

## BITKİ VİRÜS DAYANIKLILIĞI VE GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

Serap AÇIKGÖZ (1)

**ÖZET :** *Bitki virus hastalıklarına karşı dayanıklılık oluşturmada viral genlerin kullanılması genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanması ile başarılabilmiştir. Genetiksel olarak virusa dayanıklı olan bitki virustan etkilenmeyeceği gibi bu bitkinin tohumundan yetişen bitki de aynı dayanıklılık genini taşıyacaktır. Böylece yakın bir gelecekte birçok bitkide virus dayanıklılığı sağlamada genetik mühendisliği tekniklerinin güçlü potansiyelinden yararlanmamız mümkün olacaktır.*

### GİRİŞ

Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak bitkilerde hastalıklara dayanıklılık oluşturma konusu kamuoyu ve basının yakın ilgisini çekmektedir. Bunu, basında konu ile ilgili gelişmelerin sürekli ve günü gününe yer almasından anlıyoruz. Yazılı basında yer alan bir örnek; "Belki de birkaç yıl içinde dünyada hastalıklı sebze ve meyveler, yalnızca biyoloji ve botanik kitaplarının içindeki fotoğraflarda kalabilir." Gerçekten genetik mühendisliği teknikleri bunu başarabilecek mi ? Bu konuda elde edilen başarılı örneklerin az sayıda ve henüz laboratuvar denemeleri aşamasında oluşu, uygulamaların çok sayıda araştırma ve zamana gereksinimi olduğunu göstermektedir. Bu güçlükler rağmen hastaliksız bitkiler yaygın olarak üretilmeye başladığında, bitkileri korumak için kullanılan tarım ilaçları da belki de doğa sahnesinden silinmiş olacaktır.

### Kalıtısal Sistem ve Gen Analizi

Bitki ıslahında genetiksel dayanıklılık sağlanmasının temeli, canlıların genetik yapısının bilinmesi için yapılan araştırmalara dayanmaktadır. 1953'de Watson ve Crick tarafından ilk olarak deoksiribonükleik asit (DNA)'ın yapısı açıklanmış ve bu yapının geçmişten geleceğe doğru tür karakterlerini taşıyan bir molekül olduğu belirtilmiştir. Günümüzde en önemli gelişme genlerin nükleik asit üzerinde yer aldığı belirlenmesi ve bunların hangi özellikleri kontrol ettiklerinin saptanmasıdır. Bu genlerin yapılarının belirlenmesi, genomdaki nükleik asitlerin dört nükleotid baz

---

(1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 25240 - Erzurum.

(Guanin-G, Thyrimine-T veya Urasil-U, Cytosin-C, Adenin-A) dizilişlerinin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Bu dizilişin belirlenmesi için moleküler genetik ve transformasyon teknolojilerinden yararlanmak mümkündür (Szostak ve Rothstein, 1984).

DNA veya RNA zincirlerinden bazı enzimler aracılığı ile komplementer-cDNA zinciri oluşturulabilmektedir. Son yıllarda cDNA sentezi için sentetik oligonükleotidlerin kullanılması (Rohde ve ark., 1981) giderek yaygınlaşmıştır. Saedce kendi yapısını bütünleyebilen ve sonra (probe) adı verilen bu tamamlayıcı cDNA zinciri genom üzerindeki homolog genlerin bulunduğu bölgeleri belirlemek için kullanılmaktadır (Maniatis ve ark., 1982).

Şimdiye kadar kullanılagelen ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiş olan klasik ıslah metodlarında bazı sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Bu nedenle arzu edilen dayanıklılık her zaman elde edilememektedir. Bazen dayanıklılık genleri istenmeyen özellikler ile sıkıca bağlı bulunabilir veya dayanıklılık multigenik olabilir ve bu multigenik genlerin transferi zordur. Melezleme denemeleri bir bitki türünün üyeleri ile sınırlandırıldığı için, bir türde mevcut özellikler diğer bir türe nakledilemez. Moleküler genetik teknikleri ile geleneksel bitki ıslahının sınırlayıcı faktörlerinin bazılarının üstesinden gelinebilmiştir. Bu teknikler ile gen transferi sadece farklı bitki familyaları arasında yapılmakla kalmamış, aynı zamanda genlerin seçimi bitkiler alemi ile bile sınırlandırılmamıştır. Ayrıca fenotip düzeyindeki farklılıklar yerine moleküler düzeydeki farklılıkları (polimorfizm) saptayabilme olanağı doğmuştur.

Transfer için uygun genler hangileridir ve bu genler nasıl elde edilir soruları bir moleküler genetikcinin en fazla karşılaştığı sorulardandır. Olayların çoğunda dayanıklılığın temelini teşkil eden mekanizma bilinmediği için dayanıklılık genlerini izole etmek ve tanılamak oldukça zordur. Daha da ötesi birçok bitki türleri çok geniş genoma sahip oldukları için çok iyi haritalandırılmamıştır.

### **Viral Gen Dayanıklılığı**

Hastalıklara dayanıklılık genlerini elde etmek için bir alternatif yaklaşım, patojen genlerini kullanmaktır. Patojenler genel olarak konularından daha kısa hayat periyoduna ve daha küçük genoma sahiptirler. Böyle genlerin izolasyonu da daha kolay olabilmektedir. Viral genlerin resisten gen olarak fonksiyon yapılabileceği Coleman ve ark. (1985) ve Crumet ve ark. (1987) tarafından gösterilmiştir. Hamilton (1985) hastalık kontrolü için bitki virüslerinin kullanılabilirliği üzerindeki görüşlerini bildirmiştir. Bu kontrol için en fazla üzerinde durulan konu çapraz korunma (cross-protection) dır; yani şiddetli virus ırklarından korunmak için zayıf ırkların

kullanılmasıdır. Viral kapsül genlerinin konukçuya aktarılması virus enfeksiyonu hassasiyetini azalttığı yönünden bulgular da vardır. Bir virusa dayanıklılığı temin edilen bitki birkaç virusa da dayanıklı hale getirilmiş olmaktadır.

Bitki virus hastalıklarına karşı dayanıklılık temin etmede virusların kullanılması konusunda aşağıda belirtilen dört alternatif ve bunların dayanıklılığı sağlamak için kullanılabilirliği ayrı ayrı tartışılacaktır.

1. Viral protein geni
2. Tüm viral genom
3. Antisense dizilişi
4. Satellite dizilişi

### 1. Viral Protein Genleri

Bitkilerde genetiksel olarak virus dayanıklılığının elde edildiği örneklerin çoğu virus protein kapsülü kullanımı ile ilgilidir. Virus kabuk protein geni aktarılan transgenik bitkinin bünyesinde sürekli bu kabuk proteini üretilir ve bitki virusa maruz kalınca enfeksiyon başlamaz. Bitkilerdeki bu dayanıklılık özelliği stabil olarak birçok generasyonlara taşınabilir. Protein kapsül genlerin bitkilerin büyümesi veya fiziksel görünüşlerinde herhangi bir negatif etki oluşturmazlar. Transgenik bitkilere virus inoküle edildiği zaman bitki yaprakları kontrollere göre daha az kloratik veya nekrotik lezyon gösterirler. Ayrıca enfeksiyonun sistemik yayılımı geçilebilir ya da tamamen önenebilir.

Viral protein kapsül geni aktarılan bitki (transgenik bitki) üretmek için, gerekli birçok işlemler vardır. Bunlardan ilki viral RNA'nın izole edilmesidir. Bu viral RNA tamamlayıcı (Komplement) c-DNA kullanılır. İkincisi, viral protein gen tanımlanmalı, dizilişi saptanmalı ve transcriptional promoter (destekleyici) ile uygun bir vektör içinde çoğaltılmalıdır. Ayrıca viral protein gen taşınmayı kolaylaştırmak için uygun dizilişe sahip olmalıdır.

Öncelikle bir viral gen transcribe edilir ve sonra bir araya toplanır. Bu genin bitkiye girişini gerçekleştirmek için bir vektöre transforme edilir. Bu maksatla *Agrobacterium tumefaciens* kullanılmaktadır (Horsch ve ark., 1985) *A. tumefaciens* doğal bir genetik mühendistir. Onun hayat devrinin normal bir parçası, Ti plasmidindeki genlerin konukçu kromozom içine yerleştirmesidir.

*A. tumefaciens*'in zararsız hale getirilmiş ırkları üretilir ve bu bakteri içerisine normal pathogenik genler yerine klonlanmış en az iki gen verilir. Bunlardan birisi seçici özelliği sağlayan antibiyotik dayanıklılık geni diğer viral protein kapsül genidir. Transforme olmaya başlayan hücreler antibiyotik içeren ortamda kültüre alınarak

seçilirler. Bu arada konukçu bitkinin yaprak veya katiladon gibi çeşitli kısımları *A. tumefaciense* 'e maruz bırakılır. Antibiyotik dayanıklılık geni taşıyan bu hücreler yeni bitkiler içinde canlı kalabilir ve yeniden oluşabilir.

Viral protein kapsül genlerinin konukçuya aktarılması ve bunun sonucu virus enfeksiyonu hassasiyetinin azaldığı yönündeki ilk bulgu tütün bitkilerinde tütün mozayik virusu için gösterilmiştir (Powell-Abel ve ark., 1986). Daha sonra transgenic tütün bitkilerinde viral protein kapsülün tütün çizgi virus-(TSV) (Van Dun ve Bol, 1988) ve hıyar mozayik virusu (CMV) (Cuozzo ve ark., 1988) enfeksiyonlarını durdurduğu saptanmıştır.

### **Cross-Protection ile İlişkisi**

Zayıf bir ırk ile bitkilerin inoküle edilmesiyle virusun şiddetli ırkı tarafından oluşturulacak enfeksiyona karşı bitkileri korumak mümkündür. Bazı araştırmacılar şiddetli bir ırk tarafından oluşturulacak enfeksiyona karşı zayıf virus ırkı ile temin edilen bu dayanıklılığın zayıf ırktan elde edilen protein kapsülün varlığından dolayı olduğunu savunmuşlardır (Powell-Abel ve ark., 1986; Tümer ve ark., 1987). Aslında çapraz korunma olayının mekanizması henüz tam olarak anlaşılmadığı için protein kapsülün bu korunma için gerekli olup olmadığı kesin olarak tesbit edilememiştir. Ancak protein kapsüle sahip olmadığı halde viroidlerde dayanıklılık çapraz korunma ile sağlanabilmiştir (Niblett ve ark., 1978).

Zayıf ırka ait protein kapsülün kullanılması sonucunda bitkilerde dayanıklılık oluşması ile ilgili pek çok örnek vardır. TMV un zayıf U<sub>1</sub> ırkının protein kapsülü, şiddetli PV 230 ve üç şiddetli ırkı ile enfeksiyonlara karşı koruyucu olmuştur. Domates mozayik virus, alfalfa mozayik virusu (AIMV), tütün kırık virusu (TRV) ve Bezelye erken bronzlaşma virus (PEBV)'ları içinde durumun benzer olduğu bildirilmiştir (Grumet, 1990). PVX'in protein kapsülü taşınmış transgenik bitkilerin, hem tüm virion hem de viral RNA ile yapılan enfeksiyona dayanıklı oldukları bulunmuştur (Hemenway ve ark., 1988).

Halen, turuncgillerde (Turuncgil tristeza virus), papaya da (Papaya halkalı leke virus) ve sera domateslerinde (TMV) kullanılmakta olan klasik çapraz korunma yöntemi yerine genetik mühendisliği teknikleri ile elde edilmiş bitkileri kullanmak daha avantajlıdır. Çünkü zayıf virus ırkı ile bitkilerin inoküle edilmesi yoğun laboratuvar ve sera çalışması gerektirdiği gibi sınırlı popülasyon sayısı ile çalışmayı gerektirir. Daha ötesi zayıf ırk bazı ters etkilenelemelere neden olabilir. Örneğin ırk mutasyonla şiddetli ırka dönüşebilir.

## 2. Tüm Viral Genom

Virus dayanıklılığında diğer bir yaklaşım TMV'nin koruyucu, zayıf bir ırkının tüm genomunun taşınmasıyla elde edilen transgenik tütün bitkilerinin üretilmesiyle gösterilmiştir. Bu transgenik bitkiler virus ile karşılaştıklarında çoğu normal bitkiler kadar iyi büyümüş, ya simptomsuz veya da yapraklarda zayıf hafif bir mozayik göstermişlerdir (Yamaya ve ark., 1988).

TMV protein kapsül aktarılan bitkilerle yapılan çalışmaların aksine bitkilere tüm viral gen verildikten sonra TMV RNA inokulasyonu zayıf ırk korumasını gerçekleştirememiştir. Tüm viral gen uygulaması ile oluşan dayanıklılık protein kapsül geninin tek başına olmasından daha yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni protein kapsülü tekbaşına olduğundan daha fazla miktarda zayıf virus kullanılmasından olabilir.

TMV'de yapılan gözlemlerde bitkilerde dayanıklılık oluşturmak için tüm virus genomunu kullanmanın, protein kapsülü kullanmaktan daha uygun olduğu saptanmıştır. Buna karşılık Yamaya ve ark. (1988) tüm viral gen kullanmanın dezavantajlarını şu şekilde sıralamıştır. a) Stabil zayıf ırk gereklidir. b) Zayıf ırk, üründe kalite ve kantiteyi azaltıcı etkide bulunabilir. c) Zayıf ırk mutasyon yoluyla virulent bir ırk haline dönüşebilir.

## 3. Antisense Diziliş

Virus dayanıklılığında genetik mühendisliğinin kullanılması konusunda üçüncü yaklaşım antisense RNA (mesencer RNA sarmalını tamamlayıcı RNA'lar) dizilişlerinin kullanılmasıdır.

Antisense dizilişinin virus replikasyonunu önlemek özelliği ilk kez *E. coli* 'yi enfekte eden bakteriofaj sp için gösterilmiştir (Coleman ve ark., 1985). Antisense dizilişi kullanılmasının RNA bitki virusları tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı koruyucu olduğu saptanmıştır.

Hıyar mozayik virusu (CMV) ve Patates X virusu (PVX)'larında antisense dizilişlerinin kullanılması ile bazı başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Antisense RNA verilen bitkilerin kontrollere göre virus enfeksiyonlarına daha az hassas olduğu görülmüş fakat bu korunmanın sadece düşük konsantrasyonlardaki inokulum uygulamalarında gerçekleştiği belirlenmiştir (Grumet, 1990). Genelde antisense RNA kullanılarak elde edilen dayanıklılık seviyesinin viral kapsül gen, zayıf virus ırkı geni satelite diziliş tarafından sağlanan dayanıklılık kadar yüksek olmadığı söylenebilir.

#### 4. Satellite Diziliş

RNA viruslarının çoğu, satellite (uydu) diye adlandırılan küçük (300-400 nükleotid) tek sarmal RNA molekülüne sahiptirler. Satellite RNA'lar konukçu bitkilerde virus enfeksiyonlarında oluşan semptomların şiddetlerini azaltabilir, görüşü nedeniyle araştırmacılar konukçu bitki genomu içine klonlanmış satellite dizilişlerinin yerleştirilmesinin etkilerini incelemişlerdir.

Harrison ve ark. (1987) hıyar mozayik virusunun (CMV), Gerlach ve ark. (1987) tütün halkalı leke virusunun (TORV) satellit dizilişlerini kullanmışlardır. Sonuçta CMV ve TORV satellite dizilişleri içeren transgenik tütün bitkilerinin kontrollere göre daha az semptom sergiledikleri belirlenmiştir.

Satellitlerin kullanılmasının etkileri her zaman tahmin edilemez. Bazen satellitler kontrollere göre daha az şiddetli semptomların oluşmasına neden olabilirken bazen de daha şiddetli semptomların oluşmasına yol açabilirler. Semptomlardaki bu farklılıklar birkaç nükleotiddeki değişimlerden olabilir. Satellitlerin oluşturduğu etkiler virus ırklarına bağlı olarak değişmektedir. Bu durum satellit dizilişlerinin kullanılmasının protein kapsül geni kullanılmasından çok daha sınırlı olduğunu göstermektedir.

Dayanıklılık kaynağı olarak viral genlerin kullanılması, genetiksel olarak virusa dayanıklı bitkilerin oluşturulmasında oldukça önemlidir. Bunun için uygulanabilecek dört ayrı yaklaşım olumlu ve olumsuz yönleri ile karşılaştırılarak anlatılmaya çalışılmıştır. Genetik mühendisliğinin yakın gelecekte birçok bitkide virus dayanıklılığı artışı sağlamak için güçlü bir potansiyel olacağını söylemek mümkündür.

#### KAYNAKLAR

- Coleman, J., A. Hirashima, Y. Inokuchi, P.J. Green and M. Inouye, 1985. A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA). *Nature (London)* 315 : 601-603.
- Cuozzo, M., K.M. O'Connell, W. Kaniewski, R.X. Fang, N.H. Chua and N.E. Tumer, 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA *Bio/Technology* 6 : 549-557.
- Gerlach, W.L., D.Liewellyn and J. Haseloff, 1987. Construction of a plants disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature (London)* 328 : 802-805.
- Grumet, R., 1990. Genetically engineered plant virus resistance, *Hort Science*, 25 : 508-513.

- Grumet, R.J.C. Sonford and S.A. Johnston, 1987. pathogen derived resistance to viral infection using a negative regulatory molecule. *Virology* 161 : 561-569.
- Hamilton, R.J., 1985. Using plants viruses for disease control. *HortScience* 20 : 848-852.
- Harrison, B.D., M.A. Mayo and D.D. Boulcombe, 1987. Virus resistance in transgenic plants that expereess cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature (London)* 328 : 799-802.
- Henenway, C., R.X. Fang, W.K. Kaniewski, N.H. Chua and N.E. Tumer, 1988. Analysis of the mevhanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO. J.7:* 1273-1280.
- Horsch, R.B., J.E. Fry. NL. Haffman, D.Eicholts, S.G. Rogers and R.T. Fralcy, 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Niblett, C.L., E. Dickson, K.H. Fernow, R.K. Horst, and M. Zaitlin, 1978. Cross protection among four viroids. *Virology* 91 : 198-203.
- Powell-Abel, P., R.S. Nelson, B.De, N. Hoffmann, S.G. Rogers, R.T. Fralcy and R.N. Beachy, 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene *Science* 232 : 738-743.
- Rohde, W., M. Schnolzer and H.L. Sanger, 1981. Sequence specific priming to the in Vitro synthesis of DNA complementary to citrus exocortis viroid *FEBS Lett* 130 : 208-212.
- Szostak, J.W. and R.J. Rothstein, 1984. *Theory and practice of genetic engineering.* T. Kosuge and E.W. Nester (Ed.). *Plant-Microbe Interactions. Vol. I.* Macmillan Publishing Company, New York, 444pp.
- Tumer, N.E., K.M. O'Connell, R.S. Nelson P.R. Sanders, R.N. Beachy R.T. Fralcy and D.M. Shah. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants *EMBo J.* 6 : 1181-1188.
- Van Dun, C.M.P. and J.F.Bol. 1988. Transgenic tobacco plants accumulating tabocco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* 167 : 649-652.
- Yamaya, J.M. Yoshioka T. Meshi, Y. Okada an T. Ohno, 1988. Cross protection in transgenik tobacco plants expressing a mild strain of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Gcnet.* 315 : 173-175.