaktadır.

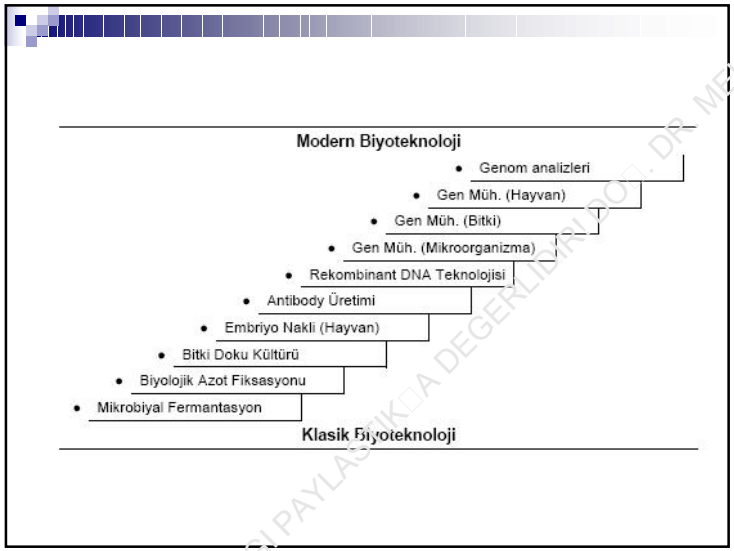
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR! DR. MEHMET KARACA

- Bir türe başka türden gen aktarılarak doğal yapının değiştirilmesiyle yeni genetik özellikler kazandırılmasını sağlayan bu modern biyoteknoloji tekniklerine "gen teknolojisi", gen teknolojisi kullanılarak doğal olarak elde edilmesi mümkün olmayan yeni özellikler kazandırılmış organizmalara da "*Genetik Yapıları Değiştirilmiş Organizma (GDO)* adı verilmiştir.

- Atıkların biyolojik arıtımından, mayalanma (fermantasyon) gerektiren gıda üretimine kadar farklı uygulama alanları bulan biyoteknoloji içinde yer alan bitki biyoteknolojisinin günümüze gelene kadar uzun bir süreçten geçtiği bilinmektedir.
- 1700'lü yıllarda melez bitkilerin diğerlerinden ayrılmasıyla başlayan bu süreç, günümüzde A vitamini ve demir bakımından zenginleştirilmiş transgenik çeltik çeşitinin elde edilmesine kadar gelmiştir.

- Bitkisel anlamda modern biyoteknoloji çalışmaları ise, istenilen genlerin bulunması, karakterize edilmesi, izolasyonu ve hedef hücreye aktarılması aşamalarından oluşmaktadır.
- Bitkilere gen aktarımında kullanılan tekniklerin esasını; istenilen geni taşıyan bir DNA parçasının doku içindeki hücrelerin kromozomlarına yerleştirilmesi, daha sonra doku kültürü tekniklerinin kullanılarak bu hücrelerden transgenik bitkilerin elde edilmesi oluşturur.
- Biyoteknolojik teknikler içinde en çok bilineni; hızlandırılmış partikül sisteminden yararlanılarak söz konusu genin hedef hücre dokuya süratle gönderilmesidir.

- Gen aktarımında yoğun olarak kullanılan diğer bir araç ise, toprakta yaşayan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri, genellikle çift çenekli bitkileri kök boğazındaki yaralardan enfekte ederek, oluşturduğu ur ile gen geçişlerini sağlamaktadır.
- Her iki yöntemde de yabancı gen, alıcı hücredeki kromozomlardan bir ya da birkaçına rastgele yerleşmektedir. Bu nedenle, söz konusu genin hangi hücrelere aktarıldığının belirlenmesi gerekir.
- Belirleme çalışmaları, gen aktarılan dokuların ilk aşamada bir dizi seçici ortamda ve daha sonra da sürgün oluşturmayı hızlandıran ortamlarda kültüre alınmaları ile yapılır. Elde edilen sürgünlere çeşitli laboratuvar ve tarla testlerinin uygulanmasıyla, yabancı gen geçişleri ve geçen genin işlerliği, bir başka deyişle, bitkinin transgenik olup olmadığı belirlenerek transgenik olanların üretim çalışmalarına başlanır.



BİLGİ PAYLAŞIMI İÇİN DEĞERLİDİR. DR. MEHMET KARACA

Çizelge 1. Bitki Biyoteknolojisinin Gelişmesinde Önemli Aşamalar

Dönem	Önemli Gelişmeler
1700'lü yıllar	Doğabilimcilerin melez bitkileri diğerlerinden ayırdetmesi
1900	Mendel'in, özel karakterlerin anaçlarından döllerine geçtiğini belirlemesi ve bu nedenle gen kavramının gelişmesi
1922	Avrupalı botanikçilerin Mendel Kuralları'ndan yararlanarak melez bitki üretimini geliştirmeleri
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi ile modern genetik araştırmalarının başlaması
1970	Gelişmekte olan ülkelerde melez tohumların üretimde kullanılması
1973	Bakteriyel genlerin genetik mühendisliği teknikleri ile kullanılmaya başlanması
1983	Antibiyotiğe dayanıklı ilk transgenik tütün bitkisinin elde edilmesi
1985	Virüs, bakteri ve böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin tarla denemelerinin
1986	Herbisite dayanıklı transgenik tütün bitkisine ABD'de üretim izninin verilmesi
1990	Herbisite dayanıklı transgenik pamuk bitkisinde ilk başarılı tarla denemesinin yapılması
1992	ABD Tarım Bakanlığı'nın transgenik gıdaların, klasikler gibi, denetlenmesine karar vermesi.
1994	İlk transgenik domates çeşitinin tüketicilere satışına başlanması
1995	Herbisite dayanıklı transgenik kolza ve mısır çeşitlerinin geliştirilmesi
2000	Böcek ve virüslere dayanıklı transgenik pamuk, soya, şeker pancarı, patates ve domates çeşitlerinin onaylanarak üretimlerinin başlaması
2001	A vitamini ve demir bakımından zenginleştirilmiş transgenik çeltik çeşitinin geliştirilmesi

- Uyumlu türler arasında klasik yöntemlerle yapılan melezlemelerle yeterli varyasyon sağlanabilmektedir. Ancak, yabani türlerle yapılan melezlemelerde, yeterli varyasyon için geniş bir populasyona gereksinim duyulmaktadır. Böyle bir populasyondan ise, kısırlık ve bozulan karakterlerin düzeltilmesi için, uzun yıllar süren gerimelezlemeler sonunda yeni bir çeşit geliştirilebilmektedir.
- Aralarında melezleme yapılabilen türlerin azlığı, melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyenlerin de döllere geçişinin engellenememesi, istenmeyen karakterlerin gerimelezleme yoluyla elimine edilmesinin çok uzun zaman alması gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarını oluşturmaktadır.

YARARLANMA OLANAKLARI



TRANSGENİK BİTKİLERDE

- VERİMLİLİĞİN DOLAYLI YOLDAN ARTIRILMASI
  - ACETOLACTATE SYNTHASE GENİNİN AKTARILMASIYLA HERBİSİT SULFONYLLUREA' DAYANIKLILIK
  - 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE GENİNİN AKTARIMI İLE GLYPHOSATE DAYANIKLILIK
    - PESTİSİT KULLANIMINDA AZALMA
    - *Bacillus thuringiensis*, özellikle Lepidoptera familyasından böceklerin sindirim sistemlerine zarar vererek ölümlerine neden olan bir protein üretmektedir. Bu genin B. thuringiensis'ten izole edilerek domates, tütün, pamuk ve mısır bitkilerine aktarılması sonucunda böceklere karşı dayanıklılık sağlanmıştır. Bt geninin aktarılmasıyla bitkilere kazandırılan zararlılara dayanıklılık özelliğinin, zararlıları kontrol altına almak için kullanılan kimyasal madde gereksinimini azaltacağı varsayımına dayanmaktadır.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR! DR. MEHMET KARACA

TOPRAK VE SUYUN KORUNMASI

- Transgenik çeşitlerin tarımı ile yabancı ot ve zararlı savaşında geleneksel yöntemlere bağlılık azaltılabilmekte, daha az toprak işleme nedeniyle, toprak yapısı ve nemi korunabilmektedir. Tarımsal ilaçlamayı azaltan transgenik çeşitlerin kullanılmasıyla toprak ve yeraltı sularının kimyasal maddelerle kirlenmesinin önlenmesi hedeflenmektedir.

KİRLİ TOPRAKLARIN TEMİZLENMESİ

- Bitki ya da mikroorganizmalarda yapılacak değişikliklerle toksik ağır metallerin kirlettiği topraklar, tortular ve yüzey suları temizlenebilmekte ya da daha az toksik hale dönüştürülebilmektedir. Transgenik bitkilerin de bu amaçla kullanılması planlanmakta olup, henüz uygulama aşamasına gelinememiştir.

ÜRÜN KALITESINI ARTIRMA

Ürün kalitesini artırma çalışmalarında ise, son yıllarda önemli başarılar elde edilmiş olup, yüksek proteinli soya; A vitamini artırılmış çeltik (altın çeltik); nişasta ve aminoasit içeriği artırılmış patates; oleik asit oranı yüksek, linolenik asit oranı düşük ayçiçeği, soya ve yerfıstığı çeşitleri ile sabun ve deterjan yapımı için daha ucuz hammadde sağlayan yüksek laurate asitli kanola çeşidi tarıma kazandırılmıştır.

Sebze ve meyvelerde raf ömrünün uzatılması özellikle domateste başarılmış olup, benzer çalışmalar halen çeşitli meyvelerde sürdürülmektedir. Genetik mühendisliği yoluyla, yüksek besin değerine sahip yem bitkilerinin ve sık rastlanan bazı hastalıklara karşı insan ve hayvanlarda aşı etkisi gösterebilecek bitkilerin geliştirilmesi üzerine de çalışmalar sürdürülmektedir.

Günümüze kadar yaklaşık 15 türde 100'den fazla transgenik çeşit elde edilerek ticari olarak üretilmeye başlanmıştır.

TRANSGENİK ÇEŞİTLER

Şeker pancarı (*Beta vulgaris)*

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A. tumefaciens Glyphosate herbisitine tolerans	EPSPS *Agrobacterium tumefaciens*
A. tumefaciens PPT herbisitine tolerans	PAT *Streptomyces viridochromogenes*

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Kanola (*Brassica napus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A tumefaciens Laurate, yağ asidi ve mysistic asit üretimi	Thioesterase *Umbellularia californica*
A. tumefaciens PPT herbisitine tolerans	PAT *Streptomyces viridochromogenes*
A.tumefaciens - PPT herbisitine tolerans, erkek kısırlık, fertilitenin sağlanması	barnase, barstar *Bacillus amyloliquefaciens* PAT - *Streptomyces hygroscopicus*
A. tumefaciens - Oxynil herbisit toleransı	Nitrilace - *Klebsiella pneumoniae*
A. tumefaciens Glyphosate herbisitine tolerans	EPSPS, *Agrobacterium tumefaciens,* Glyphosate oxidase, *Ochrobactrum anthropi*

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT

Papaya (*Carica papaya*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
Partikül bombardımanı Virüs enfeksiyonuna dayanım	**CP Bitki virüsü**

CP=coat protein (**papaya** ringspot virus PRSV

Hindiba (*Chichorium intybus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A. tumefaciens Erkek kısırlık, PPT herbisitine tolerans	barnase - *Bacillus amyloliquefaciens* PAT - *Streptomyces hygroscopicus*

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT

Kabak (*Cucurbita pepo*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A. tumefaciens Virüs enfeksiyonuna dayanım	CP Bitki virüsü

CP=coat protein (**papaya** ringspot virus PRSV)

Karanfil (*Dianthus caryophyllus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A. tumefaciens - Uzun raf ömrü, Sulfonylurea herbisit tolernsı	ACC, ALS - Tütün
A. tumefaciens - Farklı çiçek rengi, Sulfonylurea herbisit toleransı	Antosiyanin geni, ALS – Tütün

- ACC: Aminocyclopropane Cyclase Synthase
- ALS: Acetolactate Synthase

Soya (*Glycine max* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
Partikül bombardımanı - PPT herbisitine tolerans	PAT - *Streptomyces viridochromogenes* ve diğer bir çeşite EPSPS - *Agrobacterium tumefaciens*
Partikül bombardımanı - Yüksek yağ asidi ve oleik asit	GmFad2-1 - Soya

Keten (*Linum usitatissimum* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A.tumefaciens - Sulfonylurea herbisit toleransı	ALS - *A. thaliana*

- PAT: phosphinothricin N acetyltransferase
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- GmFad2-1: delta-12 desaturase
- ALS: acetolactate synthase (ALS)

Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
A. tumefaciens - Sulfonylurea herbisit toleransı	ALS
A. tumefaciens - Zararlı dayanıklılığı, Oxynil herbisit toleransı	*cry1Ac - Bacillus thuringiensis* Nitrilase - *Klebsiella pneumoniae*
A. tumefaciens bromoxynil dayanıklılık herbisit	*Nitrilase enzyme,* (BXN), *Klebsiella pneumoniae*
A. tumefaciens - Glyphosate herbisitine tolerans	*EPSPS - Agrobacterium tumefaciens*

- BXN: bromoxynil-degrading nitrilase
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- GmFad2-1: delta-12 desaturase
- ALS: Acetolactate Synthase

Rapörter Genler (Reporter Genes)

- **Rapöter genler nükleik asitlerden oluşan genler olup oluşturdukları proteinlerin varlığı kolayca analiz edilerek belirlenebilir.**

- **CAT (chloramphenicol acetyltransferase)**
- **GAL (b-galactosidase)**
- **GUS (b-glucuronidase)**
- **LUC (luciferase)**
- **GFP (green fluorescent protein)**

BİLGİSAYAR TEKNİKERİ DOÇ. DR. MEHMET KARACA