

## BİTKİLERE GEN TRANSFERİ

Kenan TURGUT

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,  
Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya.

Özet: Bu derlemede bitkilerin transformasyonunda kullanılan gen transfer yöntemleri tartışılmıştır. *Agrobacterium* yoluyla gen transferi ve mikroprojektil bombardımanı, bitki protoplastlarına gen transferi ve DNA enjeksiyonu gibi doğrudan gen transfer teknikleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Bunlara ilaveten her bir tekniğin avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır.

### Gene Transfer To Plants

Abstract: In this review, gene transfer methods for plant transformation were discussed. *Agrobacterium*-mediated gene transfer and direct gene transfer techniques namely microprojectile bombardment, gene transfer to plant protoplasts and DNA enjection were presented comparatively. Furthermore, advantages and disadvantages of each technique were discussed.

### Giriş

Klasik ıslah tekniklerinin uygulanması ile tarım ürünlerinin verimleri önemli ölçülerde artırılmıştır. Fakat klasik ıslah yöntemleri uzun zaman almaktadır, örneğin yeni bir buğday çeşidinin ortaya çıkarılması 4-8 yıl almaktadır. Geleneksel ıslah tekniklerine moleküler biyoloji ve gen transfer tekniklerinin eklenmesi yeni bitki çeşitlerinin üretilmesini hızlandıracaktır. Ayrıca klasik bitki ıslahında kullanılan gen havuzu giderek azalmaktadır. Sadece sekiz tahıl türü toplam dünya gıda kalorisinin %50 'sini sağlamaktadır. Gen manipülasyon teknolojisi, genlerin türler arasında transferine izin vererek dünya bitki kaynaklarındaki genetik çeşitliliğin artırılmasına katkıda bulunacaktır.

Bitkilere gen transferinin başarılması, genetik mühendisliği çalışmalarını daha da hızlandırmıştır. Günümüzde birçok çalışma gurubu, değişik kaynaklardan farklı genleri tanımlayarak izole etmeye çalışmaktadırlar. Genlerin bitkilere transferi konusunda ise değişik yöntemler denenmiştir ve halen çalışmalar devam etmektedir. Kimyasal ve elektroporasyon teknikleri ile bitki protoplastlarına gen transferi, mikroprojektil bombardımanı ile bitki meristem veya embriyogenik kallusuna DNA transferi ve DNA enjeksiyonu ile bitki üreme organlarına DNA transferi teknikleri ile *Agrobacterium* yoluyla bitkilere gen transferi başarılmıştır.



Bitkilere gen transferinde önemli bir konuda transforme olan hücre veya dokuların regenerasyon yetenekleridir. Bundan dolayı üzerinde çalışılacak olan eksplantın seçimi özenle yapılmalıdır. Dolayısıyla çalışılacak olan hücre veya dokuların hem yabancı DNA'yı kabul edici ve hem de regenerasyonu kolay olmalıdır.

### **Agrobacterium Yoluyla Bitkilere Gen Transferi**

*Agrobacterium tumefaciens* doğanın kendi genetik mühendisi olarak tanımlanmaktadır. Toprak kökenli bir bakteri olup dikotiledon bitkilerin yara dokularında tümör oluştururlar (1). *Agrobacterium'* un bitkilerde oluşturduğu tümör dokuları, "opine" adı verilen amino asit ve şeker derivatlarını sentez ederler. Tümör dokuları tarafından sentez edilen opine'nin tipi (octopine, nopaline, mannopine) bitkide tümörü oluşturan *Agrobacterium* suşuna bağlıdır (2).

Bütün virülent *Agrobacterium* suşları, Ti plazmit adı verilen ve kromozom dışında ekstra DNA segmentlerini taşırlar. Bitkilerde tümör oluşturan Ti plazmitler halka şeklinde dupleks DNA yapısında olup 200-250 kb (kilobaz) büyüklüğündedir. Ti plazmitler üzerinde bulunan T-DNA (bitkiye transfer olan DNA) ve virülens (*vir*) bölgeleri tümör oluşumunda birlikte rol oynarlar. 25 bp (baz çifti) sekans ile sınırlandırılmış olan T-DNA bölgesi bitki hücresine transfer olmakta ve bitki genomuna entegre olmaktadır (3).

Nopaline-tip Ti plazmit T-DNA bölgesi 24 kb' dir ve *tms1*, *tms2*, *tmr* ve *nos* (nopaline sentaz) genlerini taşımaktadır. Bu genlerden *tms1* ve *tms2* tümör dokularında oksin sentezlenmesini, *tmr* ise sitokinin sentezlenmesini gerçekleştirmektedir. Bundan dolayı da bu genler onkogenler olarak tanımlanırlar.

*A. tumefaciens'* in bitkilere gen transferi dört aşamada gerçekleşir: 1) Bakterinin bitki hücresini tanınması, 2) *Agrobacterium* ve bitki hücrelerinin teması, 3) T-DNA'nın bitki hücresine transferi ve bitki genomuna entegrasyonu, 4) T-DNA'nın bitki genomunda ekspresyonu (4). T-DNA'nın bitki hücresine transfer mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Ti plazmit üzerinde bulunan *vir* bölgesindeki virülens genleri, T-DNA'nın bitkiye transferini sağlamaktadır. Yaralanmış olan bitki hücreleri acetosyringone adı verilen spesifik fenolik bileşimlerini (sinyal molekülleri) ortama sentezlerler (5). Bu sinyal molekülleri Ti plazmit üzerindeki virülens genlerini (*virA*, *virG*) uyarmakta ve böylece bir endonükleaz enzimini kodladığı düşünülen *virD* geni de aktif hale gelmektedir. Bu enzimin T-DNA'nın bir zincirini sağ ve sol sınır sekanslarından kestiği düşünülmektedir (6). Tek zincir halindeki T-DNA, sağ sınırın önceliğinde bitki hücresine transfer olmaktadır. Tek zincir halindeki T-DNA bitki hücresine girdikten sonra dupleks forma dönüşmektedir.



Ti plazmit bitki hücrelerinin genetik mühendisliği için doğal bir vektördür. Fakat yabancı tip olarak adlandırılan bu vektörler bitkilere gen transferi için uygun değildir. Çünkü, T-DNA'ları üzerindeki tümör oluşturan onkogenler alıcı bitki hücrelerinde organize olmayan büyümelere neden olmaktadır. Ayrıca bu plazmitler çok büyük olduklarından manipulasyonları da zor olmaktadır.

Bu nedenlerden dolayı bitkilerin etkili regenerasyonu için onkogenleri taşımayan vektörlerin kullanılması zorunlu olmuştur. Onkogenleri uzaklaştırılan vektörlere "disarmed" vektörler adı verilmektedir. Zambryski ve ark. (3) disarmed pGV3850 vektörünü bu yolla elde etmişlerdir. Bu vektör T-DNA'ında, onkogenler yerine çok yaygın bir klonlama vektörü olan pBR322 sekanslarını taşımaktadır. Bu vektörü taşıyan *Agrobacterium*, bitki hücrelerini enfekte ettiğinde T-DNA bitkiye transfer olmakta fakat bitkide tümör oluşturmamaktadır. Dolayısıyla transformasyona uğramış bitki hücrelerinden sürgün yenilenmesi yoluyla transgenik bitkiler elde etmek mümkün olmuştur.

Bitki transformasyonunda kullanılan vektörlerin T-DNA'ında marker genlerin bulunması çok önemlidir. Çünkü, transformasyona uğramış bitkilerin pratik olarak erken devrelerde seçilmesi büyük yararlar sağlamaktadır. Aminoglikosit tipi (kanamycin) antibiyotiklere karşı dayanıklılık sağlayan npt II (neomycin phosphotransferase II) geni yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir bakteriyel transposon olan Tn5'ten izole edilmiş olan bu enzim, fosforilasyon yoluyla adı geçen antibiyotikleri detoksife etmektedir (7). Bir reporter gen olan beta-glucuronidase (GUS), histokimyasal ve fluorometrik olarak transgenik bitkilerde gözlenebilmektedir (8).

*Agrobacterium* yoluyla birçok bitkinin transformasyonu başarılmış olmasına rağmen bazı önemli tarım bitkilerinin transformasyonu halen başarılamamıştır. Bunun iki önemli nedeni vardır (9): 1) Doku kültürü yöntemlerinin yetersiz olması, 2) *Agrobacterium* - bitki ilişkisinde ortaya çıkan sorunlar. Transformasyonun başarılmaması tamamen transgenik hücrelerden adventif sürgün yenilenmesine bağlıdır. Özellikle kallus oluşumundan sonra sürgün yenilenmesi meydana geliyorsa, bu durum transformasyonu olumlu yönde etkilemektedir (9). *Agrobacterium* kromozomunda mevcut bazı genler konukçu bitki seçiciliğinde rol oynamaktadır. Bu nedenle çalışılan bitki türüne uygun *Agrobacterium* suşunun belirlenmesi önemli bir noktadır. Günümüzde kolza, pamuk, havuç, petunya, patates, çilek, ayçiçeği, tütün, domates gibi önemli bitkilerin genetik transformasyonu başarılmıştır.



## Mikroprojektil Bombardımanı Yoluyla DNA Transferi

*Agrobacterium* yoluyla bazı önemli bitkilerin genetik transformasyonu halen problem oluşturmaktadır. Özellikle tahıllarında dahil olduğu monokotiledon bitkilerin regenerasyonunda ortaya çıkan sorunlar ve doğal olarak *Agrobacterium*'un konukçusu olmamalarından dolayı alternatif teknikler denenmektedir.

Mikroprojektil veya partikül bombardımanı olarak adlandırılan tekniğin işleyiş mekanizması tamamen bir silaha benzemektedir. Altın veya tungsten partikülleri, transfer edilecek olan DNA (plazmit içerisinde) ile kaplanmakta ve yüksek bir hızla bitki doku yüzeylerine bombalanmaktadır. Bu teknikte de transfer edilmek istenen DNA'yı taşıyan plazmitte selektif ve reporter genlerin bulunması gereklidir. Uygulamada genellikle nptII selektif ve GUS reporter genleri kullanılmaktadır. Böylece bitki dokularında, yabancı DNA'nın transit veya stabil entegrasyonları kolayca gözlenebilmektedir.

Bu tekniğin çalıştığını anlamak için tungsten partikülleri tütün mozayik virüsü RNA'sı ile kaplandıktan sonra soğan epidermal dokusuna bombalanmıştır. Üç gün sonra bu partikülleri taşıyan soğan hücreleri incelendiğinde virüs replikasyonu gözlenmiştir (10). Yine bu araştırma gurubu CAT (chloramphenicol acetyltransferase) genini soğan epidermal dokusuna bombalamış ve bu dokularda yüksek derecede transit CAT ekspresyonu bulmuşlardır.

Partikül bombardımanı ile DNA'nın bitki genomuna stabil entegrasyonu da başarılmıştır. Bu teknik ile mısır (11), soya (12) ve çeltik (13) gibi önemli bitkilerden transgenik bitkiler elde edilmiştir. Partikül bombardımanı tekniğinde meristem dokuları ve embriyogenik kallus gibi regenere olabilen dokular kullanılmaktadır. Bu nedenle alıcı dokularda ayrıca bir hücre kültürü veya ön uygulama gerektirmemektedir. Bu da gösteriyorki partikül bombardımanı, zaman ve iş gücü bakımından büyük bir avantaj sağlamaktadır.

## Doğrudan Bitki Protoplastlarına DNA Transferi

Hücre duvarları uzaklaştırılan bitki hücreleri protoplast olarak adlandırılmaktadır. Protoplast ise doğrudan DNA alımı için uygun bir yapı göstermektedir. DNA'nın bitki protoplastına girebilmesi için kimyasal yöntem (PEG 6000) ve elektroporasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Paszkowski ve ark. (14) PEG 6000 uygulaması ile tütün yaprak protoplastlarına Ti plazmit DNA'sını transfer etmişlerdir. Transforme protoplastların seçimi plazmit üzerinde bulunan nptII geni ile olmuştur. Bu ve diğer çalışmalar, protoplast transformasyonu yoluyla yabancı DNA'nın bitki genomuna stabil olarak entegre olduğunu ve gelecek generasyonlara geçtiğini göstermiştir.



Elektroporasyon tekniğinde, vektör DNA'sının varlığında yaklaşık 350 volt elektirik akımı ile bitki protoplastlarının permeabilitesi sağlanmaktadır. Bu uygulamadan sonra protoplastlar iki hafta süreyle kültüra alınmakta ve bunu antibiyotik seleksiyonu izlemektedir. İki hafta daha protoplast kültürü yapıldıktan sonra oluşan mikrokalliler 5-6 hafta süreyle selektif katı ortama alınırılar. Fromm ve ark.(15) transgenik mısır kallilerinde, her haploit genom başına nptII geninin 1-5 kopyasını bulmuşlardır ve bütün transgenik kalliler nptII ekspressiyonu göstermişlerdir. Diğer çalışmalarda gramineae bitkilerinden olan buğday (16) ve italyan çimi (17) protoplastlarına DNA transferi olmakla birlikte transforme hücrelerin regenerasyonu başarılammıştır. Buna karşın hücre kültürleri ile çeltik bitkisinin regenerasyonu ve stabil DNA entegrasyonu başarılmıştır (18).

Bitki protoplastlarına DNA transferi tekniğinde en önemli engelleyici faktör alıcı bitki protoplastlarının regenerasyon yetenekleridir. Bu tekniğin diğer olumsuz yönleri, protoplast ile çalışmanın zorluğu ve uzun zaman almasıdır. Ayrıca transforme bitkilerin oranı çok düşük (%1'den az) olarak gerçekleşmektedir. Fakat bunların yanısıra alıcı bitki bakımından herhangi bir seçicilik göstermemesi önemli bir avantaj sağlamaktadır.

#### Enjeksiyon Tekniği ile DNA Transferi

Tahıllarda, kültüre alınan hücrelerden regenerasyon yoluyla yeni bitkilerin elde edilememesi sorunu gen transferleri bakımından kısıtlayıcı bir faktör olmaktadır. Bu nedenle gen transferinde alternatif teknik arayışları devam etmektedir. de la Pena ve ark. (19) selektif marker genini taşıyan plazmit DNA'sını doğrudan gelişmekte olan çavdar başak taslağına enjekte etmişlerdir. Bu çalışmada da nptII geni marker gen olarak kullanılmıştır. DNA enjeksiyonundan sonra başaklar büyümeye bırakılarak diğer enjekte edilmiş bitkiler ile tozlanmıştır. Elde edilen tohumlar kanamycin ortamında çimlendirilerek dayanıklı olanlar seçilmiştir. Bu bitkiler üzerinde yapılan analizler, yabancı DNA'nın bitki genomuna entegre olduğunu göstermiştir.

Aslında DNA enjeksiyon yöntemi, uygulaması kolay ve sonucun çok çabuk alındığı bir tekniktir. Enjekte edilecek olan DNA'nın miktarı ve alıcı bitkinin gelişme dönemi tekniğin başarısı açısından önemlidir.

#### Sonuç

Bitkilere gen transferleri konusunda büyük başarılar elde edilmiştir. Birbirlerinden çok farklı tekniklerin denenmiş olması belki de bu başarıyı sağlayan en önemli faktördür.



Yukarıda anlatılan tekniklerden hiçbirisi bütün bitkiler için yeterli olamamıştır. *Agrobacterium* yoluyla gen transferi en başarılı yöntem olmakla birlikte bazı sorunları vardır. Bunlardan en önemlisi *Agrobacterium*'un doğal olarak konukçu bitki seçiciliği göstermesidir. Doğrudan bitki protoplastlarına gen transferi, uygulama açısından zor olmasına rağmen bazı başarılar elde edilmiştir. Teorik olarak protoplast kültürü başarılı olan bütün bitki türlerinde bu teknik uygulanabilir. Fakat monokotiledon bitkilerin düşük regenerasyon yetenekleri bu yöntem için engel oluşturmaktadır. Bu nedenlerden dolayı partikül bombardımanı tekniği özellikle monokotiledon bitkilerin genetik transformasyonu için önem kazanmıştır.

#### Kaynaklar

1. De Cleene, M., De Ley, J., The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-466, 1976.
2. Draper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R., Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual. Blackwell Scientific Publ. Oxford, 1988.
3. Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J., Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150, 1983.
4. Hooykaas, P.J.J., Schilperoot, R.A., *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19:25-38, 1992.
5. Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P., Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318:624-629, 1985.
6. Yanofsky, M.F., Porter, S.C., Young, C., Albright, L.M., Gordon, M.P., Nester, E.W., The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47:471-477, 1986.
7. Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M-D., Chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-186, 1983.
8. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., GUS fusions: B-glucuronidase is a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907, 1987.
9. Turgut, K., A study of anther gene function in *Brassica napus* using an antisense approach. Doktora Tezi, University of Leicester, Leicester, 1993.



10. Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C., High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73, 1987.
11. Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Lemaux, P.G., Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2:603-618, 1990.
12. McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P., Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926, 1988.
13. Christou, P., Ford, T.L., Kofron, M., Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9:957-962, 1991.
14. Paszkowski, J., Shillito, R.D., Saul, M., Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, I., Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3:2717-2722, 1984.
15. Fromm, M.E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., Klein, T.M., Inheritance and expression of chimeric genes in progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:833-844, 1990.
16. Lorz, H., Baaker, B., Schell, J., Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188, 1985.
17. Potrykus, I., Saul, M.W., Paszkowski, J., Shillito, R.D., Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188, 1985.
18. Zhang, H.M., Yang, H., Rech, E.L., Golds, T.J., Davis, A.S., Mulligan, B.J., Cocking, E.J., Davey, M.R., Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7:379-384, 1988.
19. de La Pena, A., Lorz, H., Schell, J., Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature.* 325:274-276, 1987.