

BİTKİ ISLAHINA MOLEKÜLER YAKLAŞIM

Kavram ve Kapsam

Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA'nın yapısını açıklamasıyla başlayan moleküler biyoloji çalışmaları, özellikle 1990 yılından sonra büyük gelişmeler göstermiş ve transgenik bitkilerin üretilmeye başladığı 1996 yılından sonra ise ticari bir boyut kazanmıştır.

Günümüzde ulaşılan tarımsal verim artışı, modern ıslah yöntemlerinin uygun yetiştirme teknikleri ile birlikte kullanılması ile sağlanmıştır. 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, genetik çeşitlilikle sınırlı kalınması 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 popülasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılı olduğundan, popülasyonda var olan çeşitliliğin daha da artırılması gerekmektedir. Melezleme ile aktarılan genin özelliklerinin bitkilerde fenotipik olarak gözlenebilmesi için, Mendel Açılımları'nın belirlediği çok sayıda bitkiden oluşan melez popülasyona gereksinim vardır. Uyumlu türler arasında klasik yöntemlerle yapılan melezlemelerle yeterli varyasyon sağlanabilmektedir.

Ancak, yabancı türlerle yapılan melezlemelerde, yeterli varyasyon için geniş bir popülasyona gereksinim duyulmaktadır. Böyle bir popülasyondan ise, kısırlık ve bozulan özelliklerin düzeltilmesi için, uzun yıllar süren geri melezlemeler sonunda yeni bir çeşit geliştirilebilmektedir. Aralarında melezleme yapılabilen türlerin azlığı, melezlemelerde istenen özelliklerle birlikte istenmeyenlerin de döllere geçişinin engellenememesi, istenmeyen özelliklerin geri melezleme yoluyla giderilmesinin çok uzun zaman alması gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarını oluşturmaktadır.

Günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni moleküler ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu 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 yabancı gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan doğal izolasyon, bir başka deyişle, kısırlık ve uyumsuzluk sorunu da çözülmektedir.

Modern biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla, klasik ıslahta farklı cinsler arası gen aktarımında ikinci büyük engel olan, bağıllık (linkage) nedeniyle istenen genlerle birlikte istenmeyen genlerin de mezlere 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 bağılı kalınmaması da önemli bir olanak sağlamaktadır (Simmonds, 1983; Philips ve Eberhart, 1993). Bu nedenlerle, gelecekte yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerden önemli ölçüde yararlanılması beklenmektedir.

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 uygulamalar" olarak tanımlanmaktadır.

Hızlandırılmış Partiküllerle (Partikül Bombardımanı, Biyolistik) Gen Aktarımı:

Bu yöntemle bitkinin tüm doku ve hücrelerine gen aktarılabilir. Hızlandırılmış partiküllerden yararlanarak tek çenekli bitkilere kolaylıkla gen aktarılabilirdiği gibi, Agrobacterium ya da diğer yöntemlerle gen aktarımının çok zor olduğu bitkilere de uygulanabilmektedir. Son yıllardaki gelişmeler, hemen hemen tüm doku ve hücre tiplerine biyolistik yöntemlerle gen aktarımının mümkün olabileceğini göstermektedir. Nitekim, soya (McCabe ve ark., 1988), pamuk (Finer ve ark., 1990) ve orman ağaçları (Ellis ve ark., 1993) gibi birbirinden çok farklı bir çok bitkiye bu tekniğin uygulanmasının yanında; Yaldez ve ark. (1998) çeltik, Gordon-Kamm ve ark. (1990) mısır, Torbert ve ark. (1998) ise yulaf gibi ekonomik önemi yüksek olan ve bakteri aracılığı gen aktarılamayan monokotiledon bitkilere de başarıyla gen aktararak transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Buğdayda ise çalışmalar özellikle son yıllarda önemli gelişmeler göstermiş ve bu yöntemle aktarılmış genleri taşıyan transgenik bitkiler üretim aşamasına gelmiştir (Vasil ve ark., 1993; Nehra ve ark., 1994; Bommineni ve ark. 1997; Takumi ve Shimada, 1997).

Bombardıman, doğrudan eksplantlara yapılabildiği gibi, kalluslar ya da kallus süspansiyon kültürleri de hedef olarak kullanılabilir. Monokotiledonlarda eksplant olarak genellikle olgunlaşmamış embriyo, yaprak ve çiçekler; apikal meristem, olgunlaşmış embriyo ve tohum kullanılmaktadır (Klein ve ark., 1990). Buğdayda ise genellikle kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyonunda çok başarılı olan olgunlaşmamış embriyolar (Vasil ve ark., 1993; Nehra ve ark., 1994; Becker ve ark., 1994) ile yine bu embriyolardan elde edilmiş kalluslar (Perl ve ark., 1992) hedef olarak kullanılmaktadır.

Parçacıkların hızlandırılmasında önceleri barut ya da yüksek elektrik akımı kullanılırken, son yıllarda sıkıştırılmış helyum gazından yararlanılmaktadır. Parçacık hızının, sürtünme nedeniyle azalmasının önlenmesi için, işlem vakum altında yapılmaktadır. Bu yöntemin temel amacı; DNA taşıyan 1-2 μ çapındaki altın ya da tungsten parçacıklarına, basınç altındaki helyum gazından yararlanılarak, yüksek hız kazandırıp, bitki hücrelerine girmelerinin sağlanmasıdır. Parçacıklarla birlikte hücre içerisine giren DNA'lar bitki genomuyla birleşmektedir (Klein ve ark., 1987; McCabe ve ark., 1988).

Bu sistemin temel öğelerini, üzerine DNA bağlanan altın ya da tungsten parçacıkları (mikro-taşıyıcılar); ön yüzünde DNA kaplanmış mikroprojektileri taşıyabilen, arka yüzü barut patlaması ya da sıkıştırılmış gaz şokuna dayanabilen plastik yapısında maddeler (makro-taşıyıcılar); makro-taşıyıcıların yerleştirildiği delikli metaller (makro-taşıyıcı tutucuları); düzgün yayılmayı sağlayan ince delikli metaller (koruyucu perde) ve belli basınçlarda patlamayı sağlayan, değişik kalınlıklarda hazırlanmış plastik benzeri maddeler (kırılıcı diskler) oluşturmaktadır. Bu yöntemde eksplant olarak yaprak, embriyo, sürgün ucu gibi organlar, kültüre alınmış hücreler, polen ve mikrosporlar kullanılmaktadır (Klein ve ark., 1990).

Cihazın Geliştirilmesi



PDS-1000/He cihazı

İlk çalışmalar

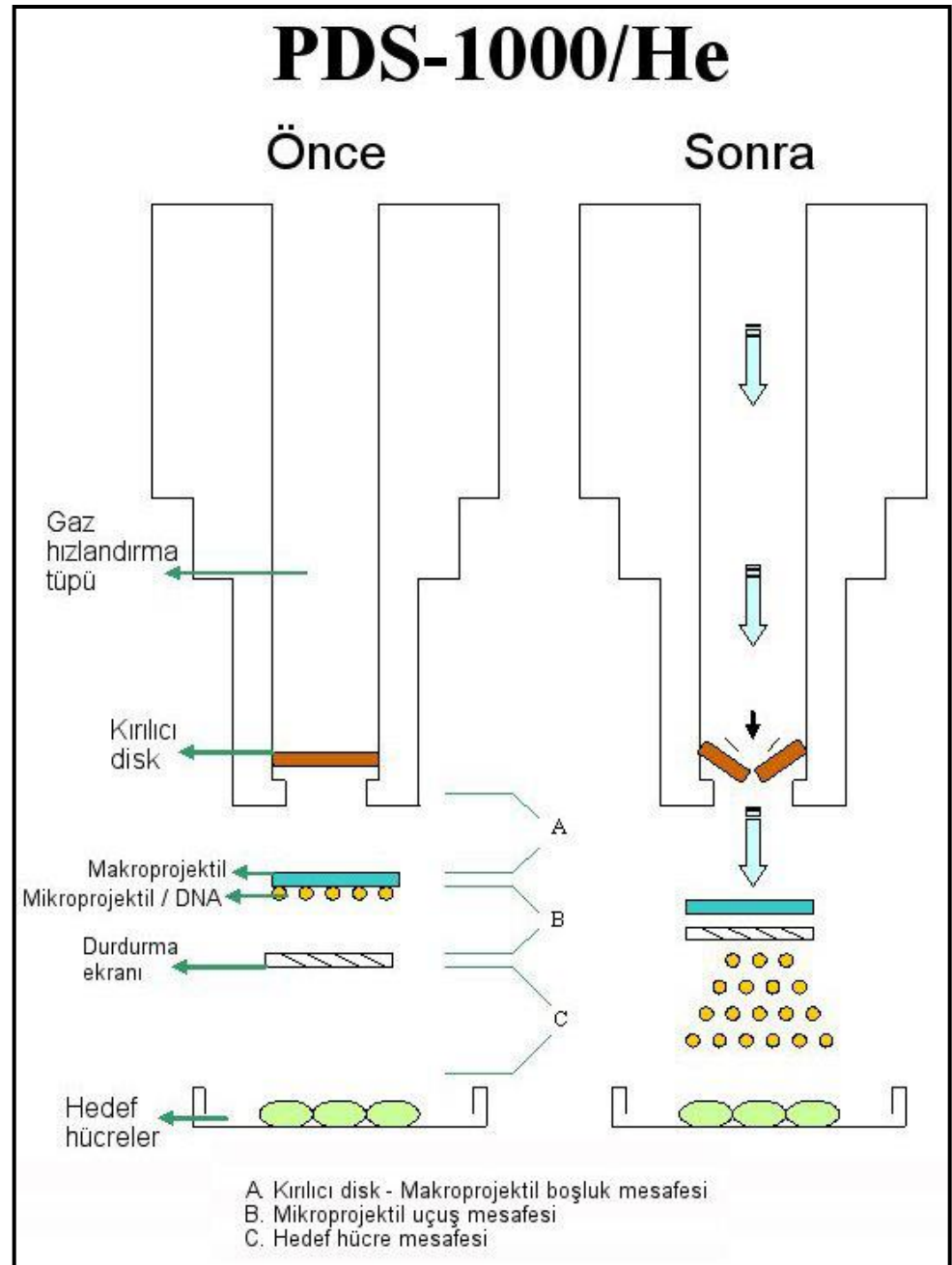
Sanford ve ark.(1984)
tarafından
hava akımı ile $4\mu\text{m}$
çapında tungsten
partiküllerinin
soğan epidermal
hücrelerine
bombardımanı
şeklinde
gerçekleştirilmiştir.

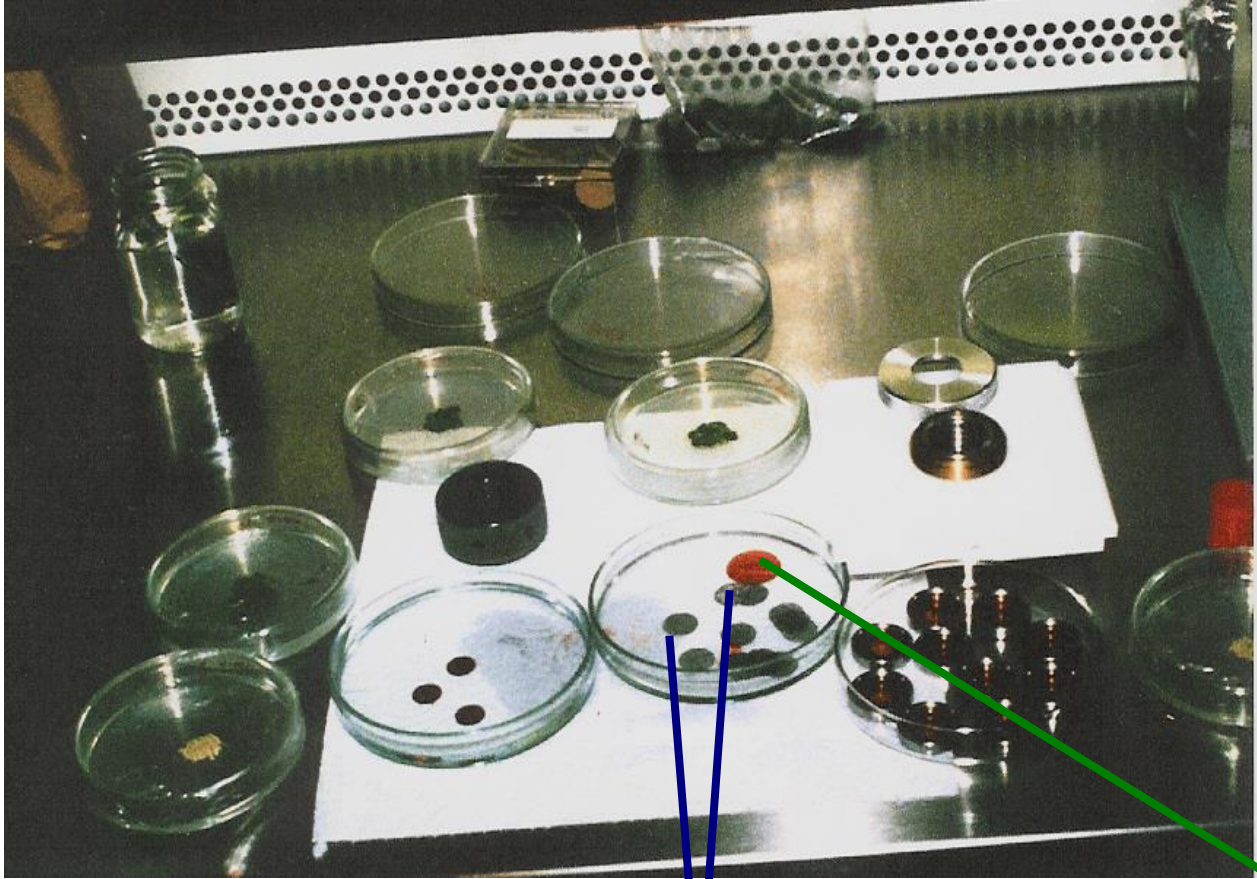


El tipi partikül bombardımanı cihazı

TERMİNOLOJİ

Mikroprojektil
Makroprojektil
Koruyucu elekler
Kırılıcı diskler
İşaret/Raportör gen
Plazmid vektörü
Geçici gen ifadesi analizi
'Southern Blot' analizi
'Northern Blot' analizi
'Western Blot' analizi



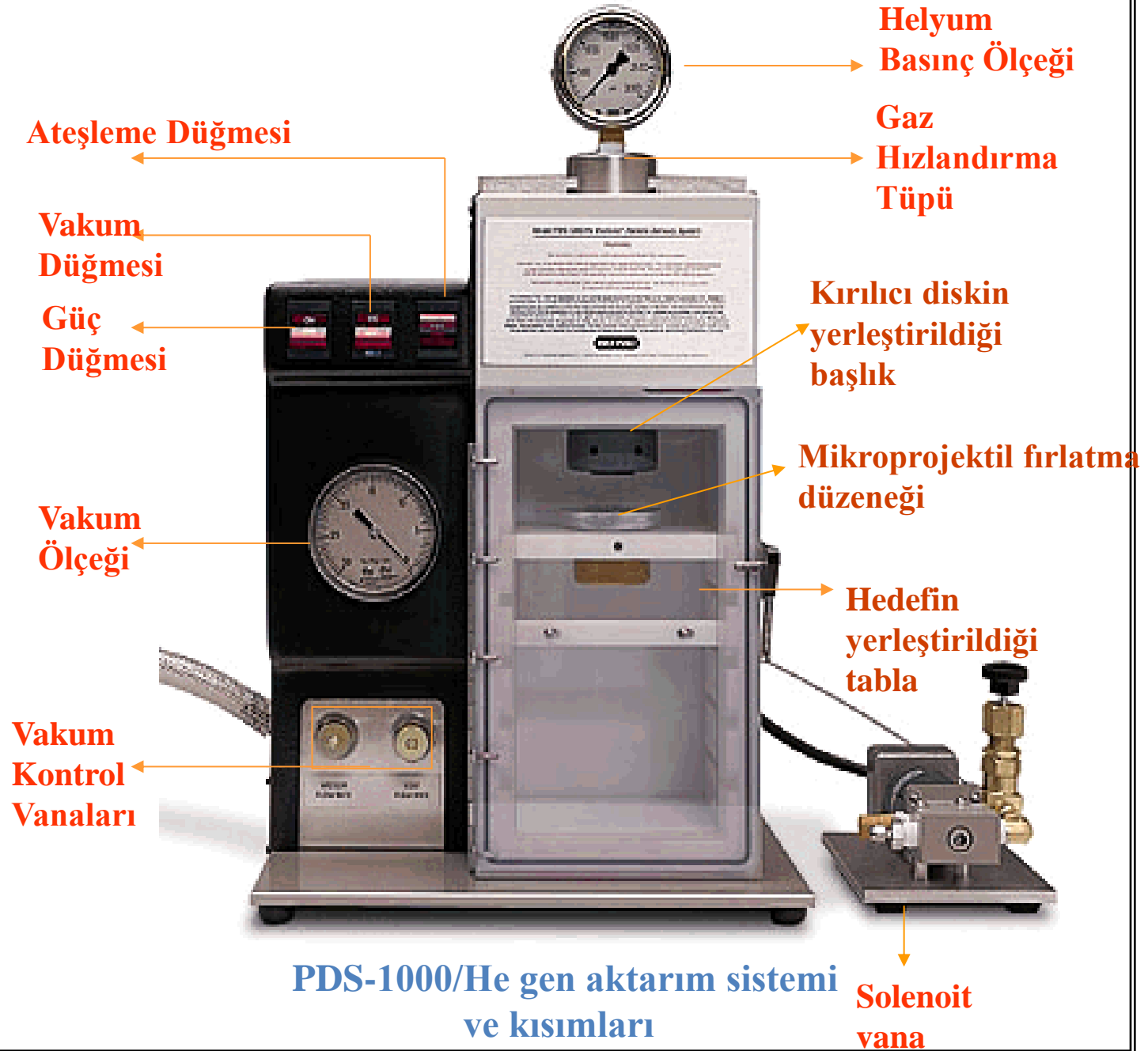


Koruyucu elekler

Makroprojektil

Metal disk



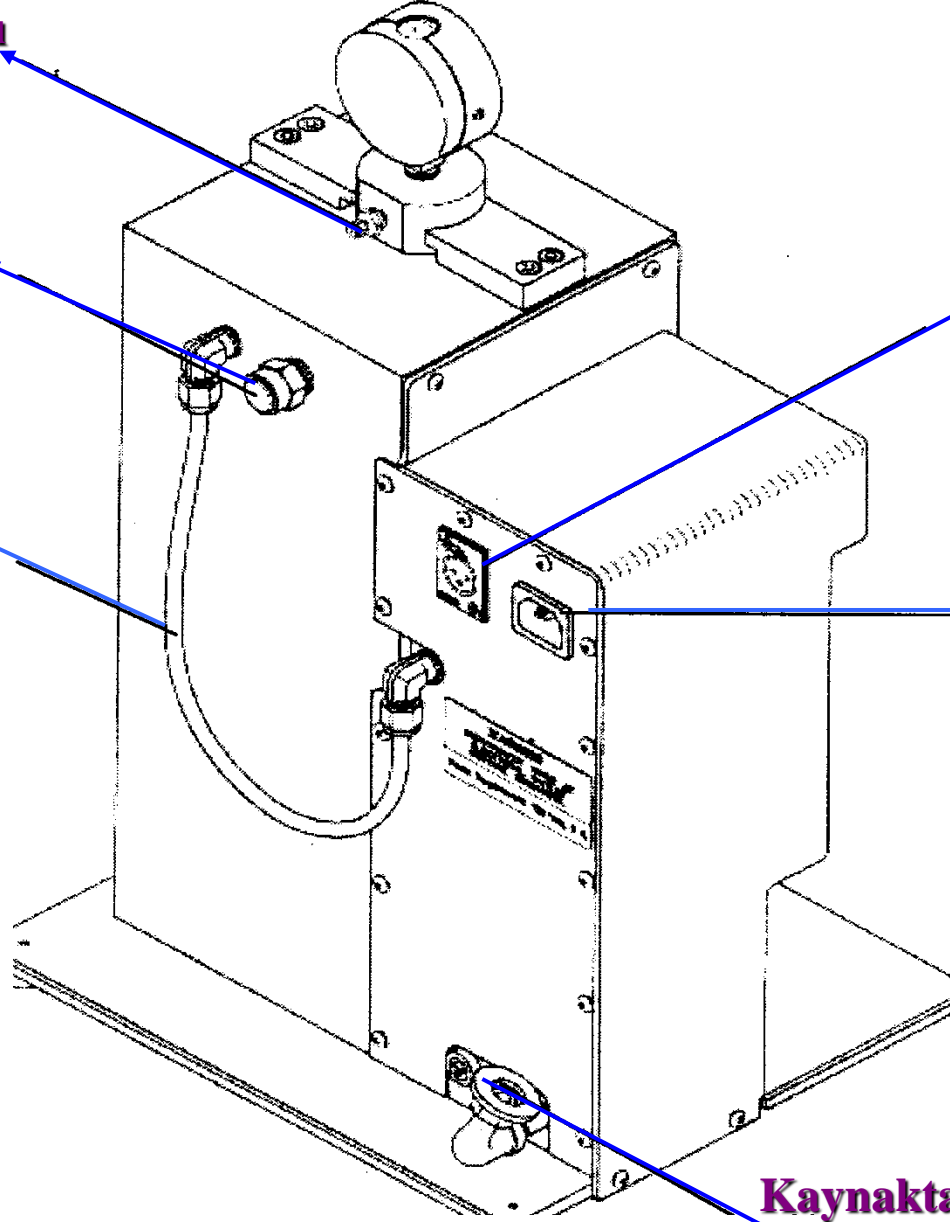


Arka Dış Bağlantılar

Helyum bağlantısı

Emniyet subabı

Kontr olden vakum bağlantısı



Helyum-Solenoid Vana Elektrik bağlantısı

Elektirik Bağlantı prizi

Kaynaktan Vakum bağlantısı

CİHAZIN KALİBRASYONU

CİHAZIN YAPISI

- *masa tipi
- * el tipi

GÜÇ KAYNAĞI

- *barutlu sistem
- *elektrikli sistem
- *He gazlı sistem

FİZİKSEL PARAMETRELER

KIRILICI DİSK ÖLÇÜLERİ

- *450 - 2.200
psi

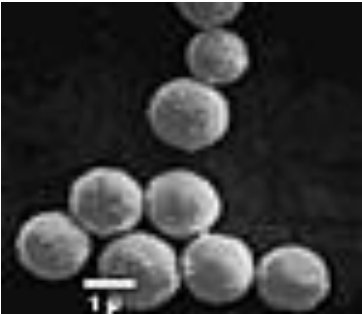
HIZ BELİRLEYİCİ ETMENLER

- *gaz basıncı
- *eksplant uzaklığı
- *vakum

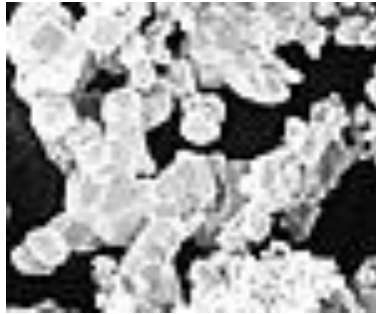
KİMYASAL PARAMETRELER

MİKROTAŞIYICI TİPİ ve ÇAPI

altın



tungsten



MİKROTAŞIYICI-DNA İLİŞKİLERİ

*Mikrotaşıyıcıların yıkanması

*stok hazırlığı

*CaCl – spermidin çöktürülmesi

HÜCRE BÜYÜKLÜĞÜ

PARTİKÜL TOKSİSİTESİ

VEKTÖRÜN YAPISI

*işşaret/raportör
gen tasarımı

*vektörün yapısı

**BİYOLAJOJİK
PARAMETRELER**

OZMATİK
BASINÇ

HÜCRE YAŞI ve FİZYOLOJİSİ

HÜCRE YOĞUNLUĞU

Partikül Bombardmanı Yönteminin Uygulanışı

MİKROPROJEKTİLERİN HAZIRLANMASI



MİKROPROJEKTİLERİN DNA İLE KAPLANMASI



MAKROPROJEKTİLLERİN HAZIRLANMASI



CİHAZIN HAZIRLANMASI ve ATIŞIN YAPILMASI

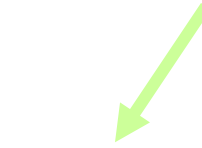


GEN GEÇİŞLERİNİN BELİLENMESİ

MAKROPROJEKTİLLERİN HAZIRLANMASI



2 CAM PETRİ

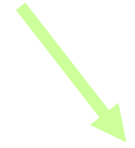


ETANOL

MAKROPROJEKTİL

KIRILICI DİSK

KORUYUCU ELEK

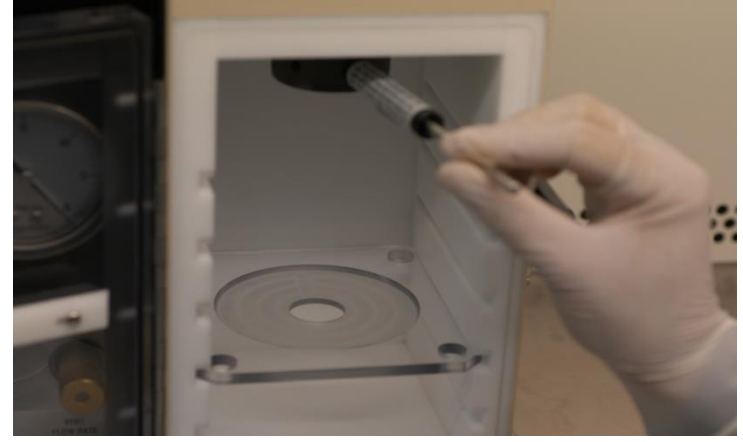
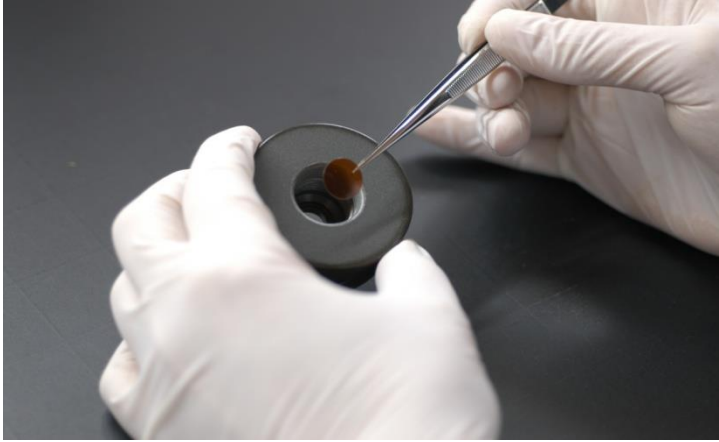


İZOPRO-PANOL

KIRILICI DİSK

MAKROPROJEKİTLERİN HAZIRLANMASI

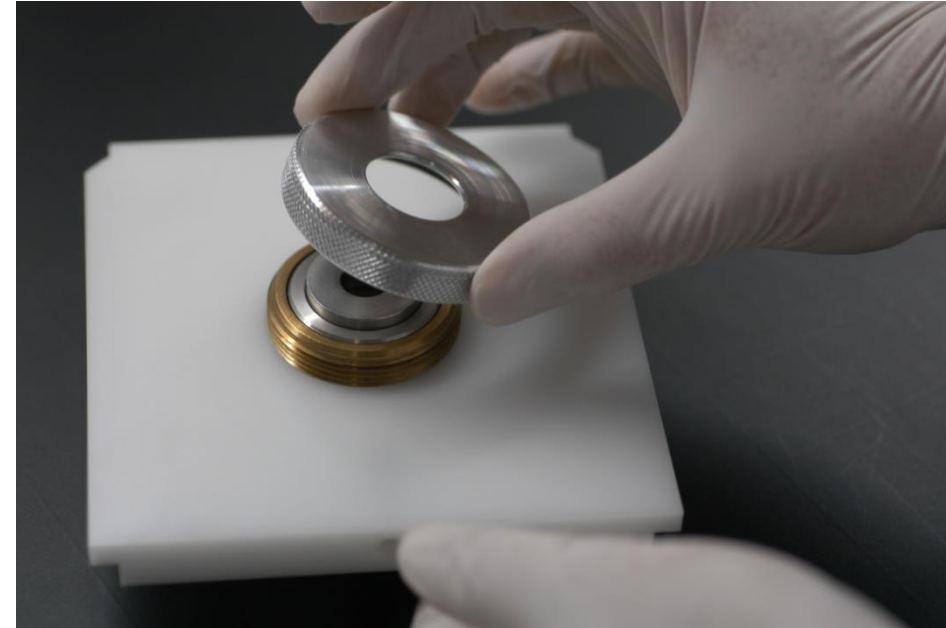
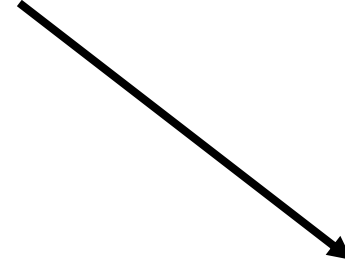
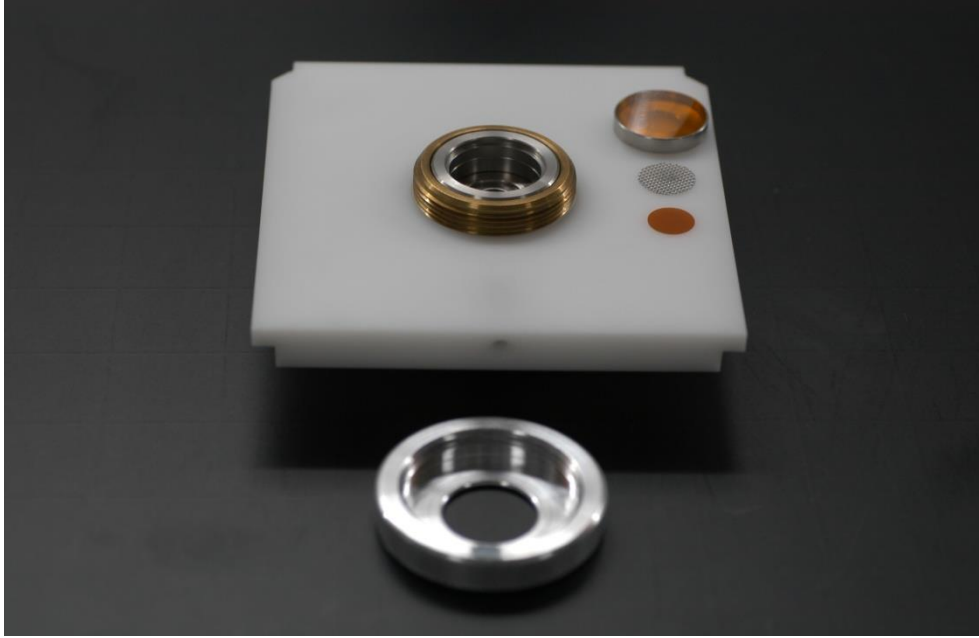
Kırılıcı disk steril pens ile izopropanol içeren petriden alınarak kağıt havlu üzerinde yavaşça kurulanıp koruma kabına yerleştirilerek özel aleti ile sabitlenir



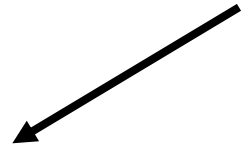
Mikroprojektil / DNA süspansiyonundan mikropipet ile belirli miktarda alınır ve makroprojektilin ortasına dağıtılır

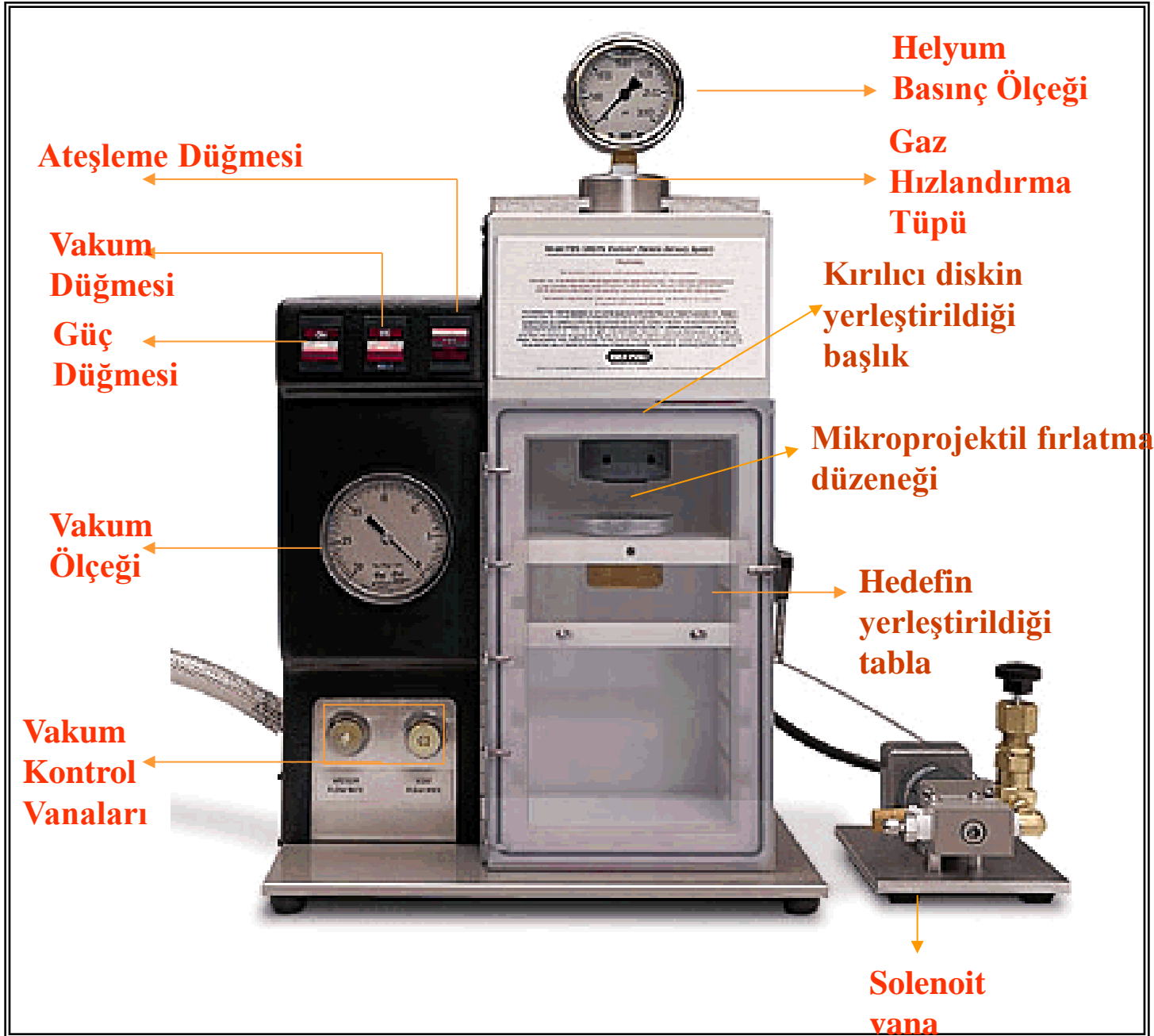
Petri kutusu içerisindeki makroprojektiler birkaç dakika vakum altında tutularak daha hızlı kurumaları sağlanır

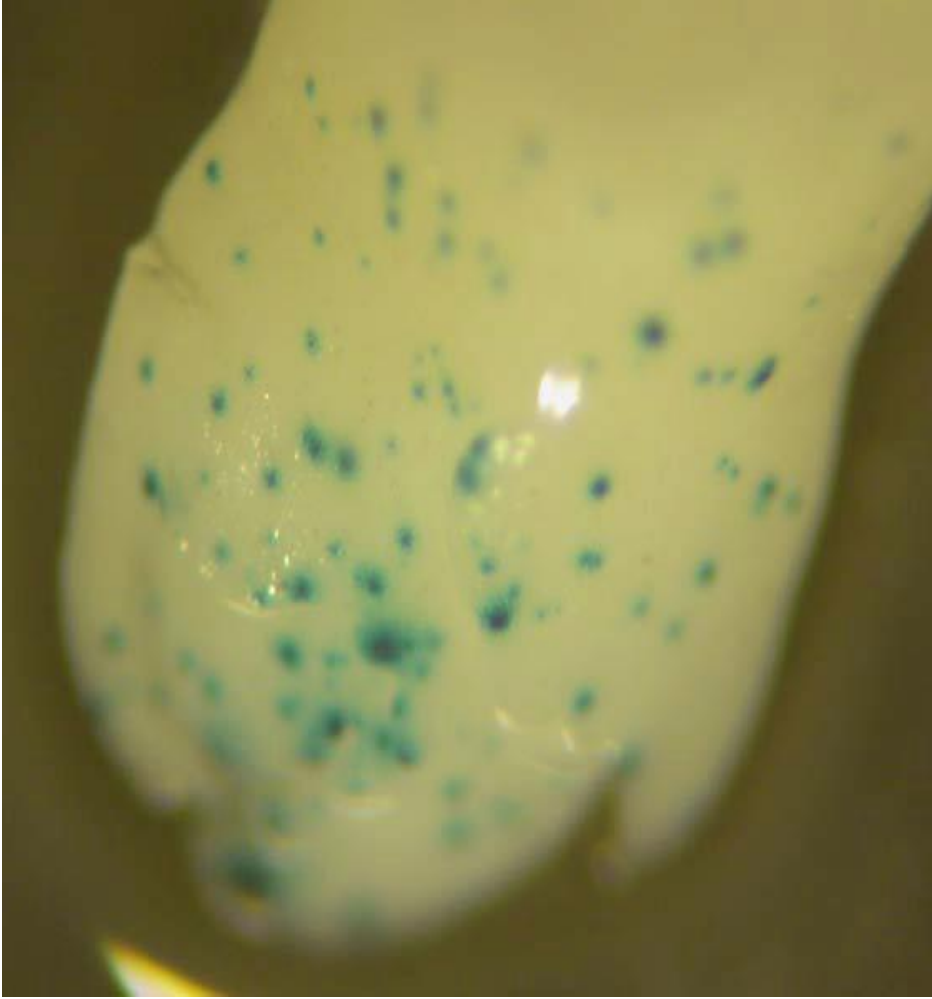
CİHAZIN HAZIRLANMASI VE ATIŞIN YAPILMASI



Mikroprojektil fırlatma
düzenegi







ATIŞ MESAFESİ : 6 cm

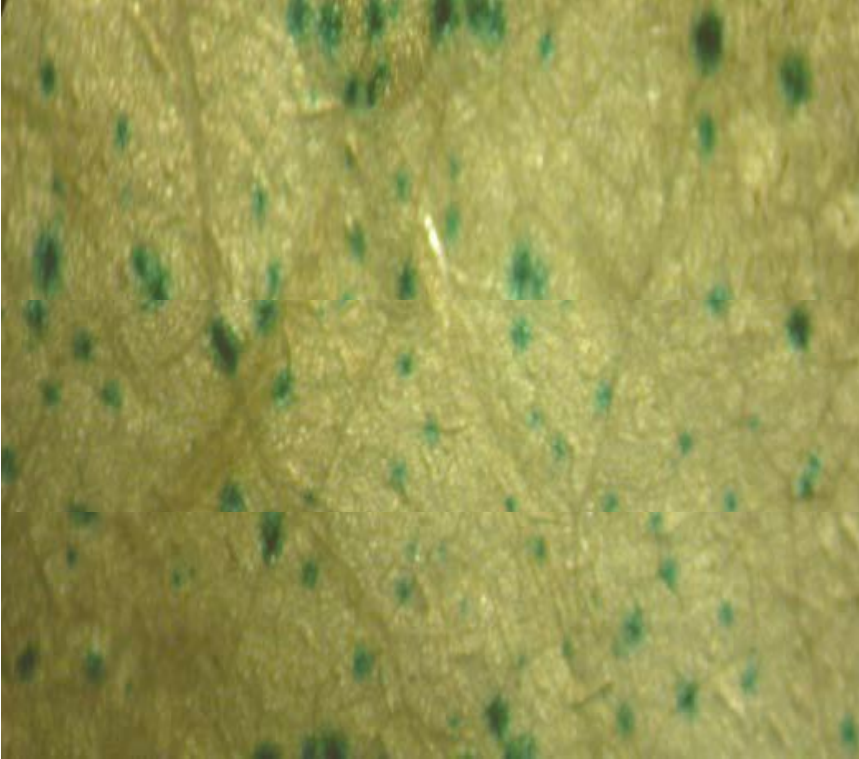
BASINÇ : 35 bar

VAKUM : 650 mm Hg

PARTİKÜL TİPİ :altın

PARTİKÜL ÇAPI: 1micron

**EKSPLANT:olgunlaşmamı
nohut embriyosu**



ATIŞ MESAFESİ : 8 cm

BASINÇ : 22 bar

VAKUM : 600 mm Hg

PARTİKÜL TİPİ:tungsten

**PARTİKÜL ÇAPI:3-5
micron**

**EKSPLANT :*in vitro*
ortamda yetiştirilmiş tütün**

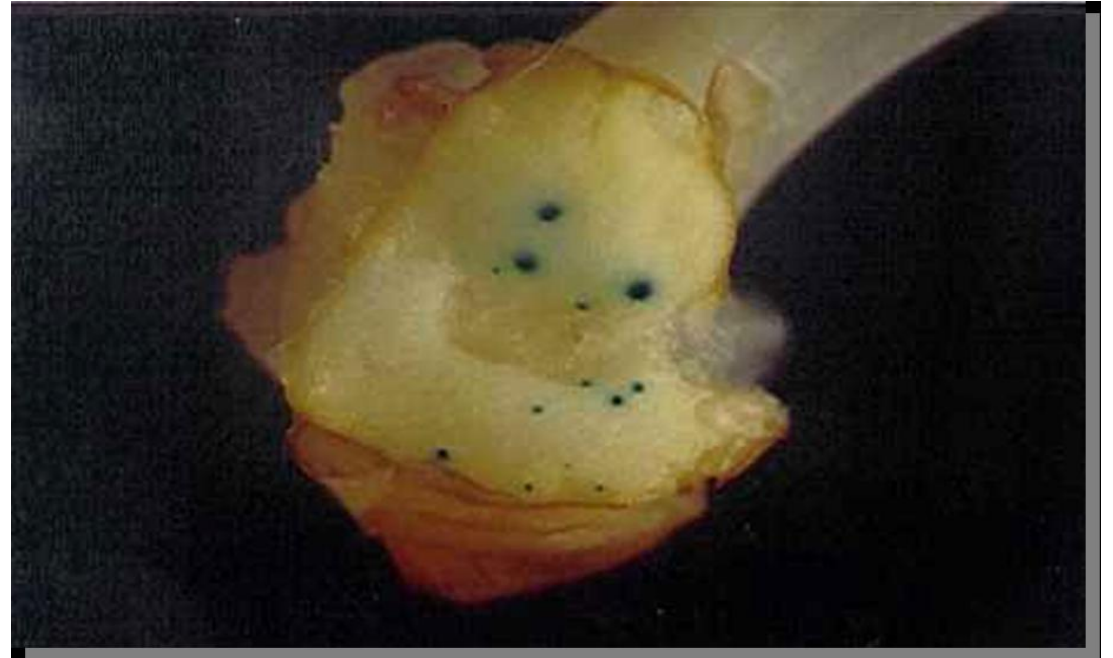
OLGUN ARPA
EMBRYOLARINA **GUS**
MARKÖR GENİ AKTARMAK
İÇİN UYGUN BASINÇ VE
MESAFENİN ARAŞTIRILDIĞI
ÇALIŞMA SONUÇLARI

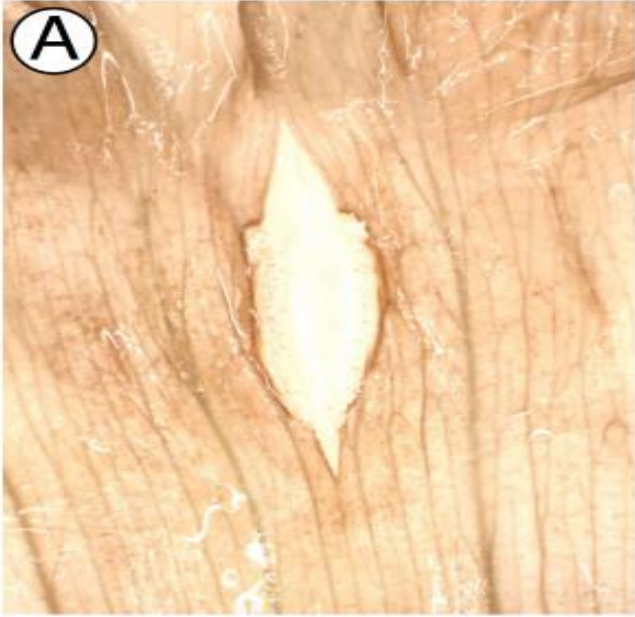


650 - 900 - 1100 psi
basınçlar
ve

6 -9 cm mesafeden

uygulanan atışlar arasında
önemli bir fark saptanmamış
ve bu aralıklar çalışma konusu
için uygun bulunmuştur





TÜTÜN
BİTKİSİNDE
(A - B - C)
ve
PETUNYA
ÇİÇEĞİNDE (D)

GUS MARKÖR
GEN İFADESİ