

BİTKİLERE GEN AKTARMA

Bitkilere, modern tekniklerden yararlanılarak, yeni özellikler kazandırmak amacıyla yapılan genetik materyal aktarmalarında bakteriler, fajlar, enzimler ve plazmidlerden yararlanılmaktadır. Bir canlıya istenilen bir özelliğin aktarılması için öncelikle o özelliği yöneten gen ya da genlerin izole edilerek saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bir genin saf olarak elde edilebilmesi için de nükleotid sırasının ya da gen ürününün bilinmesi zorunludur.

Bitkilerde kromozom izolasyonunda değişik yöntemler uygulanmaktadır (Malmberg ve Griesbach, 1983). Kromozomlar bitkilerin çeşitli dokularından elde edilebilmektedir. Bu konuda genellikle kök uçlarından, hücre kültürlerinden ve meyotik bölünme sırasındaki hücrelerden alınan protoplastlardan yararlanılmakta ve kromozom izolasyonu çalışmaları yapılmaktadır. Bu konuda tütün, patates, soğan, bezelye ve zambaklar başta gelmektedir.

BİTKİLERE GEN AKTARMA

Kalıtım materyalinin bilinçli olarak birleştirilmesi ilk kez 1972 yılında Jackson ve arkadaşları tarafından hayvansal bir virüs ile faj kromozomları arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, SV40 virüsü olan Lambda fajını birleştirmek için önce Endonukleaz-R1 enzimiyle her iki DNA'yi düz hale getirmişler, çift sarmal endonukleaz enzimi ile 5 karbon ucundan keserek tek eksen oluşturmuşlardır. Daha sonra, terminal transferaz enzimiyle çift sarmalın 3 karbon ucuna virüste adenin içeren, faj da ise timin içeren 50-100 nükleotid bağlanmıştır. Bu iki materyal karıştırılarak adenin ve timin uçları geçici olarak birleştirilmiş, Endonukleaz-III ile DNA bağlantılarındaki küçük hatalar giderilerek devamlılık sağlanmıştır.

Buna benzer uygulamalar ile farklı organizmalardan gelen iki DNA molekülünü birleştirme olanağı vardır. Bu işlemlerde enzimlerin önemi oldukça büyüktür ve farklı türlerin DNA'ları aynı enzimle kesildiği sürece birbirleriyle bağlanabilmektedir. DNA'yi belirli ve fakat farklı biçimde kesen birçok yeni endonukleaz enzimi belirlenmiştir.

Bitkilere genetik mühendisliği teknikleri ile gen aktarma

• Vektör aracılığı ile gen aktarımı

- Agrobacterium tumefaciens
- Transfeksiyon
- Plazmid
- Mikrohücre
- Lipozom
- Kromozom
- DNA
- Rekombinant DNA
- Rekombinant Retrovirüsler

• Doğrudan gen aktarımı

- Elektroporasyon
- Mikroenjeksiyon
- Partikül Bombardımanı

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

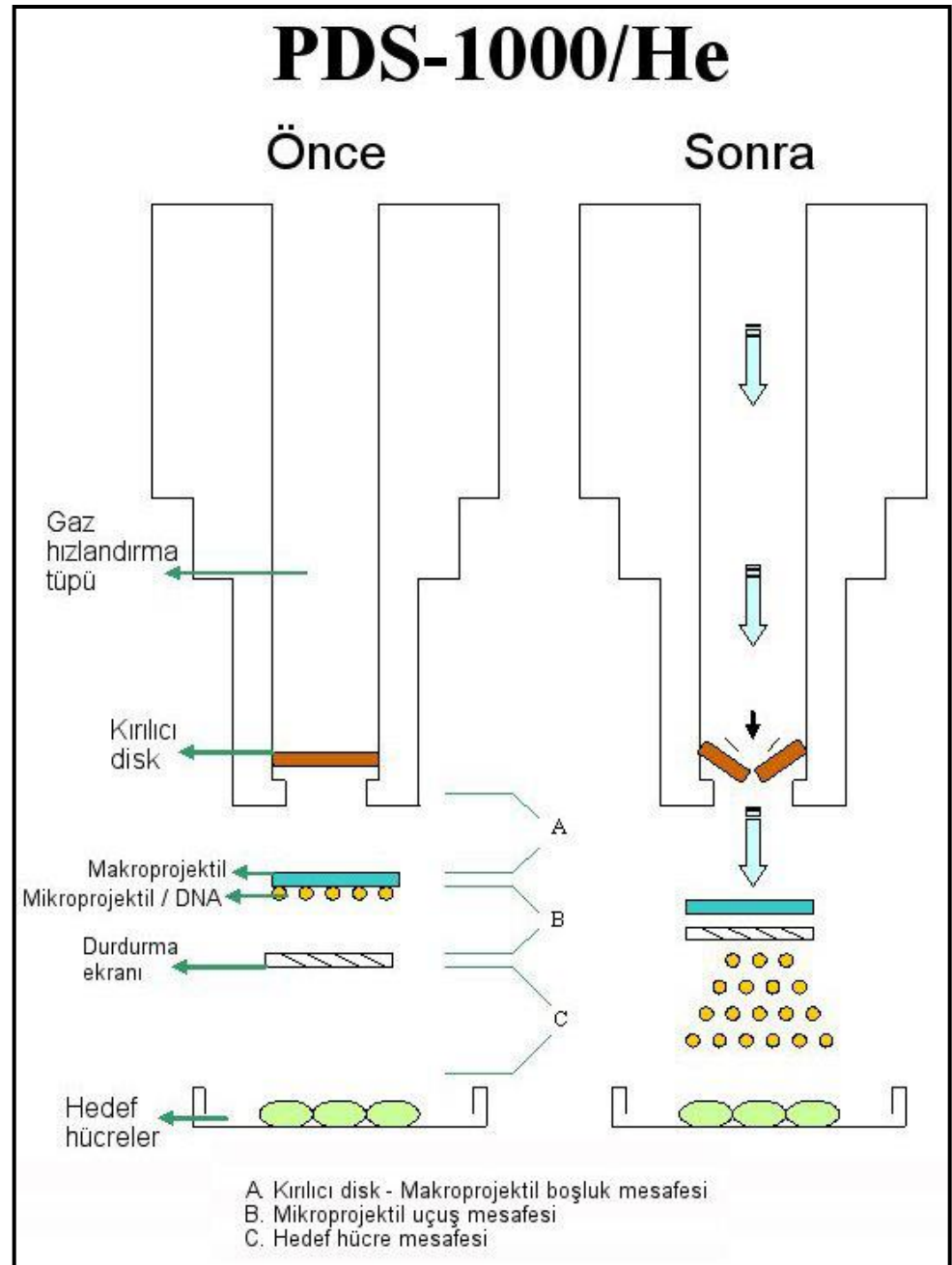
Sanford ve ark.(1984)
tarafından
hava akımı ile $4\mu\text{m}$
çapında tungsten
partiküllerinin
soğan epidermal
hücrelerine
bombardımanı
şeklinde
gerçekleştirilmiştir.

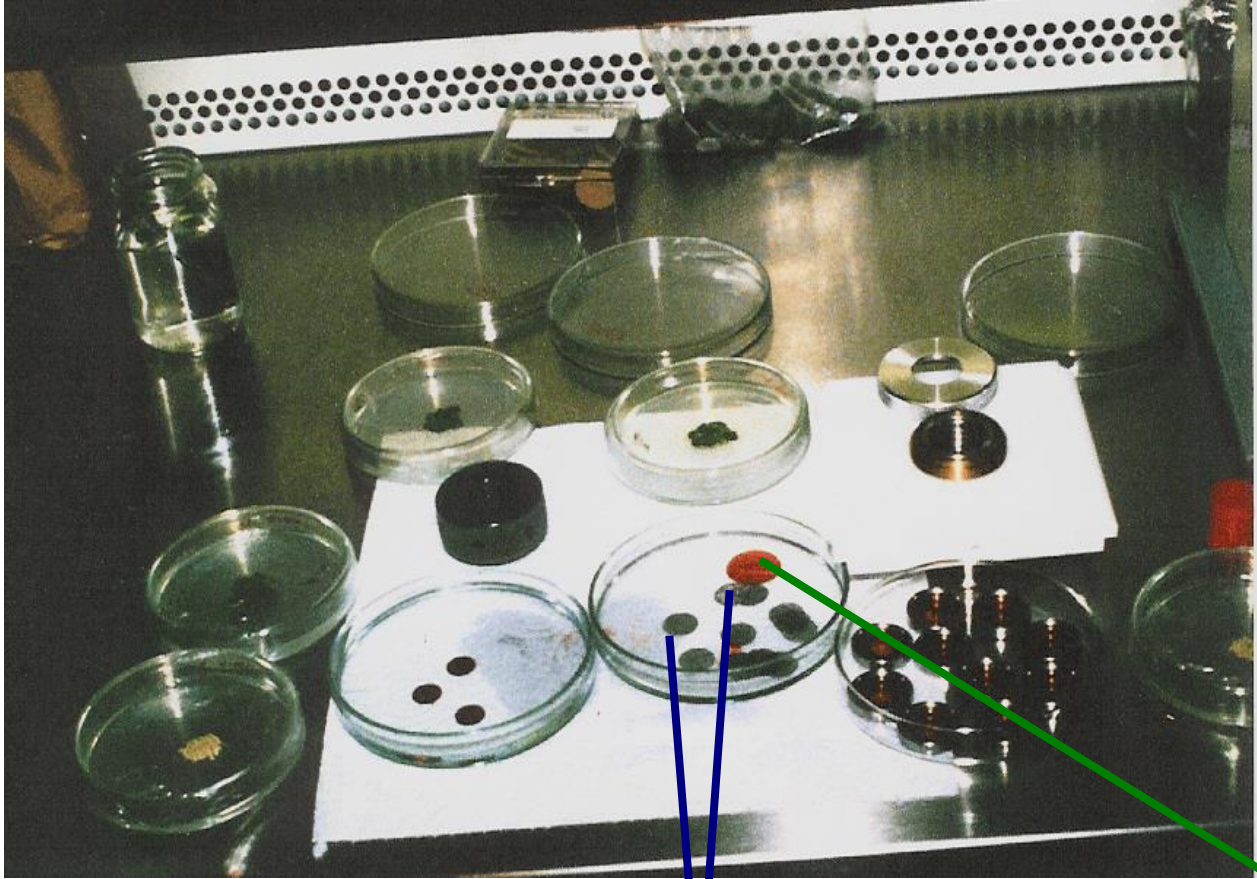


El tipi partikül bombardımanı cihazı

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



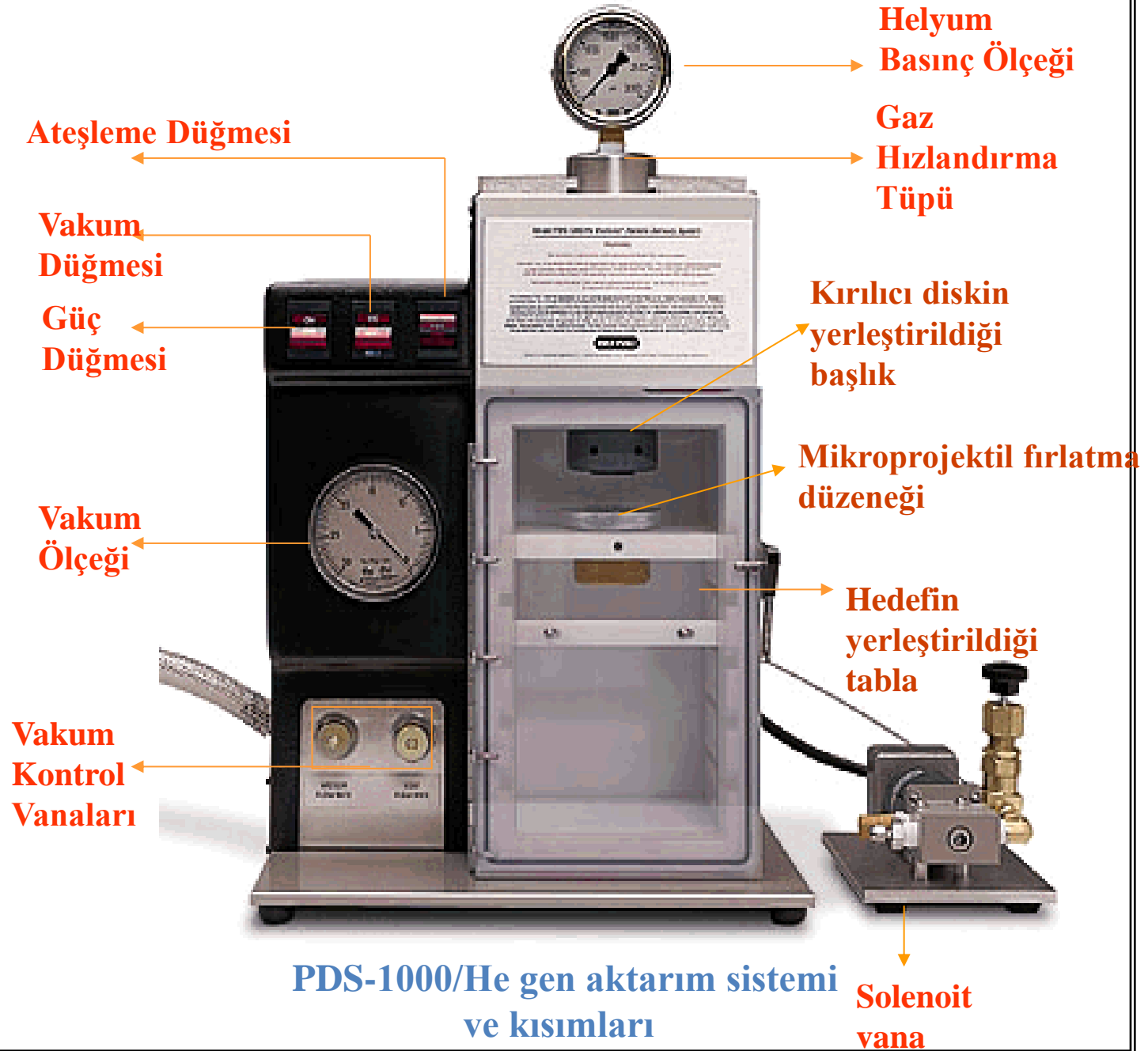


Koruyucu elekler

Makroprojektil



Metal disk

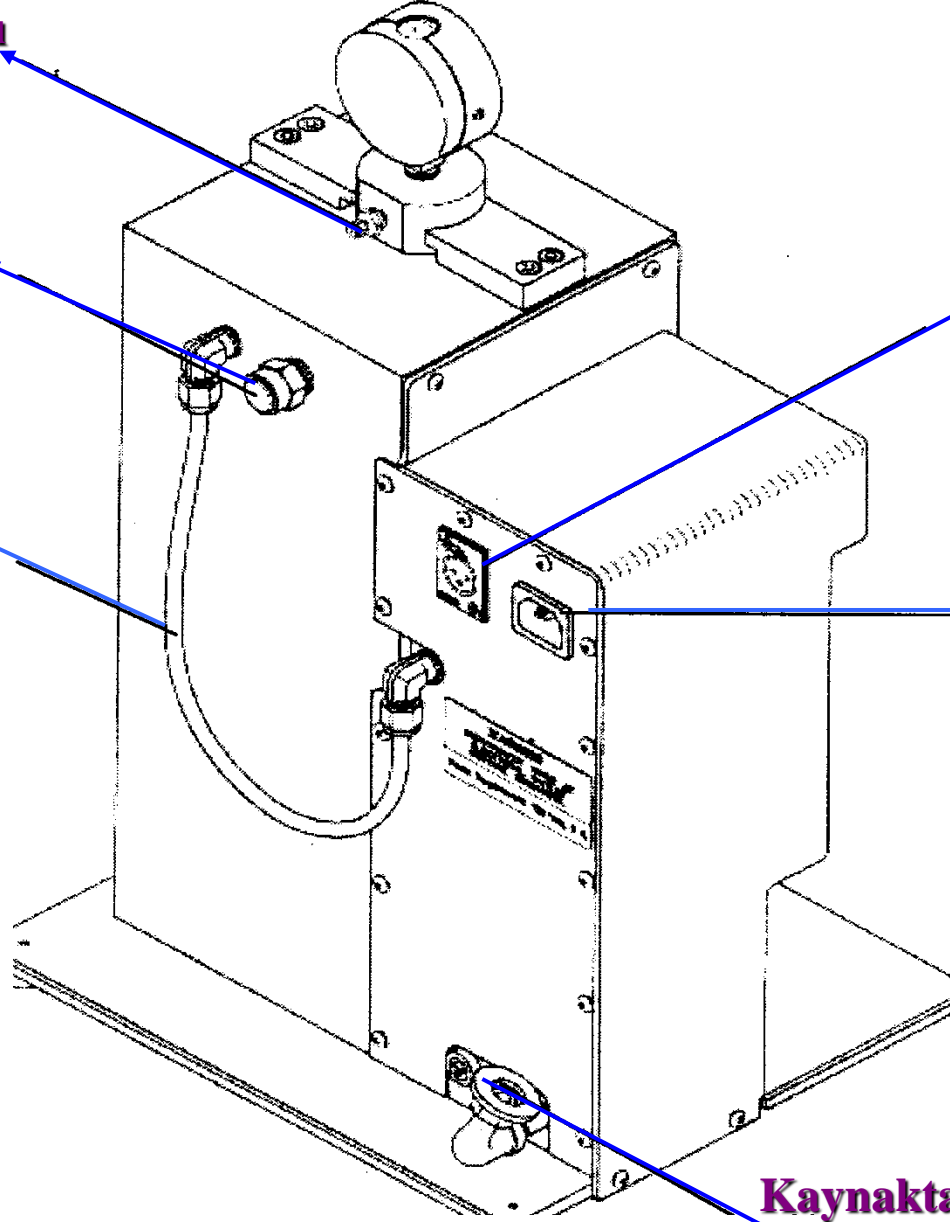


Arka Dış Bağlantılar

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

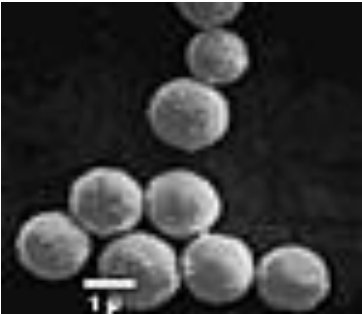
HIZ BELİRLEYİCİ ETMENLER

- *gaz basıncı
- *eksplant uzaklığı
- *vakum

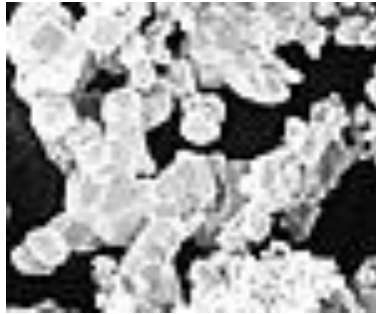
KİMYASAL PARAMETRELER

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

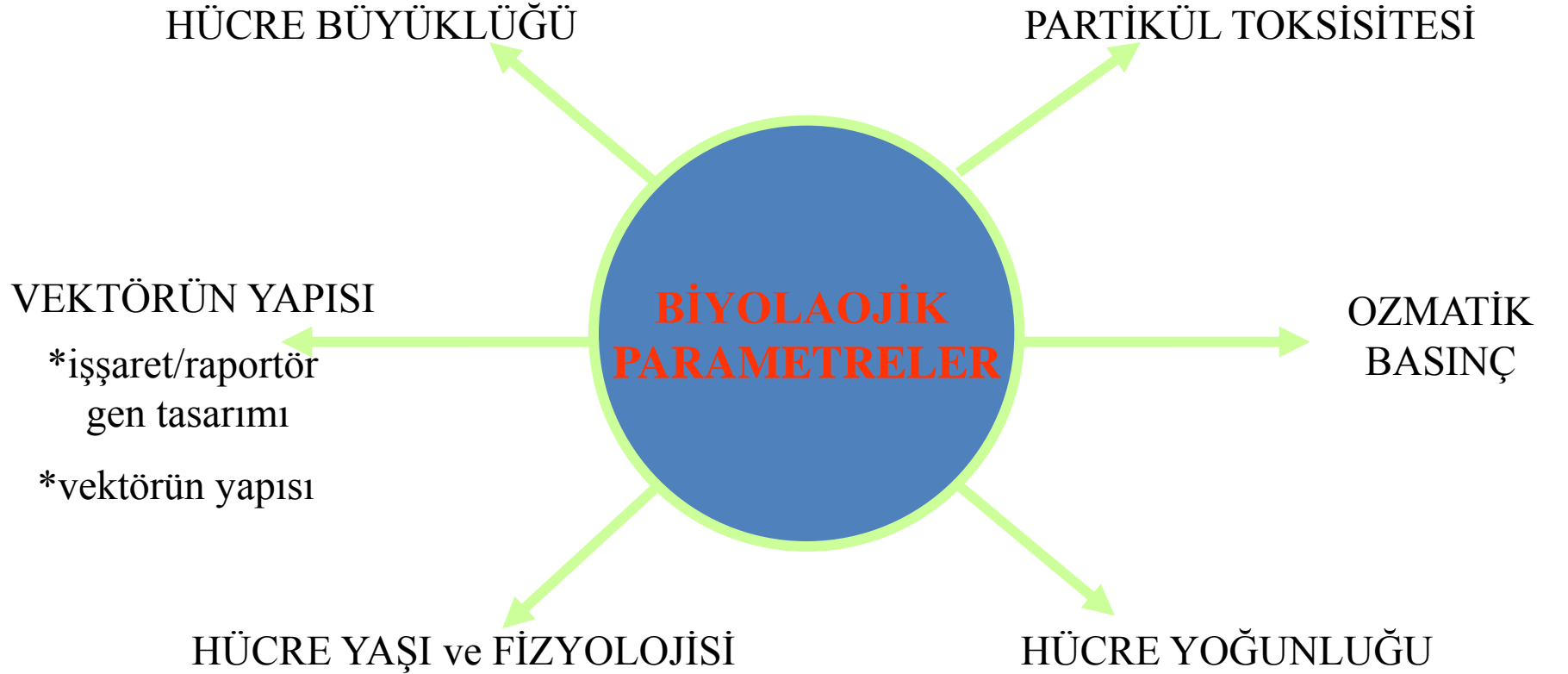
*vektörün yapısı

**BİYOLAJOJİK
PARAMETRELER**

OZMATİK
BASINÇ

HÜCRE YAŞI ve FİZYOLOJİSİ

HÜCRE YOĞUNLUĞU



Partikül Bombardımanı Yönteminin Uygulanışı

MİKROPROJEKTİLERİN HAZIRLANMASI



MİKROPROJEKTİLERİN DNA İLE KAPLANMASI



MAKROPROJEKTİLLERİN HAZIRLANMASI



CİHAZIN HAZIRLANMASI ve ATIŞIN YAPILMASI

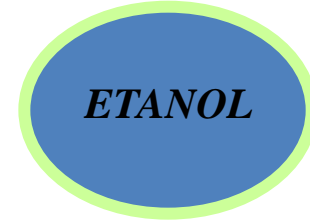


GEN GEÇİŞLERİNİN BELİLENMESİ

MAKROPROJEKTİLLERİN HAZIRLANMASI



2 CAM PETRİ



MAKROPROJEKTİL



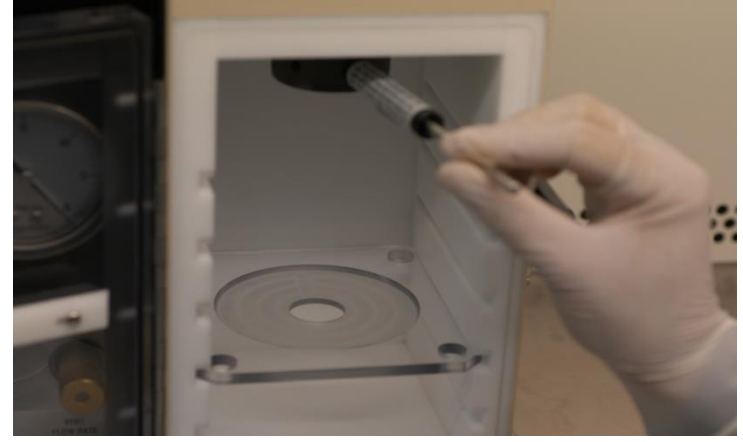
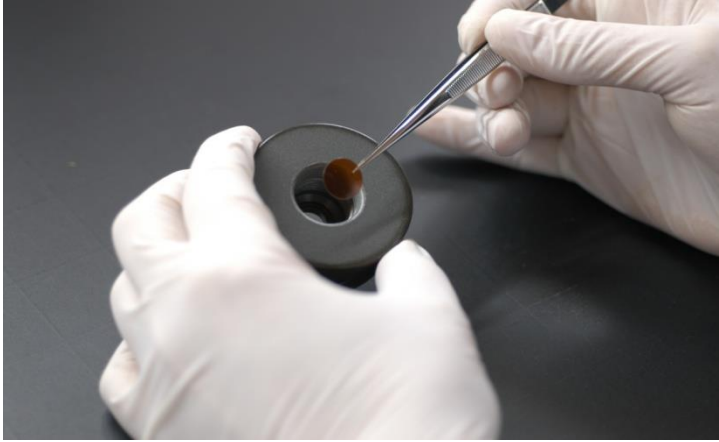
KIRILICI DİSK

KIRILICI DİSK

KORUYUCU ELEK

MAKROPROJEKİTLERİN HAZIRLANMASI

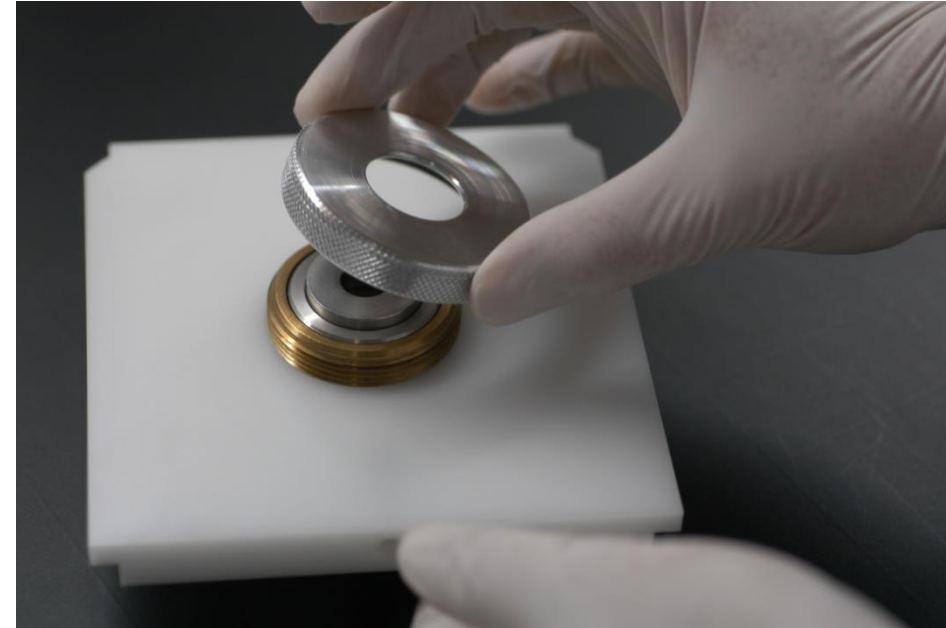
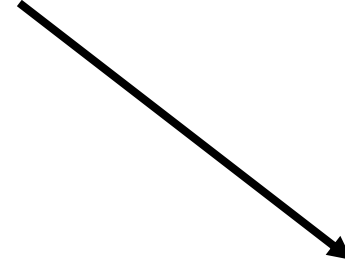
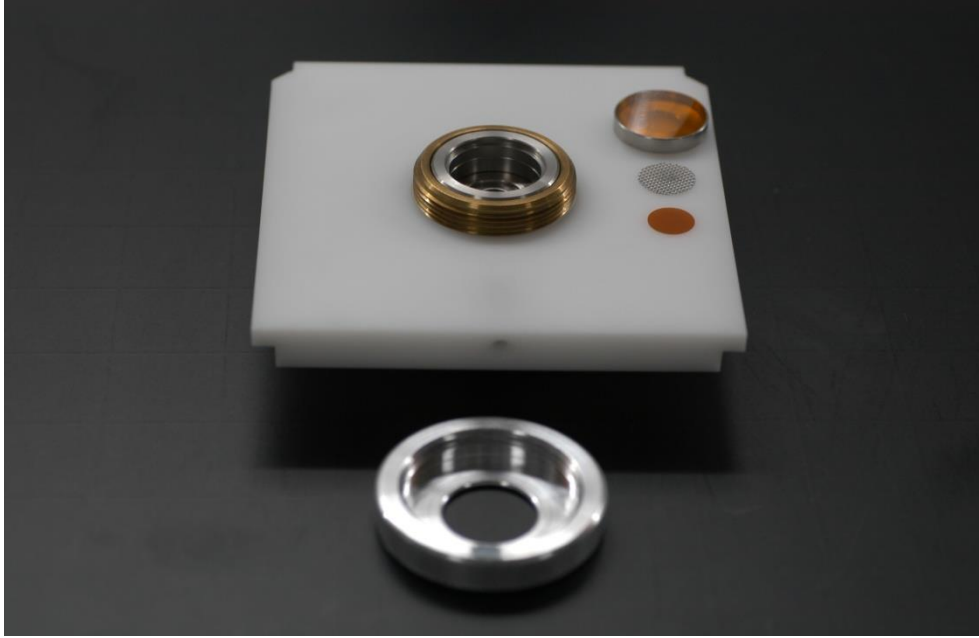
Kırılıcı disk steril pens ile izopropanol içeren petriden alınarak kağıt havlu üzerinde yavaşça kurulanıp koruma kabına yerleştirilerek özel aleti ile sabitlenir



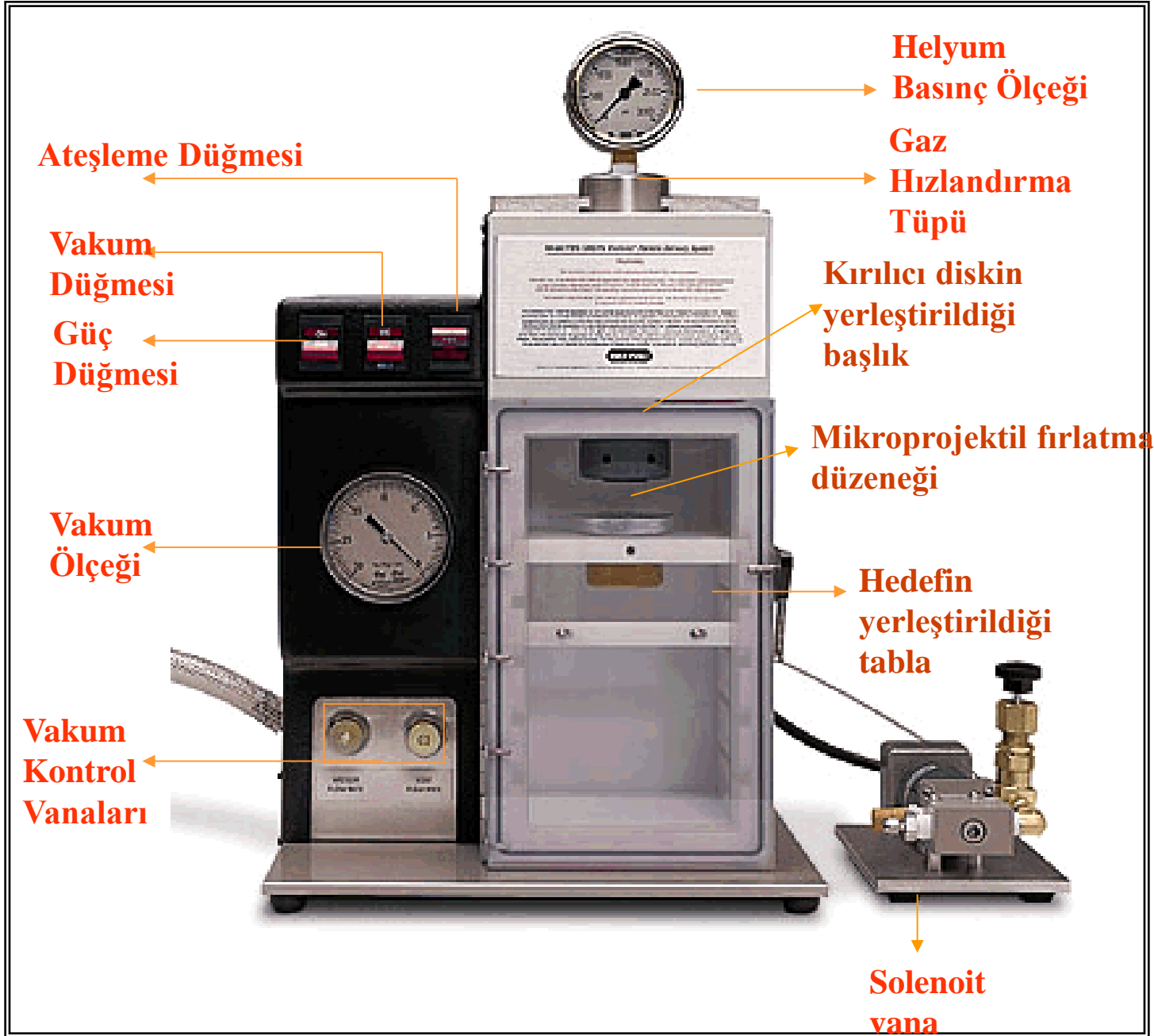
Mikroprojektil / DNA süspansiyonundan mikropipet ile belirli miktarda alınır ve makroprojektilin ortasına dağıtılır

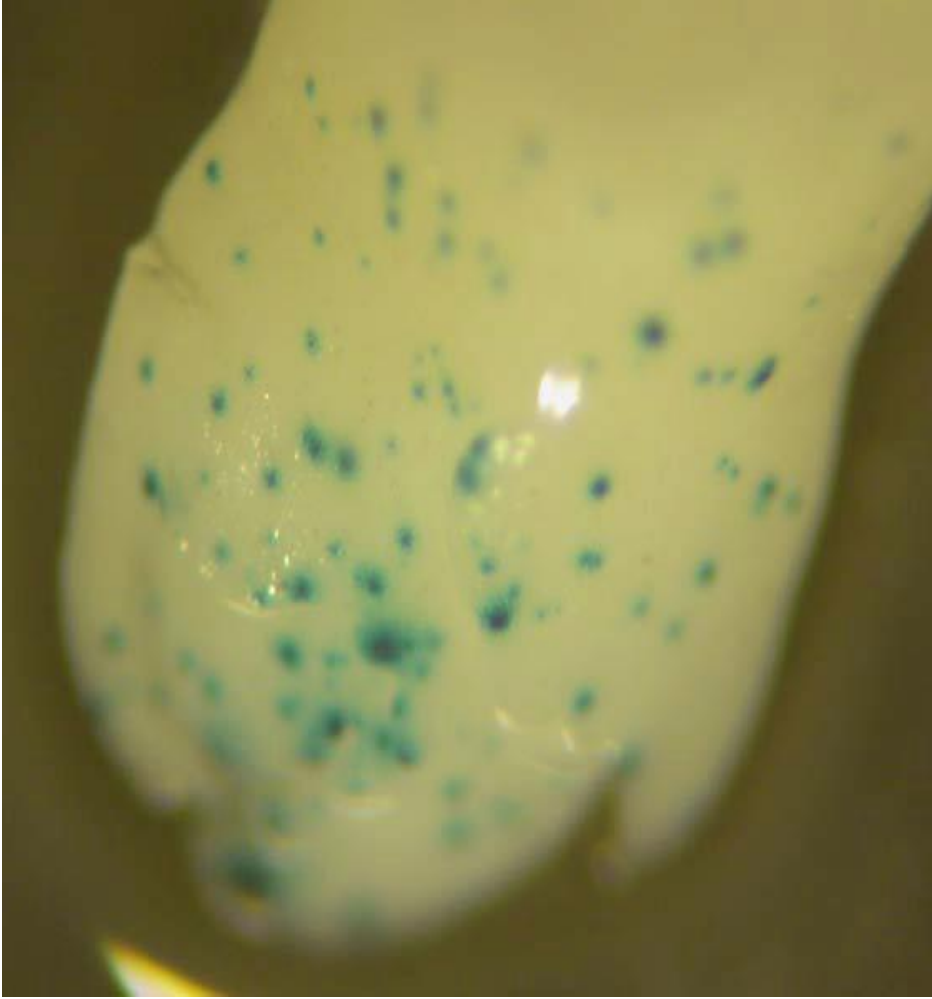
Petri kutusu içerisindeki makroprojektiler birkaç dakika vakum altında tutularak daha hızlı kurumaları sağlanır

CİHAZIN HAZIRLANMASI VE ATIŞIN YAPILMASI



Mikroprojektil fırlatma
düzeneđi





ATIŞ MESAFESİ : 6 cm

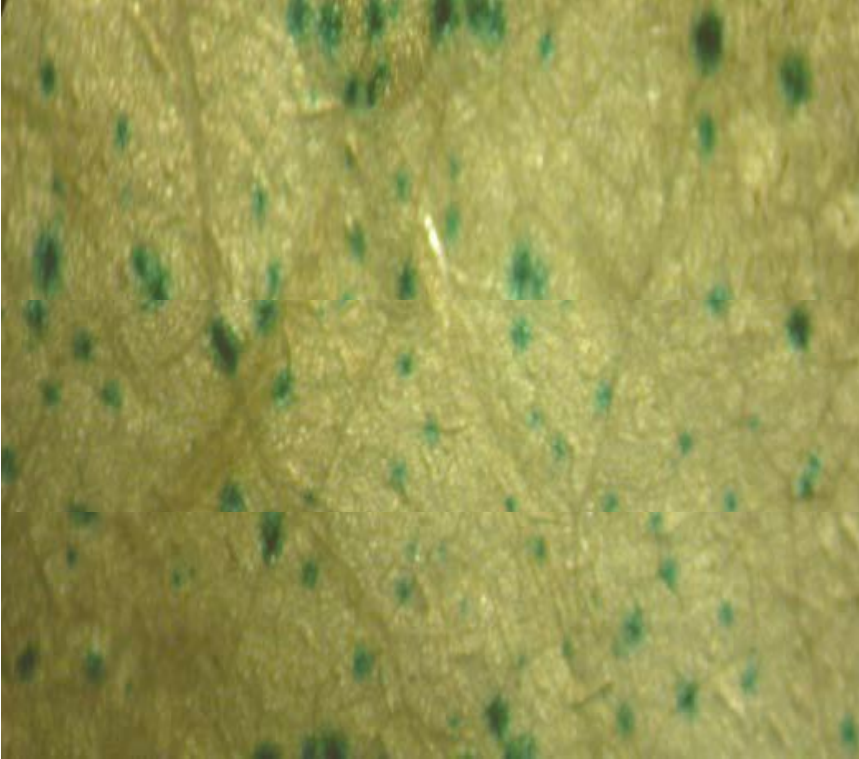
BASINÇ : 35 bar

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**

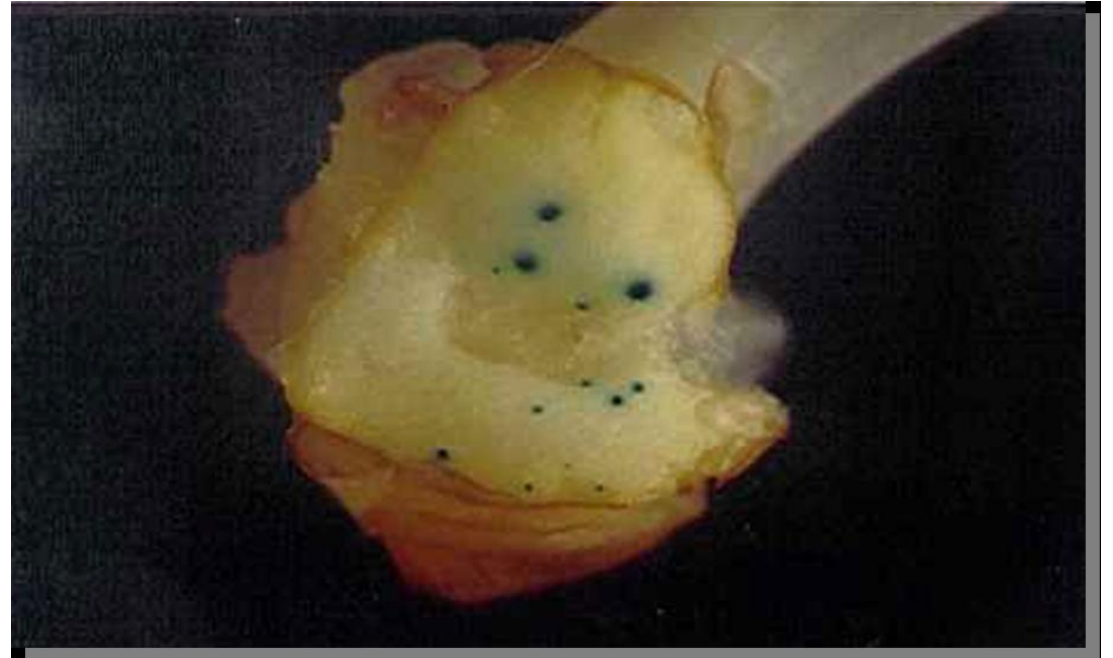
**EKSPLANT :*in vitro*
ortamda yetiştirilmiş tütün**

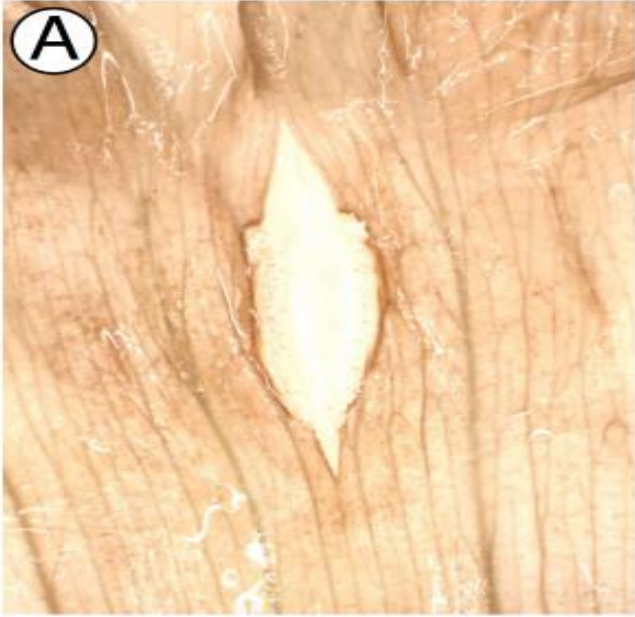
OLGUN ARPA
EMBRYOLARINA **GUS**
MARKÖR GENİ AKTARMAK
İÇİN UYGUN BASINÇ VE
MESAFENİN ARAŞTIRILDIĞI
ÇALIŞMA SONUÇLARI



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